

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E

PRODUZIONI ANIMALI



DOTTORATO DI RICERCA IN

PRODUZIONE E SANITA' DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

INDIRIZZO: SCIENZE DELL'ALLEVAMENTO ANIMALE

XXV CICLO

Caratterizzazione di geni che influenzano la

prolificità nelle razze ovine autoctone

Bagnolese e Laticauda allevate

in regione Campania

TUTOR

Ch.mo Prof. Vincenzo Peretti

CANDIDATO

Dott.ssa Roberta Solimene

COORDINATORE

Ch.ma Prof.ssa M.L. Cortesi

INDICE

1.	INTRODUZIONE	4
2.	L'ALLEVAMENTO OVINO IN ITALIA	14
2.1	Il Miglioramento Genetico	16
2.2	La riproduzione	24
2.3	Le produzioni: latte, carne, lana	28
3.	LA RAZZA OVINA LATICAUDA	33
3.1	Origini e diffusione	33
3.2	L'allevamento	34
3.3	Consistenza	37
3.4	Caratteristiche morfologiche	38
3.5	Caratteristiche riproduttive	41
3.6	Caratteristiche produttive	42
3.7	Selezione e Libro Genealogico	46
4.	LA RAZZA OVINA BAGNOLESE	49
4.1	Origini e diffusione	49
4.2	L'allevamento	50
4.3	Consistenza	51
4.4	Caratteristiche morfologiche	53
4.5	Le Caratteristiche riproduttive	55
4.6	Caratteristiche produttive	56
4.7	Il Registro Anagrafico	59
5.	GENI CHE REGOLANO LA FECONDITA'	60

5.1	BMPR – 1 B	61
5.2	BMP 15	64
5.3	GDF 9	66
5.4	Interazioni tra i geni BMP 15, GDF 9 e BMPR – 1B	68
5.5	Effetti delle mutazioni dei geni BMP 15, GDF 9 e BMPR – 1B sulla fecondità	70
6.	SCOPO DEL LAVORO	72
7.	MATERIALI E METODI	73
8.	RISULTATI E DISCUSSIONI	82
9.	CONCLUSIONI	96
10.	BIBLIOGRAFIA	103

1. INTRODUZIONE

La Biodiversità è stata definita dalla Commissione Europea Agricoltura come: “... la variabilità della vita e dei suoi processi includente tutte le forme di vita, dalla singola cellula agli organismi più complessi, a tutti i processi, a tutti i percorsi e ai cicli che collegano gli organismi viventi alle popolazioni, agli ecosistemi e ai paesaggi.” Per cui essa è un caratteristica intrinseca della vita stessa e come tale va rispettata e salvaguardata.

Come si è manifestata la Biodiversità negli organismi più evoluti nel corso dei secoli?

La risposta è quasi ovvia, attraverso la creazione delle diverse specie viventi e, nell’ambito della stessa specie, attraverso le diverse razze.

Nel Mondo esistono zone con caratteristiche molto diverse tra loro, ogni porzione ambientale delimitata e l’insieme degli organismi viventi presenti al suo interno che interagiscono fra loro e con l’ambiente che li circonda viene definita ecosistema.

In ogni ecosistema le varie specie viventi hanno sviluppato caratteristiche peculiari che ne hanno favorito la sopravvivenza. Essendo gli ecosistemi diversi fra loro, è di facile intuizione il fatto che anche le caratteristiche peculiari delle specie viventi presenti all’interno di ciascuno di esso sono notevolmente diverse. Tali caratteristiche si sono fissate nel genoma e sono trasmesse di generazione in generazione.

Il concetto di razza è stato introdotto dall’uomo che ha identificato i tratti distintivi di ognuna di esse, ha dato loro un nome ed è anche, successivamente, intervenuto per selezionare i soggetti che riteneva essere i

migliori per le proprie esigenze, ed in alcuni casi è stato l'uomo stesso a creare o distruggere delle razze animali. La loro creazione da parte dell'uomo è sempre stata un atto volontario, la loro distruzione, invece, quasi sempre, un atto involontario.

Nel corso dei secoli numerose razze animali sono scomparse per motivi molto vari, che vanno dalle modifiche ambientali, al diretto intervento dell'uomo (per es. la caccia indiscriminata), o al semplice cambiamento delle esigenze agricolo-tecnologiche (animali ritenuti non più rispondenti alle esigenze umane non vengono più allevati).

La scomparsa di queste razze ha rappresentato una notevole perdita sia da un punto di vista culturale che da un punto di vista economico, soprattutto se si considerano le specie di interesse zootecnico.

Mentre la perdita culturale è evidente, non può dirsi lo stesso per quella economica che va spiegata.

Lo sviluppo di una razza è strettamente legato al territorio in cui essa per così dire “nasce” e si evolve. Gli individui che sopravvivono sono sempre quelli che meglio si sono adattati all'ambiente in cui vivono e quindi sono anche i più capaci di sfruttarne le peculiari caratteristiche.

Grazie a questa capacità adattativa degli animali, si sono sviluppate razze in grado di vivere in situazioni ambientali anche particolarmente difficili e sfruttando tale caratteristica è stato possibile allevare con successo animali anche in zone dove scarseggiavano le risorse alimentari e le condizioni geofisiche del territorio erano particolarmente difficili.

Un altro aspetto da tener presente sia dal punto di vista culturale che economico è legato alle produzioni zootecniche, infatti nell'ambito della stessa specie a seconda della razza cambiano anche alcune caratteristiche delle produzioni, infatti si parla di razze con diverse attitudini, per esempio negli ovini e soprattutto nei bovini vi sono razze da carne, da latte, da lavoro, razze a duplice e triplice attitudine. Inoltre razze con la stessa attitudine presentano delle caratteristiche produttive diverse, l'esempio più immediato è il latte, che a seconda della razza presenta percentuali di proteine e grassi diverse, e differenti rese alla caseificazione.

Negli ultimi anni le evoluzioni avutesi in campo zootecnico ed i cambiamenti di orientamento del mercato hanno fatto sì che obiettivo principale dell'allevamento fosse l'ottenimento di produzioni in elevate quantità a discapito della loro qualità o del loro impatto ambientale. Altro aspetto che ha fortemente condizionato l'allevamento è la globalizzazione, che ha comportato la standardizzazione, anche dei prodotti alimentari, che presentano caratteristiche organolettiche sempre identiche, qualsiasi sia il luogo di provenienza o il periodo dell'anno di produzione, a cui i consumatori di oggi si sono necessariamente abituati.

Quest'orientamento, che ha per anni condizionato il mercato e comportato un appiattimento delle produzioni con incremento degli allevamenti di tipo intensivo e chiusura delle piccole realtà zootecniche locali, sta tuttavia cambiando soprattutto spinta dalla crescente richiesta da parte dei consumatori di prodotti nuovi e genuini, derivante a sua volta dalla diffusione

della cultura alimentare e dalla maggiore sensibilità delle nuove generazioni rispetto alle tematiche ambientali.

Tutto ciò ha portato alla riscoperta e valorizzazione delle razze "autoctone", ossia razze animali evolute in piccole realtà locali e capaci di produzioni estremamente uniche soprattutto se considerate dal punto di vista qualitativo. Tali razze hanno inoltre la capacità di sfruttare al meglio gli ambienti in cui si sono selezionate consentendo di ottenere produzioni zootecniche a costi contenuti in aree in cui altre razze della stessa specie non sarebbero in grado di farlo. L'importanza di tali razze ed il recupero delle piccole realtà zootecniche sono ad oggi temi portanti della politica europea e nazionale come dimostrato dai fondi che annualmente vengono messi a disposizione per i piani di sviluppo rurale.

In quest' ambito si inserisce il progetto "Valorizzazione delle Specie/Razze autoctone allevate in Campania e caratterizzazione delle loro produzioni tipiche", denominato RARECA.

Questo progetto è stato presentato nell'ambito del PSR Campania 2007-2013 Misura 214 - Pagamenti Agroambientali e "Allevamento delle specie animali locali in via di estinzione", dal Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti (DISCIZIA) dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, in collaborazione con l'Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo (CNR-ISPAAM) e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM), ed il responsabile scientifico è il prof. Vincenzo Peretti.

I tipi genetici autoctoni (TGA) che fanno parte del progetto sono: l'ovino Laticauda (Fig. 1), l'ovino Bagnolese (Fig. 2), il bovino Agerolese (Fig. 3), il cavallo Salernitano (Fig. 4), il cavallo Napoletano (Fig. 5), il cavallo Persano (Fig. 6), il suino casertano (Fig. 7), la capra Cilentana (Fig. 8).



Fig. 1. Pecore di razza Laticauda.



Fig. 2. Pecora di razza Bagnolese.



Fig. 3. Toro di razza Agerolese.



Fig. 4. Stallone di razza Salernitano.



Fig. 5. Stallone di razza Napoletano.



Fig. 6. Cavallo di razza Persano.



Fig. 7. Scrofa di razza Casertana.



Fig. 8. Capra di razza Cilentana, mantello grigio.

Le strategie di salvaguardia suggerite in questo progetto sono sostanzialmente due: in situ ed ex situ.

Nella primo caso, la razza resta allevata all'interno della specifica filiera zootecnica di origine, quindi nell'ambito del suo contesto storico, culturale e paesaggistico.

Le strategie ex situ prevedono la crioconservazione di materiale genetico sotto forma di gameti, embrioni ma anche di sequenze di DNA, mediante la realizzazione di una banca di risorsa genomica (Genome Resource Banking).

Le strategie applicate per far fronte a tutto ciò saranno:

a) massimizzazione della popolazione e minimizzazione della parentela fra i riproduttori, con lo scopo di aumentare da subito la consistenza numerica della razza in oggetto mediante l'utilizzo di biotecnologie della riproduzione e la selezione, ad ogni generazione, di riproduttori con ridotto coefficiente di consanguineità relativo;

b) individuazione, in termini oggettivi, delle caratteristiche di peculiarità dei TGA, del sistema di allevamento e qualificazione delle produzioni tipiche. Indispensabile appare realizzare analisi citogenetiche e della variabilità di geni che influenzano le caratteristiche quali-quantitative e sanitarie delle produzioni dei TGA. Risulta inoltre necessario adottare piani di razionamento adeguati ai reali fabbisogni nutritivi dei diversi TGA allo scopo di migliorarne il benessere animale e la capacità di caratterizzare le produzioni dal punto di vista qualitativo, a tal proposito verranno effettuate di analisi di tipo microbiologico, chimico, sensoriale e molecolare.

2. ALLEVAMENTO OVINO IN ITALIA

In quasi tutto il mondo gli ovini hanno avuto il compito di avviare lo sfruttamento estensivo dei pascoli meno ricchi. Inizialmente questi animali venivano allevati soprattutto per la produzione della lana e solo in termini secondari per la produzione della carne. In seguito, la produzione della carne ha assunto un ruolo molto importante e si è iniziato a selezionare gli animali destinati all'allevamento proprio in funzione di tale attitudine produttiva.

Nel bacino del Mediterraneo, tuttavia, diversamente dai paesi del Nord, si è preferito allevare razze piuttosto rustiche, particolarmente idonee a sopravvivere in ambienti poveri, che oltre ad essere sfruttate per la produzione della carne possono essere sfruttate anche per la produzione del latte.

In Italia attualmente il patrimonio ovino censito si aggira intorno ai sette milioni di capi e gli allevamenti sono prevalentemente a conduzione familiare. Il numero maggiore di capi lo detiene la Sardegna (3.444.024), seguita dalla Sicilia (797.413), Lazio (756.717) e Toscana (576.127); la Campania si attesta al settimo posto con 262.314 capi allevati (Tabella 1).

La razza ovina maggiormente diffusa nel nostro paese è la razza Sarda (354.484 capi), alla quale seguono la pecora della Valle del Belice (215.401 capi), la Comisana (51.058 capi), la Pinzirita (37.203 capi) e la Merinizzata Italiana (29.557 capi).

Tali razze sono allevate nel Centro – Sud e nelle isole; mentre nel Nord Italia la razza maggiormente rappresentata è la Bergamasca (13.838 capi), che ritroviamo anche in Centro Italia.

REGIONE	CONSISTENZA OVINI
SARDEGNA	3.444.024
SICILIA	797.413
LAZIO	756.717
TOSCANA	576.127
BASILICATA	379.138
ABRUZZO	336.167
CAMPANIA	262.314
CALABRIA	254.850
PUGLIA	237.756
MARCHE	182.451
UMBRIA	171.601
MOLISE	158.237
LOMBARDIA	91.284
EMILIA-ROMAGNA	89.095
PIEMONTE	86.471
TRENTINO-ALTO ADIGE	59.048
VENETO	30.336
LIGURIA	21.779
FRIULI- VENEZIA GIULIA	5.387
VALLE D'AOSTA	2.392

Tabella 1. Consistenza del patrimonio ovino italiano suddiviso per regione. (Fonte ISTAT, 2011).

Oltre le razze appena citate, sul territorio italiano ne vengono allevate numerose altre, in particolare vanno ricordate: la Tacola (8.155 capi), la Schwarz Braunes Bergschaf (7.279 capi), la Bagnolese (14.894 capi), la Fabrosana (5.459 capi), la Laticauda (3.850 capi), la Sambucana (3.767 capi), la Alpagota (3.531 capi), e la Gentile Di Puglia (3.288 capi).

In Italia i sistemi di allevamento sono : transumante e stanziale o semistanziale. L'allevamento transumante era molto diffuso in passato, ma a

seguito della riduzione delle aree disponibili e della manodopera e delle risposte produttive modeste, oggi si preferisce il sistema semistanziale o stanziale (Fig. 9), che permette un maggiore controllo delle condizioni sanitarie, dell'alimentazione e la parziale programmazione delle produzioni, importante soprattutto per quanto riguarda la carne, mediante la sincronizzazione degli estri.



Fig. 9. Allevamento stanziale.

2.1 Il Miglioramento Genetico

Il miglioramento genetico (MG) degli animali zootecnici è la tecnica che consente l'aumento delle prestazioni produttive e riproduttive degli allevamenti attraverso la stima del valore genetico e conseguente selezione dei riproduttori.

Può essere considerato una delle tecniche di produzione a disposizione dell'allevatore al pari dell'alimentazione, della mungitura, della riproduzione, dell'allevamento dei giovani e della stabulazione. Rispetto a queste, però il MG genera incrementi permanenti della produttività ed esula dagli stretti interessi aziendali coinvolgendo una parte, e a volte l'intero, patrimonio di una razza. Infatti i piani di MG di tutte le razze di interesse zootecnico in selezione sono gestiti dalle Commissioni Tecniche delle rispettive Associazioni Nazionali di specie o razza che hanno avuto la delega da parte del MiPAAF per la gestione dei Libri Genealogici.

Il MG in zootecnica si occupa quasi esclusivamente di caratteri di interesse economico quali la produzione di latte, il contenuto lipidico del latte, il ritmo di accrescimento nei giovani, l'indice di conversione alimentare, il numero di uova deposte, lo spessore del lardo dorsale nei suini, ecc.) che sono espressi in unità di misura e sono comunemente indicati come caratteri quantitativi.

I caratteri quantitativi sono poligenici quindi determinati geneticamente da un gran numero di loci poliallelici e secondo la teoria infinitesimale ciascun locus contribuisce per una piccola parte all'espressione genetica del carattere e la somma (non sempre algebrica) di tali azioni fornisce l'espressione complessiva.

Il MG dei caratteri di interesse zootecnico si compie in quattro fasi distinte:

a) *scelta degli obiettivi della selezione*: a livello operativo consiste nella definizione precisa e limitata dei caratteri sui quali concentrare gli sforzi del MG affinché il guadagno produttivo ottenibile nell'intera popolazione (in altri

termini il progresso genetico atteso dR) contribuisca all'aumento del reddito in maniera superiore, o al limite uguale, ai costi sostenuti per la sua realizzazione. E' importante accertarsi che il carattere selezionato abbia un buon prezzo di mercato oppure contribuisca significativamente all'aumento del fatturato aziendale; che gli incrementi ottenibili (dR) siano di una certa entità; e che gli schemi di miglioramento siano congrui con il contesto tecnico-culturale delle imprese a cui sono destinati.

b) *studio e descrizione della popolazione oggetto di selezione*: consiste nella descrizione sintetica della popolazione in selezione per il carattere scelto tenendo in considerazione i fenotipi, le parentele fra gli animali, la trasmissibilità di un carattere misurata dal coefficiente di ereditabilità (h^2) e l'entità con cui le misure ripetute di uno stesso animale si rassomigliano misurata dalla ripetibilità (r).

c) *valutazione genetica dei riproduttori*: consiste nella stima del valore genetico additivo (noto anche come valore riproduttivo VR o breeding value BV) dei genitori potenziali in base al quale saranno classificati in una scala di merito. La stima del VR è attuata con il calcolo di specifici indici genetici mediante metodi statistici a volte molto complessi e con schemi di selezione che variano in funzione delle informazioni fenotipiche utilizzate.

d) *scelta dei criteri del miglioramento*: consiste nella scelta dei programmi di selezione in relazione al progresso genetico atteso e dal suo costo. Può essere presa in considerazione anche la possibilità di ricorrere a tecniche alternative quali l'incrocio fra razze diverse o fra linee differenti della stessa razza oppure l'uso della consanguineità.

Strumento indispensabile per il MG è il Libro Genealogico che nella Legge 30/91 sulla riproduzione animale viene definito come un registro, tenuto da un'Associazione Nazionale di Allevatori dotata di personalità giuridica, o da un Ente di diritto Pubblico, in cui sono annotati gli animali riproduttori di una determinata razza con l'indicazione dei loro ascendenti e per i quali sono stati effettuati dei controlli sulle attitudini produttive. E' regolamentato da un disciplinare approvato dal MiPAAF.

I Libri Genealogici possono essere 'aperti' o 'chiusi'. In genere sono aperti all'atto della loro istituzione e consentono l'iscrizione di soggetti a genealogia ignota purché in possesso dei caratteri tipici della razza; successivamente diventano chiusi, ossia possono essere iscritti solo soggetti i cui antenati (almeno tre o cinque generazioni) sono già iscritti al LG.

La Legge 30/91 definisce anche il Registro Anagrafico, ossia un registro tenuto da un'Associazione Nazionale di Allevatori dotata di personalità giuridica o da un Ente di Diritto Pubblico in cui sono annotati gli animali riproduttori con l'indicazione dei loro ascendenti appartenenti a razze a limitata diffusione. Pertanto a differenza dei LG, i RA hanno lo scopo di preservare patrimoni genetici di elevato valore storico e culturale. Anch'essi sono regolamentati da Disciplinari e Norme Tecniche approvati dal MiPAAF.

L'associazione nazionale di specie che in Italia ha avuto incarico da parte del MiPAAF di occuparsi e di gestire tutte le azioni rivolte al miglioramento morfologico, genetico e funzionale delle razze ovine e caprine con LG è l'Associazione Nazionale della Pastorizia (ASSO.NA.PA), che dal 1 Gennaio

2000 gestisce direttamente anche i RA delle popolazioni ovine e caprine autoctone a limitata diffusione.

In Italia in relazione alle attitudini produttive le razze ovine regolamentate con LG (Tabella 2) sono distinte in razze da latte (Altamura, Comisana, Delle Langhe, Leccese, Massese, Pinzirita, Sarda e Valle del Belice) e razze da carne (Appenninica, Barbaresca Bergamasca, Biellese, Fabrianese, Laticauda, Gentile di Puglia, Merinizzata italiana e Sopravissana).

I programmi di selezione per queste razze prevedono l'indicizzazione dei soggetti iscritti al LG in base ai dati produttivi, morfologici e genealogici elaborati tramite procedure di tipo BLUP-Animal Model (single e multiple-trait) ed i test genetici adottati la raccolta delle informazioni necessarie all'elaborazione degli indici sono il *Progeny test* per le razze da latte ed il *Performance test* per le razze da carne.

Il metodo BLUP Animal Model, efficace ed ampiamente diffuso nelle associazioni zootecniche internazionali, è così definito perché sono valutati contemporaneamente tutti i riproduttori, arieti e pecore, tenendo in considerazione sia il valore genetico delle pecore con cui gli arieti saranno accoppiati che degli effetti della selezione.

Le stime genetiche ottenute sono un prodotto attendibile e costituiscono un punto di primaria importanza in tutti i programmi di selezione che prevedono di migliorare le caratteristiche lattifere della razza considerata.

Per il calcolo degli indici genetici si utilizzano gli archivi dei dati produttivi ed anagrafici che permettono di mettere in relazione le produzioni di animali parenti. L'elaborazione tiene conto delle diverse situazioni ambientali, che

hanno un loro effetto sul carattere da selezionare e stima il valore genetico degli animali considerando le somiglianze delle produzioni conseguenti alle parentele note tra gli animali.

I dati anagrafici sono rilevati dai tecnici delle Associazioni Provinciali e periodicamente inseriti nella Banca dati dell'Asso.Na.Pa.; le informazioni produttive sono invece inviate mensilmente all'Ufficio Centrale dei Controlli dell'AIA, per essere poi rese disponibili all'Asso.Na.Pa. per gli usi istituzionali.

Libro Genealogico	Registro Anagrafico	
Razza	Razza	
Altamura	Alpagota	Bagnolese
Appenninica	Bredegana	Brianzola
Barbaresca	Brigasca	Brogne
Bergamasca	Ciavenasca	Cornella Bianca
Biellese	Cornigliese (Corniglio)	Finarda
Comisana	Frabosana	Garessina
Delle Langhe	Garfagnina	Istriana
Merinizzata Italiana	Lamon	Marrana
Fabrianese	Matesina	Nostrana
Laticauda	Pecora Corteno	Plezzana
Massese	Pomarancina	Pusterese
Moscia Leccese	Zerasca	Rosset
Pinzirita	Saltasassi	Sambucana (Demontina)
Sarda	Savoiarda	Schwarz-Braunes
Valle del Belice	SciaraMosciaCalabrese	Tacola
Gentile di Puglia	Tiroler Bergschaf	Trimeticcia Segezia
Sopravissana	Varesina	Villnoesserschaf
	Vissana	Noticiana
	Vicentina (Foza)	Tiroler Steinschaf
	Schwarznasenschaf	Juraschaf
	Schnalserschaf	Pecora Nera di Arbus

Tabella 2. Razze ovine italiane regolamentate dal LG e dal RA.

Le operazioni di raccolta sul campo dei dati anagrafici e produttivi presenta un costo non indifferente per il sistema Allevatori italiano e gli Enti interessati che ne fanno parte sono messi nelle condizioni di potere svolgere tale attività grazie al contributo economico erogato dal MiPAAF.

L'importanza della tempestiva acquisizione e verifica dei dati è fondamentale per il programma di selezione in quanto il risultato finale dipende dalla corretta archiviazione delle informazioni provenienti dagli Uffici provinciali.

Per stimare il valore genetico dei candidati riproduttori è necessario disporre di informazioni relative alle performances provenienti dal candidato stesso, come nel caso del *Performance test*, o da individui in relazione di parentela diretta (figlie) con i candidati come nel caso del *Progeny test*.

A titolo di esempio si riporta lo schema di selezione adottato per la razza ovina delle Langhe, razza autoctona a duplice attitudine del basso Piemonte e dei territori limitrofi della Liguria. E' allevata prevalentemente nelle Langhe nelle province di Cuneo, Savona ed Asti con espansione in Emilia Romagna e nell'Italia centro-meridionale (province di Latina, Viterbo, Matera, Teramo, Foggia). Sono iscritti al LG 2.401 capi di cui 1.876 pecore e 233 arieti suddivisi per 95 aziende.

La selezione della razza ovina delle Langhe si propone la produzione di capi sani, fecondi e prolifici, di robusta costituzione, precoci, nei quali con la preminente attitudine alla produzione del latte si associ una altrettanto spiccata tendenza alla produzione di carne.

Lo schema di selezione adottato, ben articolato e di facile utilizzo, è organizzato nelle seguenti fasi:

1) individuazione in tutte le aziende del LG delle migliori fattrici da accoppiare con gli arieti miglioratori provenienti dal Centro ovini dell'APA di Savona dislocato a Cairo Montenotte (SV);

2) dopo i parti, scelta a cura di un tecnico incaricato dal Comitato di Razza, di circa 20 giovani agnelli maschi in base alle caratteristiche di razza ed ad un alto valore di indice pedigree; e trasferimento presso il Centro ovini dove saranno sottoposti a periodici controlli sanitari e di accrescimento;

3) al conseguimento della maturità sessuale gli arieti in prova e quelli miglioratori sono destinati alla monta naturale nelle aziende aderenti al programma;

4) ultimata la stagione riproduttiva gli arieti in prova di progenie e quelli miglioratori rientrano al Centro per essere destinati in altre aziende.

Quindi contemporaneamente nelle aziende iscritte al LG operano giovani arieti in prova di progenie ed arieti adulti già provati. La permanenza in attività degli arieti del Centro è regolata dal valore dell'indice genetico che ne prolunga o meno la loro funzione riproduttiva.

Gli arieti in prova di progenie e quelli miglioratori non sono di proprietà dell'allevatore ma vengono forniti dal Centro per uno o, più spesso, due anni con lo scopo di favorire la diffusione del patrimonio genetico in numerose aziende, inoltre, ruotando fra le greggi limitano gli effetti negativi della consanguineità ed incrementano le connessioni aziendali indispensabili per la stima degli indici genetici.

Il criterio di permanenza degli arieti al Centro è regolato dal valore dell'indice genetico evitando di avere troppi riproduttori provenienti da poche linee di sangue.

Gli arieti che non hanno confermato, con la periodica valutazione genetica, il proprio valore

sono eliminati dal servizio attivo e venduti come maschi aziendali in aziende fuori libro.

L'utilizzo degli indici genetici consente di individuare i soggetti candidati al ruolo di riproduttori ed inoltre il continuo utilizzo degli indici produce, generazione dopo generazione, un miglioramento genetico come risposta alla selezione svolta.

2.2 La Riproduzione

Il raggiungimento della maturità sessuale negli ovini presenta un'elevata variabilità in funzione dell'età e del peso degli animali, in generale le pecore la raggiungono intorno ai 6-7 mesi mentre gli arieti tra i 15 ed i 18 mesi, mentre per quanto riguarda il peso questo deve essere compreso tra il 40 ed il 70% del peso di un soggetto adulto.

Numerosi altri fattori possono però incidere, tra cui soprattutto la stagione di nascita e l'alimentazione, nonché la razza di appartenenza. Infatti, la pubertà risulta essere anticipata nelle razze particolarmente prolifiche, come la Romanov, nelle razze a prevalente attitudine lattifera e nei soggetti nati in autunno.

A partire dal raggiungimento della pubertà, nelle femmine l'ovulazione e, di conseguenza, il calore, si verificano in maniera ciclica durante la stagione riproduttiva con intervalli compresi tra i 14 ed i 19 giorni.

Il ciclo estrale delle pecore è diviso in fase luteinica, caratterizzata dalla presenza del corpo luteo, e fase follicolare, durante la quale si ha la maturazione del follicolo e l'ovulazione, che a loro volta vengono divise in:

- metaestro: caratterizzato dallo sviluppo del corpo luteo ed inizio della secrezione di progesterone (pecora 1°-4°gg);
- diestro: periodo di attività del corpo luteo, caratterizzato da una massiva produzione di progesterone (pecora 5°-13° gg);
- proestro: caratterizzato dalla regressione del corpo luteo, dalla crescita del follicolo e dalla produzione di estrogeni (pecora 14°-16°gg);
- estro: periodo della recettività sessuale, (determinata dagli alti tassi di estrogeni), durante il quale avviene l'ovulazione, determinata dal picco di LH, ed incomincia a formarsi il corpo luteo (durata 36 ore con ovulazione alla fine del calore dalla 24° alla 30° ora).

Durante la fase estrale si verifica l'accoppiamento, in questo periodo le pecore cercano l'ariete ed appaiono piuttosto agitate. La sua durata è solitamente compresa tra le 24 e le 36 ore, ma può presentare delle notevoli oscillazioni ed arrivare a durare 50 ore; nella razza Romanov può addirittura raggiungere le 70 ore, ciò potrebbe essere correlato al numero di follicoli ovarici che giungono a maturazione. Estri di durata più breve si osservano invece nelle agnelle che hanno appena raggiunto la pubertà od in situazioni stressanti.

Verso la fine dell'estro si verifica l'ovulazione, che viene stimolata anche dalla eventuale presenza dell'ariete. Negli ovini si è osservato che il periodo di maggiore funzionalità ovarica si ha in autunno in concomitanza con un fotoperiodo più corto. Durante tale periodo, la comparsa dell'estro post-parto e l'involuzione uterina risultano essere anticipate, ciò porta ad una riduzione del periodo inter-parto. Invece, in concomitanza dei fotoperiodi crescenti, quindi in primavera, si ha un rallentamento dell'attività ovarica, che risulta essere più marcato nei soggetti giovani ed in quelli in lattazione.

Al fine di ottenere la disponibilità di agnelli in età di macellazione nei periodi di maggiore richiesta gli animali possono essere sottoposti a stimolazioni ormonale a base di progesterone e prostaglandine. La via più efficace di somministrazione dei progestinici è quella vaginale, altrimenti molto valida è anche la via sottocutanea, mediante impianti a lento rilascio, i quali vanno lasciati in sede per circa 14 gg, al termine dei quali si effettua la somministrazione di prostaglandine per via intramuscolare, dopo circa 24-48 h da questa si manifesterà l'estro.

Prima della stagione di monta è necessario favorire il recupero delle condizioni di peso e delle riserve organiche perse durante la precedente gravidanza; in tale fase risulta utile una forzatura alimentare transitoria (flushing) di 3 – 4 settimane che può determinare un aumento del tasso di ovulazione e quindi della prolificità.

L'età al primo accoppiamento varia in base alla razza ed al sistema di allevamento, nelle razze da latte sottoposte ad allevamento intensivo le agnelle vengono destinate alla riproduzione intorno agli 8 mesi, purchè

abbiano superato il 60-65% del peso adulto, mentre nelle razze da carne l'accoppiamento si ha intorno all'anno di età sempre che l'animale abbia raggiunto uno sviluppo corporeo sufficiente, altrimenti si rinvia fino ai 15- 18 mesi.

Gli accoppiamenti in genere si verificano in due diversi periodi, in concomitanza con la stagione primaverile, tra aprile e maggio, ed in concomitanza con la stagione autunnale, tra novembre e dicembre; nel primo caso i parti si concentreranno tra ottobre e novembre, nel secondo tra febbraio e aprile. Gli accoppiamenti tra aprile e maggio, mesi in cui abbiamo un fotoperiodo crescente, vanno contro la stagionalità degli animali, per cui per tali monte si utilizzano le primipare, che presentano una minore stagionalità, e le pecore vuote previa induzione ormonale. Inoltre si inseriscono nei gruppo numerosi maschi giovani, in modo che il rapporto maschi/femmine sia di almeno 2/25. Gli accoppiamenti tra novembre e dicembre, invece, avvengono in un periodo più favorevole alla natura degli animali, ma vanno in ogni caso gestiti i calori e va garantita la monta, per cui in questi mesi sarà sufficiente un rapporto ariete\pecore più basso, pari ad 1 a 25.

La gravidanza nelle pecore dura circa 5 mesi, ma presenta una notevole variabilità, legata soprattutto all'età degli animali, alla razza ed al numero di feti, ed anche a fattori ambientali quali la temperatura e l'alimentazione.

2.3 Le Produzioni: Latte, Carne, Lana

Nella specie ovina la produzione del **latte** assume degli aspetti molto particolari, infatti a seconda del sistema di allevamento e dell'attitudine produttiva della razza allevata la mungitura può non essere praticata affatto, oppure iniziare in momenti diversi della lattazione. Possiamo infatti avere pecore destinate alla sola produzione di carne per cui la mungitura non avviene affatto, pecore che allattano l'agnello per 2-3 mesi e vengono munte solo nella fase finale della lattazione, pecore che allattano e contemporaneamente vengono munte, pecore munte subito dopo il parto.

Il latte ovino presenta una notevole variabilità quali-quantitativa nei diversi allevamenti, in funzione delle diverse razze, dell'età degli animali, dell'ordine di parto e delle condizioni di allevamento.

Non solo la composizione chimica del latte varia ma anche il numero di cellule somatiche e la carica microbica presenti. Mediamente il latte ovino è composto dall'81,73% di acqua, dal 7,09% di grasso, dal 5,75 % di proteine, dal 4,61% di lattosio e dallo 0,93 % di ceneri.

Il grasso è il componente che subisce le maggiori variazioni nel corso della lattazione: subito dopo il parto si pone su valori abbastanza alti, per poi scendere nel corso dei primi 50 - 60 giorni di lattazione, in rapporto inversamente proporzionale alla produzione. Con il procedere della lattazione il tenore di grasso tende ad aumentare in misura notevole, lo scarto tra i valori minimo e massimo può arrivare fino al 30%; inoltre il latte della mungitura serale è più ricco in grasso rispetto a quello del mattino (Ledda et al., 1992). Queste variazioni hanno ovviamente una notevole influenza sul

comportamento caseario del latte ed in particolare sul contenuto di grasso dei formaggi e sulle rese di caseificio.

Anche il contenuto di proteine è soggetto a variazioni nel corso della lattazione, ma in misura minore rispetto ai grassi. Le analisi effettuate dall'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia hanno verificato un valore medio complessivo per tutte le razze del 5,91% con percentuali comprese tra il 5,47% ed il 6,22% per la razza Sarda e tra il 5,25% ed il 6,23% per la Massese (Vecchi et al., 1994).

FORMAGGI CON MARCHIO D.O.P.	PRESIDI SLOW FOOD
Canestrato Pugliese	Canestrato di Castel del Monte
Fiore Sardo	Conciato Romano
Pecorino di Filiano	Caciofiore Campagna Romano
Pecorino Romano	Tome di Pecora Brigasca
Pecorino Sardo	Pecorino dei Monti Sibillini
Pecorino Siciliano	Tuma di Pecora delle Langhe
Pecorino Toscano	Fiore Sardo dei Pastori
Piacentinu Ennese	Pecorino di Osilo
Ricotta Romana	Maiorchino
Vastedda della valle del Belice	Vastedda della Valle del Belice
	Pecorino della Montagna Pistoiese

Tabella 3. Formaggi a base di latte ovino a marchio DOP e a presidio Slow Food.

Il latte non destinato agli agnelli viene usato per la caseificazione. In Italia abbiamo numerosi formaggi ottenuti da latte di pecora dalle ottime caratteristiche organolettiche, alcuni di questi sono stati riconosciuti come presidi Slow Food mentre altri hanno ottenuto il marchio D.O.P. (Tabella 3). Si può notare che si tratta nella maggior parte dei casi di formaggi prodotti nelle regioni centrali e meridionali della penisola italiana e nelle isole, che sono le zone di maggior diffusione dell' allevamento ovino. Sono tutti formaggi stagionati e dal gusto piuttosto deciso.

In Italia la **carne** ovina viene consumata in maniera notevolmente più contenuta rispetto ad altri tipi di carne, ed il suo consumo presenta dei picchi stagionali in concomitanza delle feste religiose della Pasqua e del Natale, da ciò deriva la necessità di avere le maggiori produzioni di agnelli da carne proprio in tali periodi.

Bisogna tuttavia segnalare che ultimamente, il consumo di carne ovina nel nostro paese sta aumentando, ciò probabilmente in seguito all'aumento dell'immigrazione dai paesi medio orientali dove tale tipo di carne viene consumata abitualmente in quantità nettamente superiori a quelle europee.

Diversamente da quanto evidenziabile nel resto d'Europa, dove si privilegia l'allevamento dell'agnellone pesante, in Italia le categorie merceologiche più diffuse sono:

- *agnello da latte*: la macellazione è prevista a 40-50 gg di età con un peso vivo di 8-12 Kg. Produzione molto apprezzata dai consumatori italiani, si ottiene lasciando gli agnelli con la madre per 4-5 settimane, in taluni casi è utilizzato anche il latte artificiale.

- *Agnello da latte pesante*: la macellazione è prevista intorno alla 6^a - 7^a settimana con un peso vivo compreso tra 13 e 17 Kg. Le caratteristiche qualitative della carcassa sono molto simili a quelle dell'agnello da latte leggero, unica differenza è un maggior contenuto in sostanza secca e grassi. Si ottiene preferibilmente dalle razze con bassa attitudine lattifera, nel caso delle razze a spiccata attitudine lattifera si ricorre all'allattamento artificiale.

- *Agnellone precoce o agnello bianco*: la macellazione è prevista ad un peso vivo compreso tra 20 e 30 Kg. Gli agnelli, generalmente maschi, sono alimentati con prodotti ad elevato contenuto energetico e macellati, relativamente precoce, ad un'età di 100-130 gg. Le razze ovine indicate per questo tipo di produzione sono la Bergamasca, la Biellese, la Barbaresca e la Laticauda, infatti notevoli sono le caratteristiche merceologiche in termini di maturità della carne.

- *Agnellone*: la macellazione è prevista a 180 gg di età ad peso vivo di oltre 30 Kg. E' è un tipo di produzione non molto frequente a causa dell'elevato tenore in grasso della carcassa. Può essere ottenuta con soggetti appartenenti alle razze Bergamasca, Barbaresca, Biellese e Laticauda.

Da sempre la **lana** è un prodotto molto importante ottenuto dall'allevamento ovino. Il vello ovino è costituito da fibre di cheratina, che possono essere in diversi tipi:

- 1) lana vera e propria: molto fine, con accrescimento continuo e priva di midollo;
- 2) pelo: meno fine, con canale midollare;
- 3) eterotipi : con caratteristiche intermedie;

4) giara: corta e grossa, con grande canale midollare.

Le lane adatte alla tessitura sono quelle costituite solo da filamenti del primo tipo mentre le lane da tappeti o da materassi hanno discrete percentuali anche di pelo e di eterotipi.

Nell'allevamento italiano la produzione della lana, attualmente non ha un grosso significato economico, l'industria tessile nostrana infatti preferisce approvvigionarsi da mercati esteri. Bisogna in ogni caso prestare una certa attenzione alle caratteristiche del vello, in quanto esso rappresenta una protezione dall'ambiente circostante.

La valutazione del vello si basa su:

- il colore: è preferito il bianco;
- l'estensione;
- la densità, l'omogeneità e l'assenza di giara;
- la finezza e la lunghezza;
- la resistenza.

3. LA RAZZA OVINA LATICAUDA

3.1 Origini e diffusione

Il nome della razza origina dalla sua caratteristica fenotipica più evidente: la coda. In latino "Latus" significa largo e "cauda" vuol dire coda, unendo i due termini abbiamo "coda larga", quindi la Laticauda può essere definita come pecora dalla coda larga. In effetti nella sua coda tende ad accumularsi grasso che funge da riserva alimentare nei periodi in cui il cibo scarseggia.

Le origini della razza vanno ricercate nella Barbaresca, una razza nord africana, e nella razza Appenninica locale. Secondo le ipotesi più accreditate sono stati i Borboni, ai tempi di Carlo III ad importare alcuni arieti africani di razza Berbera i quali poi sono stati incrociati con soggetti indigeni. I meticciami successivi eseguiti dagli allevatori locali, hanno contribuito a fissare le caratteristiche morfo-funzionali della razza (De Paolis P, 1954)..

Inizialmente questa razza veniva allevata esclusivamente nelle province di Avellino e Benevento, dove ancora oggi abbiamo il maggior numero di capi per la produzione della carne; tuttavia col tempo si è diffusa anche nelle altre province campane, nella provincia di Foggia e nel centro Italia. Attualmente viene allevata anche nel Nord Italia non solo per la produzione di carne ma anche per la produzione del latte e viene utilizzata come razza miglioratrice per alcuni caratteri quali l'incremento ponderale e la rusticità.

3.2 L'allevamento

Originariamente gli allevamenti di pecora Laticauda erano di piccole dimensioni, 5-10 capi, a conduzione familiare, e come per altre razze in altre regioni, era diffusa la transumanza.

Attualmente, invece, gli allevamenti sono di tipo stanziale, essendo infatti questa una razza che ben si adatta anche a questa tipologia di allevamento, a patto però che non si elimini del tutto il pascolo (Fig. 10).

Subito dopo la nascita gli agnelli vengono lasciati con le madri per circa 48-60 ore, affinché assumano il colostro, indispensabile per la protezione immunitaria degli agnelli nei primi giorni di vita. Successivamente gli agnelli vengono allontanati dalle madri e nutriti con latte ricostituito, questo in quanto il latte ovino viene venduto ai caseifici con un buon ritorno economico per l'allevatore, in quanto si tratta di un latte dalle ottime caratteristiche merceologiche. Inoltre deve essere a disposizione del buon fieno di medica o polifita e del mangime prestarter cosicché gli agnelli stimolati dalla curiosità assumono, sin dalle prime settimane di vita, piccole quantità di alimento solido favorendo lo sviluppo precoce dei prestomaci.

Dopo il primo mese di vita si passa al razionamento del latte per indurre una maggiore assunzione di alimenti solidi.

Lo svezzamento può essere effettuato ad età differenti a seconda delle esigenze dell'azienda e della recettività dei soggetti. Spesso lo svezzamento degli agnelli di Laticauda viene eseguito a 60 gg di età per garantire loro uno sviluppo più armonico e per evitare cali eccessivi di peso dovuti allo stress del cambio di alimentazione.

E' possibile effettuare anche uno svezzamento precocissimo, a circa 5-7 settimane di vita purché gli agnelli abbiano raddoppiato il loro peso alla nascita, siano in grado di alimentarsi con alimenti solidi e consumino almeno 200-250 gr al giorno di concentrato, che assicura un corretto apporto di energia anche in assenza di latte.

Se l'allevamento è a stabulazione fissa, è di rigore suddividere gli agnelli per gruppi omogenei di età e peso.

Dopo lo svezzamento l'allevatore decide quali agnelli destinare alla rimonta interna, quali vendere per rimonta ad altri allevamenti e quali allevare per macello.

Alla rimonta interna saranno destinati gli agnelli nati da parti plurimi, ad alta genealogia e con incrementi ponderali elevati, e per quanto riguarda le femmine saranno considerate le produzioni degli ascendenti.

Le agnelle, destinate alla rimonta, dopo lo svezzamento vengono suddivise in gruppi omogenei di 20 soggetti e allevate fino all'età di 6-7 mesi. Quando la maggior parte dei soggetti del gruppo ha raggiunto la maturità sessuale e somatica, è inserito un solo ariete, in modo da sapere con certezza la paternità dei nascituri.

Le femmine gravide, 45-60 giorni prima della data prevista per il parto, vengono trasferite in un box a parte ed alimentate con la razione da lattazione.

Dopo il parto e l'allontanamento degli agnelli, le pecore sono trasferite nel settore lattazione dove resteranno per circa 120 gg.

Nella Laticauda la durata della lattazione non è uniforme in quanto sino ad oggi la selezione è stata rivolta esclusivamente al miglioramento della produzione carne. Si attesta intorno ai 4 mesi e la produzione di latte media per capo per lattazione è di circa 100 kg, mentre la produzione media giornaliera è di 800 gr.

Per quanto riguarda invece i soggetti destinati alla macellazione, questi dopo l'allontanamento dalle madri e l'allattamento con latte ricostituito, vengono alimentati con foraggi, freschi o secchi, e concentrati disponibili in azienda.

A 90 gg, età di macellazione, i maschi raggiungono in media i 28,5 kg mentre le femmine circa 23,5 kg, nel caso di parti singoli; nei parti gemellari, i maschi raggiungono circa 24 kg e le femmine 21,5 kg.



Fig. 10. Gregge ovino di razza Laticauda

3.3 Consistenza

Gli allevamenti di Laticauda sono concentrati da sempre nelle province di Benevento (47) con 2.023 capi e Avellino (29) con 984 capi, anche se un discreto numero si trova nella provincia di Caserta (103) con 742 capi (Tabella 4).

Attualmente la popolazione registrata nel LG ammonta a 3.850 esemplari di cui 3.022 pecore e 236 arieti.

PROVINCIA	Arieti n	Pecore n	Totale n	Aziende n
AVELLINO	50	934	984	29
BENEVENTO	101	1.922	2.023	47
CASERTA	225	517	742	7
COSENZA	2	0	2	1
FOGGIA	1	10	11	1
MATERA	11	71	82	3
NAPOLI	1	5	6	1
TOTALE	391	3.459	3.850	89

Tabella 4. Consistenze Provinciali della razza Laticauda (Asso.Na.Pa, 2012).

Nel corso degli ultimi 10 anni la popolazione è progressivamente aumentata passando da 1.039 capi nel 2002 ai 2.253 nel 2006; vi è stato un considerevole incremento nel 2007 in cui sono stati registrati al LG 5.908 capi, e poi una riduzione a 3.133 capi nel 2008. Negli ultimi quattro anni la popolazione ovina Laticauda è rimasta pressoché costante (Grafico 1).

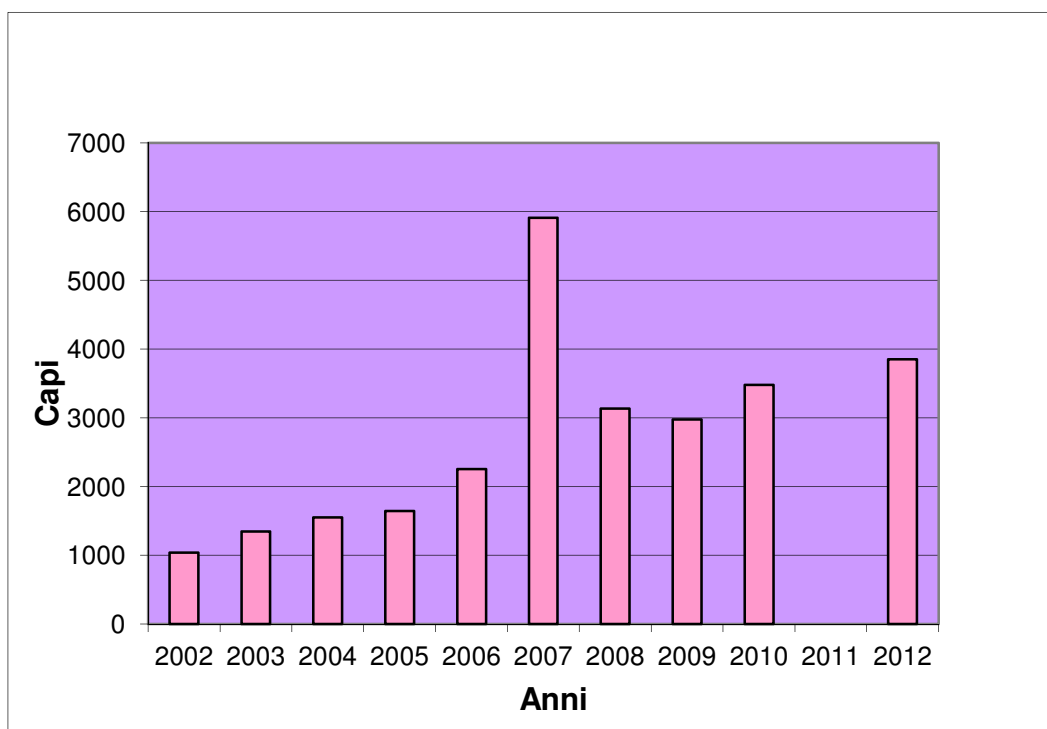


Grafico 1: Andamento della popolazione ovina di razza Laticauda nel periodo 2002-2012. (Asso.Na.Pa, 2012).

3.4 Caratteristiche morfologiche

In base allo standard di razza la pecora Laticauda (Fig. 11) presenta le seguenti caratteristiche morfologiche:

Taglia: grande.

Testa: pesante, a profilo montonino, più accentuato nel maschio che nella femmina, a corne, con presenza di cercine calloso nel maschio. Orecchie grandi e portate lateralmente in basso.

Collo: lungo e robusto nel maschio, lungo più sottile nella femmina.

Tronco: lungo e largo.

Garrese: tendente al tagliante nel maschio, meno nella femmina.

Torace: alto, profondo, con costole arcuate in entrambi i sessi.

Linea dorso-lombare rettilinea.

Groppa: larga e generalmente spiovente.

Arti: solidi e lunghi nel maschio, esili e lunghi nella femmina.

Vello: bianco, poco serrato, costituito da bioccoli prismatici, con presenza di pelo canino, ricopre completamente il tronco ad esclusione della faccia ventrale del tronco, della regione inferiore del collo, della fronte, delle guance, degli arti anteriori fino al ginocchio e posteriori fino al garretto.

Assenza di pliche cutanee.

Pelle e pigmentazione: sottile, rosea. Lingua, palato ed aperture naturali generalmente sprovviste di pigmentazione. Frequente presenza di piccole macchie nere, marrone o rosse alle palpebre, al musello, alle orecchie e agli arti.

Inoltre nel Disciplinare sono riportati i caratteri biometrici specifici della razza, riferiti ai soggetti di 18 mesi ed adulti di entrambi i sessi (Tabella 4) .



Fig. 11. Pecore ed agnelli di razza Laticauda

Parametri (cm)	A 18 mesi		Adulti	
	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine
	Media \pm ds	Media \pm ds	Media \pm ds	Media \pm ds
h al garrese	77 \pm 7,3	69 \pm 5,2	82 \pm 3,4	71 \pm 4,4
h alla groppa	79 \pm 6,5	72 \pm 5,3	84 \pm 3,3	74 \pm 4,4
h toracica	32 \pm 7,4	29 \pm 7,6	37 \pm 4,9	32 \pm 5,7
Larg. groppa	22 \pm 6,3	20 \pm 8,3	24 \pm 7,8	22 \pm 8,8
Lungh. tronco	77 \pm 6,5	68 \pm 5,0	83 \pm 4,6	71 \pm 5,0
Circ. torace	92 \pm 9,7	84 \pm 7,2	102 \pm 6,1	92 \pm 6,1
Peso (kg)	81 \pm 14,1	62 \pm 15,8	95 \pm 15,7	69 \pm 16,9

Tabella 5. Principali parametri biometrici della razza ovina Laticauda.

3.5 Caratteristiche riproduttive

La Laticauda è una razza di elevata fertilità, questa infatti, calcolata come rapporto percentuale tra il numero delle pecore che hanno partorito e quello delle femmine avviate alla monta, è pari al 97% mentre nelle razze ovine Italiane risulta essere mediamente pari al 90%.

La prolificità, invece, è il rapporto percentuale tra il numero di agnelli nati e il numero di pecore che hanno partorito e può variare molto in relazione a fattori genetici, quali razza e tipo genetico, ed ambientali come l'alimentazione e i trattamenti ormonali che portano alla superovulazione. Questo valore, è alto per le razze da carne o a duplice attitudine (carne e latte), nei soggetti alimentati con una maggiore quantità di U.F.L. (Unità Foraggiere Latte) e nei soggetti trattati con prostaglandine per indurre la superovulazione. Il valore medio riscontrato nella Laticauda è del 180%, in questa razza infatti risultano essere molto frequenti i parti gemellari, e si riscontrano anche un certo numero di parti trigemini e quadrigemini (Solimene et al., 2001).

La prolificità e la fertilità possono essere riassunte con un solo parametro che è la fecondità annua. Questo parametro corrisponde al numero di agnelli nati per ogni stagione di monta da 100 pecore che hanno partorito. La Laticauda ha una fecondità annua media del 175%.

3.6 Caratteristiche produttive

La pecora Laticauda viene allevata soprattutto per la produzione della carne, anche se non sono da sottovalutate le altre produzioni (Matassino e Zullo, 1991).

Alla nascita gli agnelli maschi hanno in media un peso di 5 o 3,8 Kg, rispettivamente in caso di parti singoli o gemellari, mentre le femmine hanno in media un peso di 4 o 3,4 Kg, rispettivamente in caso di parti singoli o gemellari (Tabella 6).

SESSO	PARTO	PESO				
		alla nascita (kg)	a 45 gg (kg)	a 90 gg (kg)	a 6 mesi (kg)	ad 1 anno (kg)
Maschi	Singolo	5,0	18	28,5	45	70
	Gemellare	3,8	15	23,5	42	68
Femmine	Singolo	4,0	15,5	24	37	55
	Gemellare	3,4	13,5	21,5	35	53

Tabella 6. Pesi agnelli nati da parti singoli e da parti gemellari a diverse età

La spiccata attitudine alla produzione di carne si evidenzia dai pesi medi degli agnelli durante l'accrescimento (Tabella 6) e dal confronto con i pesi medi degli agnelli maschi con le altre razze ovine da carne (Tabella 7). Infatti come si evince dai dati riportati in Tabella, gli agnelli maschi di Laticauda nati sia da parti singoli che gemellari, fanno registrare pesi quasi equivalenti a quelli delle razze ovine di taglia molto grande quali la Barbaresca, Biellese e Bergamasca.

Per quanto riguarda la carne vanno per prima cosa citate alcune particolari caratteristiche nutrizionali, in primo luogo il ridotto contenuto in colesterolo e poi anche i ridotti contenuti in acido capronico e caprilico, che sono i responsabili del tipico sapore della carne ovina, che può farla risultare poco appetibile. Per questo motivo la carne della Laticauda risulta gradevole anche a coloro i quali non sono abituati a consumare carni ovine.

RAZZA	PESO MEDIO AGNELLO MASCHIO			
	Alla nascita		A 45 gg	
	parto singolo Kg	parto gemellare Kg	parto singolo Kg	parto gemellare Kg
Appenninica	4,3	3,2	14,7	13,8
Barbaresca	5,1	3,8	16,5	12,4
Bergamasca	4,5	3,5	17	15
Biellese	5	4	17,5	15
Fabrianese	5,5	4,5	14	13,5
Gentile di Puglia	3,9	2,9	14	13
Laticauda	5	3,8	18	15
Merinizzata Italiana	4,4	3,6	16,1	15,5
Sopravissana	4	3,2	14,9	14

Tabella 7. Pesi medi degli agnelli maschi delle principali razze da carne

In ogni caso, le principali caratteristiche delle carni dell'agnello di Laticauda posso essere riassunte come segue:

Caratteristiche chimiche:

- sostanza secca: non inferiore al 25% ;
- protidi: non inferiori al 18% ;

- lipidi: tra il 3-6 %.

Caratteristiche fisiche:

- calo frigo: non superiore al 18%;
- tenerezza sul cotto: non superiore a 6 per Kg/cm²;
- pH: 5,2-5,8 rilevato dopo refrigerazione.

La Laticauda pur non essendo una razza da latte è in grado di produrre circa 120–140 litri di latte per lattazione.

Recentemente sono stati avviati progetti per la valorizzazione della produzione latte, non tanto per l'uso diretto nell'alimentazione umana, quanto per la trasformazione in formaggio stagionato, il *Pecorino di Laticauda* (Fig. 12), ciò in virtù dell'elevata attitudine del suo latte alla caseificazione. Questo formaggio è noto da tempo antichissimo, alla fine del XIV secolo erano celebri nella tradizione locale dei comuni del Fortore (BN) i pecorini di Laticauda, la cui bontà era dovuta, così come ancora oggi, alle erbe spontanee dei pascoli montani tra queste soprattutto al trifoglio ladino. Il pecorino di Laticauda viene prodotto con il latte fresco appena munto, o proveniente dalla mungitura precedente, il quale viene filtrato e posto in caldaia per essere riscaldato fino ad una temperatura di 35/40 gradi, quindi si introduce il caglio di agnello di Laticauda. In seguito alla rottura della cagliata, si formano dei piccoli grumi che asportati manualmente, si depongono nelle fascere; il prodotto così ottenuto viene pressato con le dita, fino ad ottenere una massa compatta. Il formaggio viene quindi messo in salamoia e commercializzato dopo una stagionatura variabile in relazione alla tipologia: il fresco è commercializzato dopo 2 gg, il semistagionato dopo 2 mesi, e lo

stagionato dopo minimo 4 mesi. Durante la fase di stagionatura la forma viene lavata con siero bollente e con acqua di pozzo. Quando il formaggio è maturo e comincia a "sudare", cioè emette qualche goccia di liquido, viene unto con olio extra vergine di oliva.

Il pecorino di Laticauda si presenta di tipica forma cilindrica, con pezzature che vanno da 300 gr per il formaggio fresco fino a circa 5.5 kg per il formaggio stagionato.

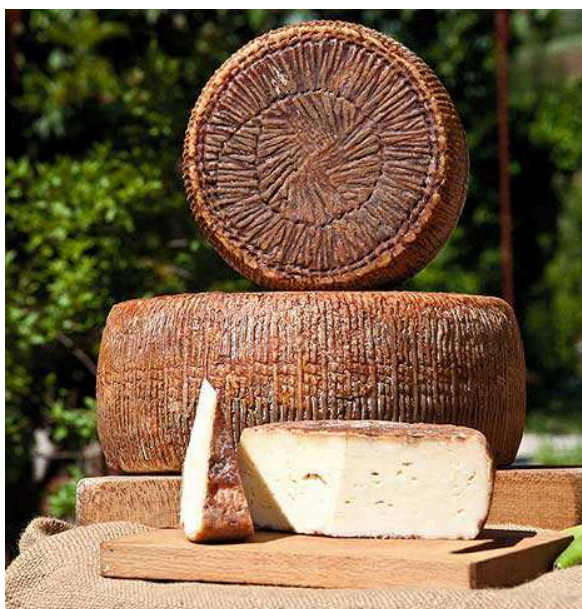


Fig. 12. Pecorino di Laticauda.

Al termine della stagionatura, la cui durata oscilla tra i 4 ed i dodici mesi, il prodotto presenta una crosta dura e compatta, di colore giallo arancio, al taglio la consistenza risulta dura, a tratti farinosa, non aderente allo strumento di taglio, con grana fine e frattura a scaglie, priva di cavità interne ed imperfezioni. Il colore varia dal giallo paglierino al giallo brillante, in

relazione al tenore di grassi. Di odore gradevole ed intenso che ricorda il latte pecorino; il sapore è leggermente piccante.

Infine abbiamo la produzione di lana che è sicuramente secondaria rispetto alle attitudini precedenti ma non certo trascurabile per il valore, seppur modesto, che può avere nella P.L.V. (Produzione Lorda Vendibile) di un allevamento ovino. La produzione media in sucido è per gli arieti di 3 kg e per le femmine di 2,8 Kg.

3.7 Selezione e Libro Genealogico

Sebbene la Laticauda sia una razza a duplice attitudine e nonostante sia famoso e apprezzato il suo Pecorino, gli obiettivi della selezione oggi sono volti a migliorare prevalentemente l'attitudine alla produzione di carne.

Gli strumenti tecnici impiegati per raggiungere tali finalità puntano sull'individuazione degli arieti miglioratori attraverso il controllo della discendenza e la valutazione morfo-funzionale, sulla diffusione della fecondazione artificiale, sul monitoraggio della fertilità e della prolificità al fine di selezionare soggetti che nella loro carriera hanno avuto in prevalenza parti gemellari.

Strumento indispensabile per la selezione, come precedentemente detto, è il LG che per il Tipo Genetico Ovino Laticauda è stato istituito con il DM 11 maggio 1981. Esso si divide in tre sezioni: Registro Genealogico Giovane Bestiame, Registro Genealogico degli Arieti, Registro Genealogico delle Pecore.

Ovviamente ciascuna sezione ha dei requisiti di iscrizione differenti, in particolare:

a) al *Registro Genealogico Giovane Bestiame* sono iscritti:

1) *Agnelli* maschi e femmine nati in allevamenti iscritti al LG e discendenti da:

- padre iscritto al Registro Genealogico degli Arieti;
- madre iscritti al Registro Genealogico delle Pecore.

2) *Agnelle* femmine nate negli allevamenti in attesa di iscrizione al Libro Genealogico e figlie di:

- padre iscritto al Registro Genealogico degli Arieti;
- madre proveniente dalla produzione ordinaria e iscritta al Registro Genealogico Pecore.

b) Al *Registro Genealogico degli Arieti* sono iscritti soggetti maschi adulti con le seguenti caratteristiche:

- Provenienza dal Registro Genealogico del Giovane Bestiame;
- Età minima di 10 mesi;
- Valutazione somatica di almeno 80 punti;
- Peso al momento dell'iscrizione pari almeno a quello minimo previsto dagli standard di razza.

c) Al *Registro Genealogico delle Pecore* sono iscritti soggetti femmine adulte con le seguenti caratteristiche:

- Provenienza dal Registro Genealogico del Giovane Bestiame;
- Almeno un parto;
- Valutazione somatica di almeno 60 punti;

- Peso minimo al momento dell'iscrizione pari almeno al peso minimo dello standard di razza.

Tuttavia al *Registro Genealogico delle Pecore* possono essere iscritte pecore con ascendenza sconosciuta purchè abbiano tutti gli altri requisiti citati sopra ed un punteggio alla valutazione somatica pari a 70.

4. LA RAZZA OVINA BAGNOLESE

4.1 Origini e diffusione

Con molta probabilità gli ovini appartenenti al tipo genetico Bagnolese derivano dagli ovini di razza Barbaresca; tale ipotesi è dovuta alle particolari caratteristiche somatiche che tale tipo genetico presenta.

Il nome della razza è strettamente legato all'area in cui essa è maggiormente presente: il comune di Bagnoli Irpino (AV) (Fig. 13).

L'area di diffusione interessa principalmente i monti Piacentini, gli Alburni, il Vallo di Diano, la Piana del Sele ed in maniera notevolmente inferiore le pianure del Casertano e le colline di Benevento.



Fig. 13. Il comune di Bagnoli Irpino.

4.2 L'allevamento

Gli allevamenti di Bagnolese (Fig. 14) sono di piccole o medie dimensioni (50-300 capi) ed in genere al loro interno si trovano anche ovini appartenenti ad altri tipi genetici, ciò inevitabilmente ha comportato un alto grado di meticciamiento.

In passato il sistema di allevamento maggiormente diffuso era quello pastorale basato sulla grande transumanza fra i monti Picentini e la Valle del Sele. Le pecore da ottobre a maggio vivevano in pianura e da giugno a settembre beneficiavano dei pascoli di montagna.



Fig. 14. Allevamento ovino di razza Bagnolese

Attualmente, soprattutto nel Salernitano, si sta diffondendo la pratica del sistema stanziale brado caratterizzato dall'uso del pascolo integrato con l'alimentazione nei ricoveri. Nei periodi di forti avversità atmosferiche o quando sono necessari particolari accorgimenti alimentari, si preferisce il ricovero degli animali nell'ovile, mentre dalla primavera fino ad autunno

inoltrato sono sfruttati i pascoli disponibili (naturali o artificiali). Tale pratica consente un razionale utilizzo dei pascoli per quasi tutto l'anno.

4.3 Consistenza

Attualmente la popolazione ovina di razza Bagnolese conta 14.984 capi (Tabella 8) , di cui 14.313 pecore e 581 arieti, distribuiti in 144 aziende che sono concentrate esclusivamente nelle province campane di Avellino (5.266), Salerno (5.121) e Benevento (4.505).

PROVINCIA	Arieti n	Pecore n	Totale n	Aziende n
AVELLINO	180	5.086	5.266	45
BENEVENTO	141	4.364	4.505	35
SALERNO	260	4.861	5.121	63
PALERMO	0	2	2	1
TOTALE	581	14.313	14.894	144

Tabella 8 : Consistenze Provinciali della razza ovina Bagnolese (Asso.Na.Pa, 2012).

Con il D.M. n. 21251 del 28 marzo 1997, il Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali inserì la Bagnolese tra le razze ovine ammesse al Registro Anagrafico (RA) che dal 2002 viene gestito dall'Asso.Na.Pa.

Valutando i dati ufficiali del RA, è interessante osservare che dal 2002 al 2007 erano iscritti solo 148 capi distribuiti in 4 aziende nella provincia di Salerno; solo dal 2008 si registrano, rispettivamente, nella provincia di Avellino e Benevento 10 e 7 aziende con un numero totale di capi di 835 e 1.061. Questi valori negli anni a seguire sono progressivamente aumentati in

concomitanza degli incentivi stanziati dalla Regione Campania attraverso il PSR (Tabella 9 e 10).

ANNO	AVELLINO	BENEVENTO	PALERMO	SALERNO	TOTALE
2002	-	-	-	148	148
2003	-	-	-	148	148
2004	-	-	-	148	148
2005	-	-	-	148	148
2006	-	-	-	148	148
2007	-	-	-	148	148
2008	835	1.061	-	1.973	3.939
2009	4.524	1.654	1	2.043	8.222
2010	4.861	2.644	1	4.744	12.250
2011	-	-	-	-	-
2012	5.266	4.505	2	5.121	14.894

Tabella 9. Consistenza della popolazione ovina Bagnolese dal 2002 al 2012 (Asso.Na.Pa., 2012).

ANNO	AVELLINO	BENEVENTO	PALERMO	SALERNO	TOTALE
2002	-	-	-	4	4
2003	-	-	-	4	4
2004	-	-	-	4	4
2005	-	-	-	4	4
2006	-	-	-	4	4
2007	-	-	-	4	4
2008	10	7	-	19	36
2009	35	11	1	19	66
2010	41	21	1	54	117
2011	-	-	-	-	-
2012	45	35	1	63	144

Tabella 10. Numero di aziende iscritte al RA della razza ovina Bagnolese (Asso.Na.Pa., 2012).

4.4 Caratteristiche morfologiche

I requisiti richiesti dallo standard della razza ovina Bagnolese (Fig. 15) per l'iscrizione al RA prevedono le seguenti caratteristiche:

Taglia: medio-grande;

Testa: leggera con profilo montonino, più accentuato nel maschio; il maschio presenta spesso robuste corna avvolte a spirale e dirette dal basso verso l'alto all'infuori, le orecchie sono medio-grandi e vengono portate talvolta orizzontalmente;

Collo: robusto nel maschio, ben unito alla spalla e al garrese.

Dorso e lombi: larghi allungati e muscolosi.

Linea dorso-lombare : leggermente ascendente in senso antero-posteriore.

Arti: in appiombato, lunghi, robusti, asciutti, provvisti di unghioni grigio scuri e ben conformati.

Vello: di colore bianco, con boccoli conici. Ricopre completamente il tronco a esclusione della faccia ventrale, della regione inferiore del collo, della testa e degli arti; testa, collo ed estremità degli arti presentano delle picchettature nere tipiche che in alcuni soggetti, possono essere delle ampie macchie;

Pelle e pigmentazione: elastica e di colore e di colore rosa chiaro.

Nella Tabella 11 sono riportati i principali parametri biometrici della razza ovina Bagnolese a 18 mesi ed in soggetti adulti.

Parametri (cm)	A 18 mesi		Adulti	
	Maschi	Femmine	Maschi	Femmine
	Media \pm ds	Media \pm ds	Media \pm ds	Media \pm ds
h al garrese	69 \pm 4	62,3 \pm 5	73,1 \pm 4	64,6 \pm 5
h alla groppa	70 \pm 2	63,3 \pm 6	74,5 \pm 4	66,4 \pm 1
h toracica	33,7 \pm 5	29,8 \pm 7	36,6 \pm 5	32,1 \pm 4
Larg. groppa	22,7 \pm 7	19,8 \pm 10	24,1 \pm 4	22,3 \pm 7
Lungh. tronco	69 \pm 6	66,7 \pm 5	76,8 \pm 3	70,3 \pm 5
Circ. torace	89,3 \pm 6	82,5 \pm 3	99 \pm 3	90,9 \pm 5
Peso (kg)	68,3 \pm 6	49,7 \pm 9	80,3 \pm 5	58,3 \pm 7

Tabella 11. Principali parametri biometrici della razza ovina Bagnolese. (Asso.Na.Pa., 2012).



Fig. 15. Ovini Bagnolesi

4.5 Caratteristiche riproduttive

La pecora Bagnolese, come tutti gli ovini, presenta ciclo poliestrale stagionale a fotoperiodo decrescente, quindi il ciclo ovarico si riattiva al diminuire delle ore di luce.

La pratica più diffusa di riproduzione è la monta naturale libera, infatti gli arieti sono lasciati nel gregge con un rapporto 1:40-50 pecore se adulti, 1:15-25 pecore se giovani. Questo sistema di facile attuazione, consente di ottenere una buona fecondità, ma rende estremamente difficile identificare con certezza la paternità degli agnelli.

Le femmine raggiungono la pubertà a circa $\frac{3}{4}$ del peso finale atteso e l'età media al primo parto è di 13 mesi. I maschi invece raggiungono la maturità sessuale tra i 18 e i 20 mesi.

La Bagnolese presenta un'elevata fertilità, questa, infatti, si aggira intorno al 93%, valore leggermente più elevato delle altre razze ovine italiane, per le quali si ricorda essere pari al 90%.

La prolificità, invece, che solitamente risulta essere elevata nelle razze da carne o a duplice attitudine (carne e latte), nei soggetti alimentati con una maggiore quantità di U.F.L. (Unità Foraggiere Latte) e nei soggetti trattati con prostaglandine per indurre la superovulazione, ha un valore medio nella razza Bagnolese di circa il 170% (Zullo 2005). In questa razza infatti risultano essere molto frequenti i parti gemellari e si riscontrano anche un certo numero di parti trigemini.

La fecondità annua, intesa come il rapporto percentuale tra il numero di agnelli nati ed il numero di pecore inseminate è del 113% per le pecore che

partoriscono una volta all'anno e a 169% per le pecore che partoriscono tre volte in due anni.

4.6 Caratteristiche produttive

La razza ovina Bagnolese é una razza a duplice attitudine, carne e latte.

L'agnello viene venduto all'età di 35-40 gg ed ad un peso vivo di 12-14 Kg.

Le sue carni sono particolarmente apprezzate per la loro tenerezza e la loro delicatezza, tali caratteristiche sono dovute soprattutto al fatto che gli agnelli vengono, in genere, allevati quasi esclusivamente col latte materno.

Nella Tabella 12 sono riportati i pesi medi degli agnelli dalla nascita ad un anno di età.

SESSO	PARTO	PESO				
		alla nascita (kg)	a 45 gg (kg)	a 90 gg (kg)	a 6 mesi (kg)	ad 1 anno (kg)
Maschi	Singolo	6,3	21,1	32,8	46,9	70,5
	Gemellare	3,3	12,6	30,0	46,3	70,2
Femmine	Singolo	5,2	19	32,1	42,5	62,5
	Gemellare	2,8	11,5	29,1	40,7	68,8

Tabella 12. Pesi medi degli agnelli maschi e femmine dalla nascita ad 1 anno (Zullo, 2005).

La produzione media di latte calcolata su 180 giorni è di 110-130 kg compreso quello poppato dall'agnello, con un contenuto in grasso del 7-8% e di proteine del 6 %. La resa alla caseificazione è del 25%.

Un'indagine condotta da Orsillo N. (1996) su 413 pecore distribuite in 5 allevamenti, di cui 3 in provincia di Salerno e 2 in provincia di Avellino, ha evidenziato che le percentuali di grasso, proteine e sostanza secca aumentano con l'età dell'animale e quindi in funzione anche dell'ordine di parto. La percentuale media del grasso è stata di 7,81, quella delle proteine di 6,83, quella di lattosio di 4,70 e quella di sostanza secca di 19,12.

Anche il turno di mungitura è risultato essere piuttosto rilevante infatti il latte ottenuto dalla mungitura serale è risultato essere caratterizzato da una più elevata percentuale di grasso e di sostanza secca e da una minore percentuale di lattosio rispetto al latte ottenuto dalla mungitura mattutina. Oltre alla composizione nello stesso studio si è evidenziato che anche l'attitudine alla caseificazione aumenta con l'aumentare dell'età del soggetto; diminuisce la velocità di formazione del coagulo mentre la sua consistenza aumenta.

Dal latte di Bagnolese si ottiene un ottimo pecorino detto anche "casu'r pecora" (Fig. 16). Tradizionalmente viene prodotto sia come formaggio fresco che semistagionato o stagionato. Il pecorino fresco viene venduto per il consumo da tavola a 15 giorni dalla produzione e si presenta di forma cilindrica, colore bianco, crosta assente, pasta tenera con eventuale presenza di piccole occhiature uniformemente distribuite nel prodotto. All'olfatto e all'aroma è evidente la nota animale in cui è riconoscibile il latte di pecora, a cui seguono note di burro e sentori vegetali di fieno.

Il pecorino semistagionato, sottoposto ad una stagionatura di durata inferiore ai 6 mesi, ha forma cilindrica con crosta canestrata e di colore giallo, la pasta

è grassa e semidura e di colore giallo paglierino con eventuale presenza di qualche occhiatura uniformemente distribuita. L'aroma è leggermente piccante con sentori di animale e fieno inoltre si può percepire un arricchimento aromatico legato a sentori tostati di frutta secca come noce e noccia e note evolutive di brodo di carne.



Fig. 16. Pecorino di Bagnolese detto “casu'r pecora”.

Il pecorino destinato alla stagionatura di lungo termine (superiore ai 6 mesi) viene preparato in “pezze” di grosse dimensioni (3Kg) e si presenta di forma cilindrica e con crosta di colore giallo carico tendente al mattone, pasta dura e sapore molto piccante tanto da essere usato come prodotto grattugiato per la preparazione di gustosi piatti.

Il procedimento per la produzione del pecorino è legato a tecniche tradizionali: il latte di pecora bagnolese viene riscaldato a circa 37-40 gradi e coagulato con caglio di agnello prodotto artigianalmente. Dopo circa 30

minuti dall'aggiunta del caglio si rompe la cagliata in pezzi della dimensione di una nocciola e si toglie il siero per la produzione della ricotta, contemporaneamente la cagliata viene passata nei cesti di vimini, le "fuscelle", salata e lasciata stagionare.

Il pecorino, a seconda della durata della stagionatura può essere mangiato dopo qualche giorno, tal quale o arrostito, dopo 2-3 mesi accompagnandolo con frutta o miele, oppure dopo 5-6 mesi, quando sarà molto piccante, come formaggio da grattugia.

La produzione della lana è di modesta entità, la quantità media in sudicio prodotta è per gli arieti 3 Kg e per le pecore 1,8 Kg; la scarsa qualità ne consente l'uso per la realizzazione di oggetti per la casa (cuscini, materassi, piccola oggettistica decorativa) piuttosto che di capi di abbigliamento.

4.7 Il Registro Anagrafico

Sebbene le finalità del RA non prevedano l'attuazione di piani selettivi, attualmente l'orientamento degli allevatori è quello di esaltare l'attitudine alla produzione sia della carne che del latte. A tal fine si valutano gli indici riproduttivi (fertilità, prolificità, fecondità), e produttivi (qualità e quantità delle produzioni). In questa maniera i soggetti miglioratori vengono individuati e destinati alla monta ed in futuro potranno essere usati per eventuali piani di selezione.

5. GENI DELLA FECONDITÀ

I meccanismi che regolano la normale funzionalità ovarica sono abbastanza ben conosciuti, meno note sono invece le cause che determinano la quantità di follicoli che ad ogni ciclo estrale evolvono fino alla maturazione completa.

Nelle varie specie animali il numero di follicoli che giungono a maturazione è regolato in modo da assicurare contemporaneamente un tasso di fertilità ottimale e la massima sopravvivenza della progenie.

Secondo gli attuali modelli proposti per la selezione dei follicoli, l'ovulazione multipla è controllata sia dalla concentrazione di FSH in prossimità della selezione follicolare, sia da fattori intraovarici (Campbell et al., 1995; Baird and Campbell, 1998; McNatty et al., 1999).

Uno degli approcci utilizzati per comprendere i meccanismi alla base dei complessi sistemi di regolazione della follicologenesi è la ricerca delle mutazioni responsabili di fenotipi anomali. La specie ovina in tal senso ha rappresentato un modello molto utile per lo studio dell'accrescimento e della selezione dei follicoli destinati all'ovulazione. Molte razze presentano una o due ovulazioni ma c'è sempre una forte differenza tra i tassi di ovulazione di linee genetiche differenti appartenenti ad una stessa razza a causa del background genetico, dell'età e dell'ambiente di allevamento.

Un'importante passo avanti in tali studi fu fatto quando Piper e Bindon (1982) presentarono le prime prove a supporto dell'esistenza di un locus segregante e con effetto maggiore sul numero di nati per parto nel ceppo Boorola dell'Ovino di razza Merinos.

Successivamente la presenza di tale locus fu dimostrata anche nelle greggi New Zealand in cui presentava un effetto additivo sul tasso di ovulazione (Davis et al., 1982). Tali osservazioni hanno stimolato fortemente gli studi sui geni che influenzano il tasso di ovulazione in altre razze e linee genetiche ovine nonché in altre specie animali (Davis et al. 1991; Montgomery et al. 1994; Montgomery et al., 2001).

Gli studi effettuati dal 1980 ad oggi hanno dimostrato che numerosi geni controllano i processi di follicologenesi, talvolta si tratta di geni ad effetto maggiore la cui azione è evidenziabile dai dati produttivi e dallo studio delle parentele.

Tra i vari geni che influenzano le capacità riproduttive della specie ovina quelli a cui oggi è riconosciuto il maggior impatto economico sono: BMPR1B (Wilson et al., 2001; Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001); BMP15 (Hanrahan et al., 2004; Galloway et al., 2000); GDF9 (Hanrahan et al., 2004).

5.1 BMPR-1B

La proteina BMPR-1B rientra nella famiglia dei recettori transmembrana delle serina/treonina chinasi delle Bone Morphogenetic Protein (BMP) ed a livello ovarico viene espressa dalle cellule della granulosa, della teca e dagli oociti. A tale livello svolgono un'importante azione da recettore per vari fattori BMP, tra cui BMP 15; 2; 4; 6; 7 (Otsuka et al., 2000; Gilboa et al., 2000; Pierre et al., 2002; ten Dijke et al., 2003). I fattori BMP 2; 4; 6; 7 inibiscono la produzione del progesterone sia basale che indotta dall'FSH (Souza et al., 2002; Campbel et al., 2007; Feary et al., 2007;).

In ambito zootecnico ed in particolare nell'ambito dell'allevamento ovino il gene codificante per tale proteina ha una forte rilevanza economica.

La storia della scoperta del gene BMPR-1B, della sua variante FecB e delle sue funzioni è molto interessante e dimostra quanto utile possa essere la stretta collaborazione tra allevatori ed enti di ricerca. Il tutto partì da due allevatori australiani che notarono, nel loro gregge di pecore di razza Merinos, la presenza di un gruppo di soggetti con una maggiore prolificità. Queste infatti avevano frequentemente parti tri- e quadrigemini. Mediante una ricerca genealogica si accorsero che tali animali avevano come antenato comune una pecora che aveva sempre avuto parti trigemini. Tale linea di pecore fu chiamata Boorola Merinos, dal nome della località in cui erano allevati gli animali. Gli allevatori resero nota questa scoperta ai ricercatori del CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation), ossia l'ente nazionale della scienza in Australia, ad oggi uno degli istituti di ricerca più grandi e diversificati del mondo, e regalarono a tale ente un ariete appartenente alla linea Boorola Merinos. Nello stesso anno i ricercatori del CSIRO acquistarono e studiarono ben 12 agnelle tutte nate in parti tri- o quadrigemini. Da lì presero origine tutti gli studi che portarono alla scoperta dell'allele mutato FecB che era responsabile nei soggetti portatori di una maggiore prolificità (Souza et al. 2001; Walkden-Brown et al., 2009; Fogarty, 2009).

Studi successivi hanno dimostrato che la mutazione FecB è comparsa inizialmente nelle razze ovine asiatiche ed in particolare negli ovini di razza Garole in cui tale variante allelica si è poi fissata negli anni. Intorno al 1972 in

seguito all'importazione di ovini dall'Asia in Australia ed agli incroci con le razze del luogo, tra cui la Merinos, l'allele FecB è stato introdotto dando origine alla linea Boorola (Davi set al. , 2002; Davi set al., 2005).

Il gene BMPR1B nella specie ovina è localizzato sul cromosoma 6 e costituito da 12 esoni che codificano per l'omonima proteina (Lord et al., 1996) che tra le numerose altre funzioni controlla la sensibilità dei follicoli ovarici all'azione degli ormoni gonadotropinici influenzando il tasso di ovulazione (Heat et al., 1996). La sua variante mutata FecB indurrebbe la maturazione precoce di un maggior numero di follicoli antrali (Piper et al., 1985) che, sebbene raggiungano la fase ovulatoria con una dimensione ridotta, portano a poli-ovulazione (Mulsant et al., 2001), a differenza della mono-ovulazione di cui è responsabile l'allele wild-type, con conseguente aumento delle probabilità di avere parti tri e quadrigemini (McNatty et al., 1986).

La mutazione presente in FecB consiste in una transizione A →G localizzata al nucleotide 830 della sequenza dell'mRNA maturo (GenBank AF312016) che comporta la sostituzione all'amminoacido 249 della catena polipeptidica, corrispondente al dominio di segnalazione della Kinasi intracellulare, di una glutammina con una arginina (Wilson et al., 2001; Feary et al., 2007).

Ad oggi molti autori ritengono che introducendo l'allele FecB in una razza in cui non è presente, mediante l'incrocio con soggetti che ne sono portatori, l'effetto sulle capacità riproduttive sia elevato, si avrebbe infatti un aumento del tasso di ovulazione compreso tra 1.1 e 2.0 ed un numero di agnelli in più per parto da 0.5 fino a 1.3 (Walkden-Brown et al., 2009).

5.2 BMP 15

Il gene BMP 15 è localizzato sul cromosoma X e nell'uomo presenta due esoni ed un introne per una lunghezza totale di 5907 bp (Dube et al. , 1998); nella pecora la struttura del gene risulta essere la stessa e la sequenza codificante di 1179 nucleotidi risulta divisa in due esoni. Codifica per il precursore dell'omonima proteina *Bone morphogenetic protein 15*, del peso di 45055 Da e 393 amminoacidi. Il prodotto maturo è costituito da due proteine distinte: P16 (16KDa) e P17 (17KDa) (Juengel, 2004).

La BMP15 rientra nella superfamiglia dei *transforming growth factor-beta* (TGF β). Si ritiene che nella specie ovina tale famiglia sia coinvolta nei processi di maturazione degli oociti e di sviluppo dei follicoli (Juengel et al., 2002; Moore et al., 2005), è stato dimostrato infatti che difetti nel suo funzionamento sono causa di disgenesi ovarica di tipo 2 (<http://omim.org/entry/300510>) (Braw-Tal, 1993). Influisce sulla sensibilità delle cellule all'azione dell'LH, modula la steroidogenesi nelle cellule della granulosa. Nel ratto induce la sintesi di estradiolo e riduce la sensibilità all'FSH mediante la diminuzione dei recettori per lo stesso. Nel ratto e nell'uomo stimola la proliferazione delle cellule della granulosa. Nelle pecore aumenta il tasso di proliferazione delle cellule della granulosa e diminuisce la secrezione di progesterone, sia basale che indotto dall' FSH, da parte dei piccoli follicoli antrali(Moore e Shimasaki, 2003).

Nella specie ovina sono state identificate cinque mutazioni del gene codificante:

- Fec X^I : la timina corrispondente al nucleotide 896 del cDNA viene sostituita da un'adenina; ciò comporta una sostituzione non conservativa dell'amminoacido valina con acido aspartico nella posizione 299 della proteina immatura, corrispondente alla posizione 31 della proteina matura. Questa mutazione allo stato eterozigote aumenta il tasso di ovulazione di 0,8 ed incrementa il numero di follicoli antrali nelle ovaie e la loro sensibilità all'LH(Shackell et al., 1993). Allo stato omozigote invece determina sterilità (Davis et al., 1992), caratterizzata da ovaie poco sviluppate e follicoli con un solo strato di cellule della granulosa(Webb et al., 1998). Questa mutazione è stata evidenziata negli ovini di razza Romney nei quali si è visto essere associata ad aumento della fertilità negli eterozigoti e ad infertilità negli eterozigoti (Davis et al., 2001; Davis et al., 2006).
- Fec X^H: la citosina al nucleotide 871 della sequenza codificante viene sostituita da una timina con conseguente formazione di un codone di stop prematuro nella posizione 291 della catena aminoacidica immatura e 23 della proteina matura con perdita di funzionalità della stessa. Anche questa mutazione identificata per la prima volta nella razza Romney (Davis et al., 2001) allo stato eterozigote aumenta il tasso di ovulazione, mentre allo stato omozigote comporta ipofertilità.
- FecX^G: la citosina del nucleotide 718 viene sostituita con una timina, con formazione di un codone di stop prematuro in corrispondenza dell'amminoacido 239. Se il soggetto è omozigote per questa mutazione è sterile, i soggetti eterozigoti invece presentano un leggero aumento

della fertilità. Questa mutazione è stata evidenziata negli ovini di razza Belclare e Cambridge (Hanrahan et al., 2004).

- FecX^B: la guanina al nucleotide 1100 viene sostituita con la timina e nel corrispondente polipeptide codificato al posto della serina nella posizione 367, corrispondente alla posizione 99 della proteina matura, verrà inserita isoleucina. Gli omozigoti sono sterili, mentre gli eterozigoti mostrano un leggero aumento della fertilità. Questa mutazione è stata evidenziata nelle pecore Belclare (Hanrahan et al., 2004).
- FecX^L: la guanina viene sostituita con l'adenina sul nucleotide 1196 del cDNA, ciò porta la sostituzione della cisteina con la tirosina nella posizione 53 della proteina matura. Anche in questo caso gli omozigoti risultano sterili, mentre gli eterozigoti mostrano un leggero aumento di fertilità (Bodin et al., 2003). Questa mutazione è stata evidenziata nelle pecore Lacaune (Lecerf et al., 2002; Bodin, et al., 2007).

Fenomeno condiviso dalle cinque varianti alleliche identificate è che esse determinano sterilità e disgenesi ovarica nei soggetti omozigoti mentre aumentano la fertilità solo nei soggetti eterozigoti in cui uno degli alleli è wild type.

5.3 GDF9

La proteina GDF9 (*growth differentiation factor 9*) nel topo è risultata essere un forte stimolante della proliferazione delle cellule della granulosa (Laitinen et al., 1998; Hayashi et al., 1999). Inibisce l'espressione di KIT-ligand e del

progesterone indotta dall'FSH nonché la produzione di estradiolo, stimola la secrezione basale di progesterone (Elvin et al., 2000) associata con up-regulation del gene *StAR*, diminuisce la sintesi dei recettori per l'LH ed induce l'espansione del cumulo ooforo (Dong et al, 1996), infine, stimola l'espressione di *HAS2* e di *COX2* (McGrath et al., 1995; Nilson e Skinner, 2002).

Il gene codificante per questa proteina si trova sul cromosoma 5 sia nell'uomo che nella pecora, presenta 2 esoni ed un introne e codifica per un precursore peptidico di 453 aminoacidi, il peptide maturo è di 135 aminoacidi (Bodensteiner et al, 1999).

Diversi polimorfismi sono stati individuati in varie razze ovine, taluni associati a variazioni della fertilità. Il polimorfismo di principale interesse è sicuramente quello localizzato al nucleotide 1184 del cDNA consistente nella sostituzione della citosina con la timina con corrispondente sostituzione della serina con la fenilalanina nel peptide maturo. L'allele mutato viene chiamato *FecG^H*. Quando questa mutazione è presente allo stato omozigote l'animale è sterile, i follicoli ovarici appaiono sviluppati fino ad un'anomala fase 5 antrale. La mutazione *FecG^H* è stata identificata negli ovine di razza Belclare e Cambridge (Hanrahan et al. 2004).

Gene	Nome allele	SNP	Coding base (bp)	Residuo Amminoacidico	Peptide maturo (aa)	Cambiamento Amminoacidico	Ref.
BMP1B	FecB	A→G	830	249	249	Gln- Arg	Wilson et al., 2001
BMP15	FecX ^G	C→T	718	239			Hanrahan et al., 2004
	FecX ^H	C→T	871	291	23		Davis et al., 2001
	FecX ^I	T→A	896	299	31	Val – Asp	Davis et al., 2001
	FecX ^L	G→A	969	323	53	Cys-Tyr	Bodin et al., 2007
	FecX ^B	G→T	1100	367	99	Ser- Asp	Hanrahan et al., 2004
GDF9	FecG ^H	C→T	1184	395	77	Ser-Phe	Hanrahan et al., 2004

Tabella 13. Polimorfismi dei geni BMP15, GDF9 e BMP1B identificati nelle diverse razze ovine ed associati a variazioni della prolificità.

5.4 Interazione tra i geni BMPR-1B, BMP 15 e GDF 9

E' stato dimostrato che BMP15 e GDF9 agiscono in maniera sinergica allo scopo di stimolare la proliferazione delle cellule della granulosa, aumentando la produzione di inibina e sopprimendo la produzione di progesterone (Moore et al., 2004; McNatty et al., 2005).

Nella specie ovina GDF9 ha una potente azione di soppressione della produzione di progesterone, sia basale che stimolata dall'FSH da parte delle

cellule dei piccoli follicoli antrali senza che la loro proliferazione ne venga alterata(Silva et al., 2011).

BMP15, GDF9 e BMP-1B insieme sono implicati nei complessi meccanismi di regolazione, proliferazione e differenziazione delle cellule della teca e della granulosa (Montgomery et al., 1992). Controllano le prime fasi del processo di follicologenesi(McNatty et al., 2004), quando la cioè crescita follicolare è strettamente legata alla proliferazione delle cellule della granulosa. Negli stadi più avanzati modulano gli effetti di differenziazione legati all'FSH e forse all'IGF1 delle cellule follicolari (McNatty et al., 2005).

Infine, nei follicoli antrali, nelle ultime fasi di sviluppo gonadotropino dipendenti, controllano la differenziazione delle cellule follicolari ed hanno una forte influenza negativa sulla produzione di progesterone dipendente dall'FSH e dall'LH, pertanto, nella fase in cui luteinizzazione ed ovulazione vengono innescate da un picco di gonadotropine, potrebbero essere agire ritardando il processo di luteinizzazione precoce delle cellule follicolari.

Le varie mutazioni dei 3 geni portano ad una minore sensibilità all'azione del sistema di inibizione delle BMP (Liao et al., 2003). Determinano anche una maggiore sensibilità dei follicoli alle gonadotropine, il che promuove il loro mantenimento in azione per un periodo di tempo maggiore.

Nei portatori eterozigoti delle mutazioni al gene GDF9 e BMP15, nonché nei portatori omozigoti o eterozigoti dell'allele FecB, i follicoli hanno un minor numero di cellule della granulosa e producono una minore quantità di estradiolo e di inibina, ma siccome sono in numero maggiore tutti assieme determinano una produzione finale pari a quella di un soggetto non portatore.

È probabile che il feedback positivo dell'estradiolo sulla secrezione di GnRH sia innescato dalla stessa quantità soglia di estradiolo sia nei portatori che nei non portatori, consentendo così ovulazione e luteinizzazione di un alto numero di follicoli nei portatori delle varianti mutate dei vari geni della Fecondità BMPR1B, BMP15 e GDF9.

5.5 Effetti delle mutazioni dei geni BMP 15, GDF 9 e

BMPR – 1B sulla fecondità

L'infertilità ovarica osservata nelle pecore omozigoti per le 5 mutazioni del BMP15 (FecX^L, FecX^H, FecX^G, FecX^B, FecX^L) è stata osservata anche nei soggetti eterozigoti ma portatori nei 2 alleli del gene di due diverse mutazioni (Galloway et al. , 2000), soggetti aventi, ad esempio, un allele FecX^G e l'altro FecX^H sono sterili, soggetti che presentano un allele FecX^G e l'altro FecX^B. Stessa cosa accade nei soggetti omozigoti per l'allele FecX^H. Tale condizione trova spiegazione nell'effetto che tali geni hanno durante l'embriogenesi ed in particolare durante lo sviluppo dell'apparato riproduttore femminile. Il loro mancato o alterato funzionamento in tale fase comporta un mancato sviluppo delle ovaie con conseguente disgenesia.

Al contrario l'allele FecB quando presente in condizioni di omozigosi induce maggiore fertilità di quando è presente in condizione di eterozigosi.

Diversi studi hanno poi verificato l'influenza sui tassi di ovulazione delle mutazioni ai tre geni nelle varie combinazioni possibili e in tutti i casi è stato evidenziato un aumento. La presenza contemporanea di mutazioni del

BMP15, in condizione di eterozigosi, e del BMPR1B ha un'azione moltiplicativa sul tasso di ovulazione (Davis et al., 1999). BMP15 comporta un aumento del tasso di ovulazione del 44%, e BMPR1B del 90%, inoltre l'effetto di uno dei 2 geni non è influenzato dall'azione dell'altro (Davis, 2004). La maggior parte degli studi suggerisce che l'effetto dei geni sul tasso di ovulazione è additivo, ma alcuni test di progenie evidenziano che la mutazione di GDF9 ha azione minore quando è presente anche una mutazione del BMP15. In ogni caso gli individui che presentano sia la mutazione del BMP15 che del GDF9 presentano tassi di ovulazione più elevati rispetto quelli che presentano mutazione in uno solo dei due geni. Per dimostrare l'effetto combinato delle tre mutazioni una pecora eterozigote portatrice di mutazioni in ciascuno dei 3 geni (BMPR1B, BMP15, e GDF9) è stata ottenuta incrociando un soggetto portatore testato della mutazione GDF9 con un soggetto portatore del FecX^l e del FecB. Il soggetto così ottenuto aveva ovaie perfettamente funzionanti ed un tasso di ovulazione compreso tra 8 e 10 a 18 mesi di età e pari a 12 a 2 anni e mezzo (Davis, 2005).

6. SCOPO DEL LAVORO

Scopo della presente tesi di dottorato è stato di verificare le sequenze dei geni BMP15, GDF9 e BMPR1B, che nella specie ovina si è scoperto essere associati a variazioni della fertilità, nelle razze ovine Laticauda e Bagnolese, TGA della regione Campania, per verificare se gli elevati tassi di prolificità riscontrati in tali razze siano associabili a particolari polimorfismi presenti in tali geni come già evidenziato in altre razze.

In particolare per il gene BMPR1B si è verificato se nelle due razze fossero presenti soggetti portatori dell'allele FecB.

Per il gene BMP15 è stata indagata l'eventuale presenza di polimorfismi nell'esone 2.

Per il gene GDF9 si è verificato se gli esoni 1 e 2 presentassero i polimorfismi già riscontrati in altre razze ovine o eventualmente specifici per le due razze esaminate.

Questo studio, qualora si riscontrassero nelle due razze autoctone campane, assetti allelici peculiari ed associati ad elevata prolificità, consentirà di mettere a punto test genetici in grado di identificare, sin dalla nascita, i soggetti potenzialmente più produttivi da inserire nei piani di selezione.

Infine questi stessi risultati, opportunamente analizzati potrebbero portare anche ad una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base del complesso carattere della fecondità.

7. MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 50 soggetti appartenenti alle razze ovine autoctone Laticauda e Bagnolese e regolarmente iscritti, rispettivamente a Libro Genealogico ed a Registro Anagrafico.

In particolare sono stati campionati per la razza Laticauda 20 esemplari di cui 5 maschi e 15 femmine, distribuiti in 3 aziende localizzate nelle province di Avellino, Benevento e Caserta.

Per quanto riguarda la razza Bagnolese sono stati campionati 30 animali di cui 10 maschi e 20 femmine, distribuiti in 8 aziende localizzate nelle province di Avellino e Salerno.

Sangue venoso è stato prelevato dalla giugulare mediante provette vacutainer contenenti EDTA, e trasportato in laboratorio entro 24 h.

Per l'estrazione di DNA è stato utilizzato il kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) e la purezza e la concentrazione del DNA estratto sono state misurate mediante Biofotometro (Biophotometr eppendorf).

Dal DNA di partenza sono stati preparati per ciascun animale 100 μ l di DNA a concentrazione 10 ng/ μ l da usare per le amplificazioni con PCR delle regioni genetiche considerate in questo studio.

Analisi delle singole regioni

Il gene **BMPR1B** è stato esaminato mediante la tecnica della Forced-RFLP PCR già descritta da Davis et al. (2002). Questa metodica prevede l'impiego di un primer che inserisce durante il processo di amplificazione una mutazione puntiforme nel frammento generato in modo da creare un sito di

restrizione. In questo caso l'amplificato risultante ha la lunghezza di 190bp, ed il nucleotide 159 sarà un'adenina (A) nell'allele normale ed una Guanina (G) nell'allele FecB.

Il primer OAR-FecB-R1 è stato preparato in modo tale da inserire, durante l'amplificazione, al nucleotide 163 del frammento generato, una mutazione puntiforme A→G in modo da creare, qualora fosse presente nel soggetto esaminato l'allele FecB, il sito di restrizione GGACC riconosciuto dall'enzima Avall.

I primer impiegati sono riportati nella Tabella 14.

L'amplificazione è stata effettuata usando GoTaq polimerasi (Promega cod. M3175) con i seguenti parametri: 95° per 5' seguito da 35 cicli a 95°C per 30", 60°C per 30", e 72°C per 30", 1 ciclo a 72°C per 5' ed infine 1 ciclo a 99°C per 15'.

I prodotti PCR sono stati quindi verificati mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio 1,8% in buffer TAE 1X, colorato con bromuro di etidio (Fig. 17). Per verificare che i primer disegnati amplificassero la regione indicata i prodotti PCR di tre soggetti sono stati purificati e sequenziati in ambo le direzioni mediante 3730 DNA Analyzer (ABI) sequencer. Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante i software Bioedit (version 7.1.3.0), e Blast.

GENE	Nome primer	Sequenza primer	Dimensione frammento (bp)	T Annealing
BMPR1B	OAR-FecB-F1	5' - CCA GAG GAC AAT AGC AAA GCA AA - 3'	190bp	60°
	OAR-FecB-R1	5' - CAA GAT GTT TTC ATG CCT CAT CAA CAC GGT C - 3'		
BMP15	OAR-FecX-F1	5' - TTC CTC TGA GAC CAA ACC G - 3'	701bp	55°
	OAR-FecX-R1	5' - CTG ATC CAC CAG CTC ACT GA - 3'		
GDF9	OAR-GD1-F	5' - GAATTGAACCTAGCCCACCCAC -3'	708bp	62°
	OAR-GD1-R	5' - AGC CTA CAT CAA CCC ATG AGG C - 3'		
GDF9	OAR-GD2-1-F	5' - AAAGGGACAGAAGCACATTCT - 3'	701bp	60°
	OAR-GD2-1-R	5' - GAC TGA AGC TGG AAC CAG AGG - 3'		
GDF9	OAR-GD2-2-F	5' - AAAGGAAGCCTTCACAGGGT - 3'	591bp	55°
	OAR-GD2-2-R	5' - GAA ACT TCC TCC CAA AGG CA - 3'		

Tabella 14. Primer utilizzati per l'amplificazione delle regioni analizzate dei geni BMPR1B, BMP15 e GDF9 con relativa lunghezza dei frammenti generati e temperature di annealing.

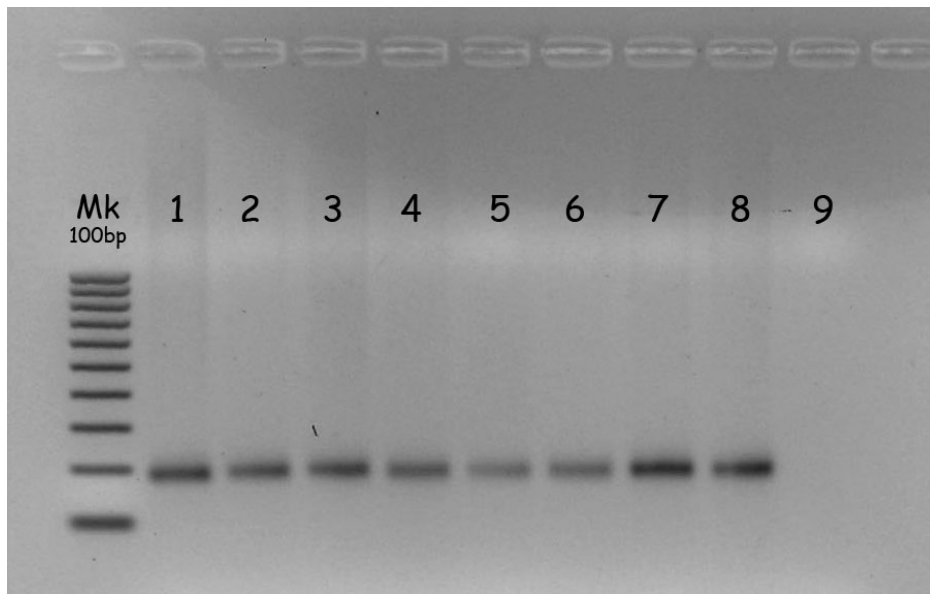


Fig. 17. Tracciato elettroforetico su gel d'agarosio (1,8%), colorato con bromuro d'etidio, del prodotto ottenuto mediante PCR di 190bp della regione del gene BMPR1B, contenente il sito polimorfico A→G, amplificata in 8 degli ovini esaminati. La Lane 9 corrisponde al controllo negativo.

Gli amplificati ottenuti con le successive PCR sono stati sottoposti a digestione enzimatica usando l'enzima Avall (Promega cod. R6131) e successivamente verificati mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio 1,8% in buffer TAE 1X, colorato con bromuro di etidio.

Nei soggetti omozigoti in cui la mutazione FecB è assente il prodotto non viene tagliato e pertanto si osserva una banda di 190bp, nei soggetti omozigoti per la presenza della mutazione FecB l'amplificato viene tagliato e pertanto sul gel si osservano due bande una di 160bp e l'altra di 30bp, nei soggetti eterozigoti l'amplificato viene tagliato solo in parte, per cui osserviamo tre bande: una di 190bp, una di 160bp ed infine una di 30bp.

Per assicurare che la digestione fosse corretta e non vi fossero falsi negativo o falsi positivi durante ogni sessione di veniva previsto un controllo

negativo rappresentato dal prodotto PCR di un ovino risultato non portatore del polimorfismo A→G al sequenziamento ed un controllo positivo rappresentato da un frammento di 708 bp in cui sono presenti 3 siti di restrizione e che pertanto deve essere viene tagliato in 4 frammenti di 263bp, 201bp, 163bp, 83bp (Fig. 18).

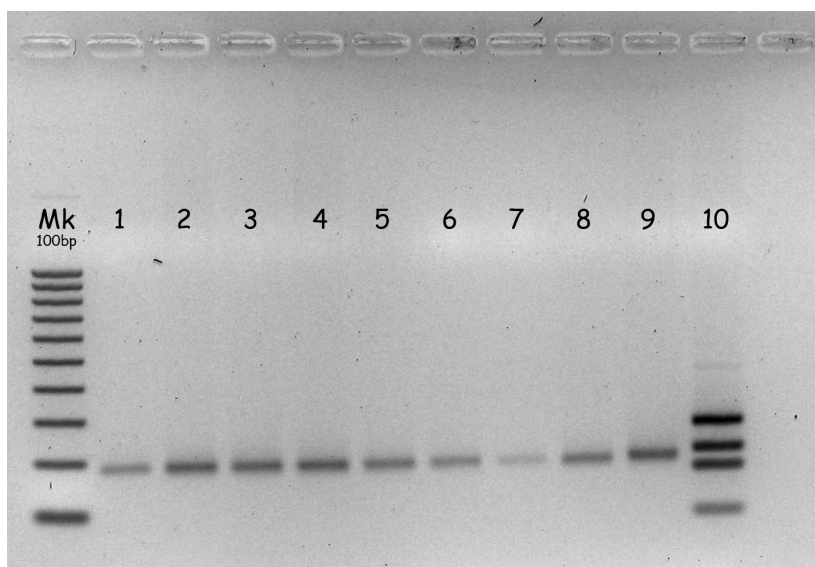


Fig. 18. Tracciato elettroforetico su gel d'agarosio (1,8%), colorato con bromuro d'etidio, dei prodotti PCR dopo digestione enzimatica con Avall per verificare la presenza del polimorfismo A→G in 8 ovini esaminati, Lane 9 controllo negativo, Lane 10 controllo positivo

L'esone 2 del gene **BMP15** è stato esaminato mediante sequenziamento ed i primer utilizzati (Tabella 14) sono stati elaborati in modo da coprire la regione dell'esone in cui sono state evidenziate mutazioni associate a maggiore prolificità. L'amplificazione è stata effettuata usando GoTaq polimerasi (Promega cod. M3175) con i seguenti parametri: 95° per 5' seguito da 35 cicli a 95°C per 30", 55°C per 30", e 72°C per 30" ed infine 1 ciclo a 72°C per 5'. I prodotti PCR sono stati quindi verificati mediante corsa elettroforetica

su gel di Agarosio 1,8% in buffer TAE 1X, colorato con bromuro di etidio (Fig.19) quindi purificati e sequenziati in ambo le direzioni mediante 3730 DNA Analyzer (ABI) sequencer. Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante i software Bioedit (version 7.1.3.0), e Blast.

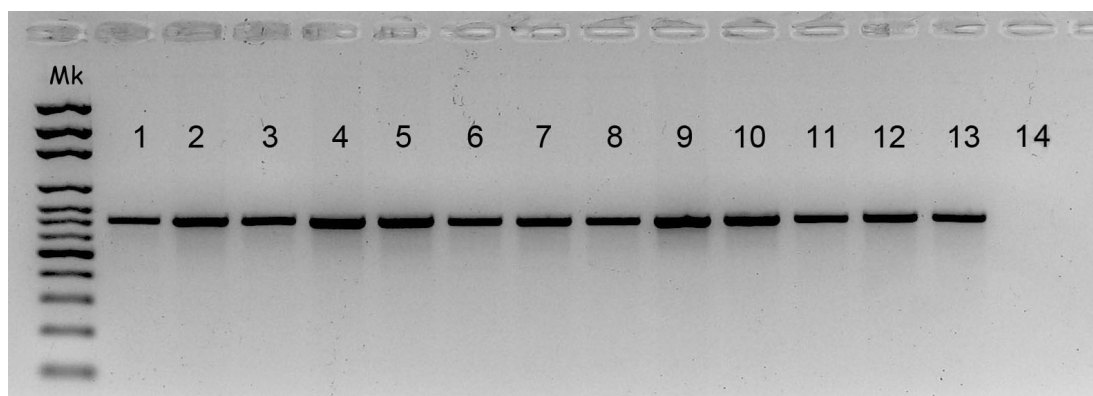


Fig. 19. Tracciato elettroforetico su gel d'agarosio (1,8%), colorato con bromuro d'etidio, del prodotto ottenuto mediante PCR di 701bp della regione del gene BMP15 contenente siti polimorfici associati a maggiore prolificità nella specie ovina. La Lane 14 corrisponde al controllo negativo.

Il gene **GDF9** presenta 2 esoni, nel primo è stato evidenziato un polimorfismo G□A in un ariete di razza Belclare (Hanrahan et al. 2004). Tale polimorfismo, localizzato al nucleotide 260 della coding sequence, determina la perdita del sito di restrizione GCGC riconosciuto, tra gli altri, dall'enzima HhaI. Per verificare l'eventuale presenza di tale polimorfismo negli ovini di razza Laticauda e Bagnolese si sono usati i primer OAR-GD1-F ed OAR-GD1-R già descritti da Hanrahan et al. (2004) che generano un frammento di 708bp nel quale è interamente contenuto l'esone 1.

L'amplificazione è stata effettuata usando GoTaq polimerasi (Promega cod. M3175) con i seguenti parametri: 95° per 5' seguito da 35 cicli a 95°C per

30", 62°C per 30", e 72°C per 30", 1 ciclo a 72°C per 5' ed infine 1 ciclo a 99°C per 15'. I prodotti PCR sono stati quindi verificati mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio 1,8% in buffer TAE 1X, colorato con bromuro di etidio (Fig. 20). Per verificare che i primer disegnati amplificassero la regione indicata nonché l'eventuale presenza di ulteriori polimorfismi ancora non segnalati i prodotti PCR di 10 soggetti (5 di razza Laticauda e 5 di razza Bagnolese) sono stati purificati e sequenziati in ambo le direzioni mediante 3730 DNA Analyzer (ABI) sequencer. Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante i software Bioedit (version 7.1.3.0), e Blast.

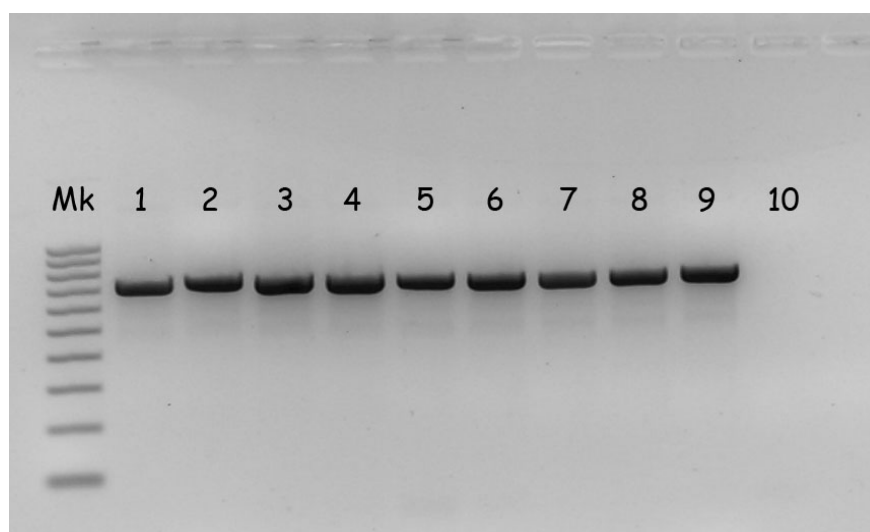


Fig. 20. Tracciato elettroforetico su gel d'agarosio (1,8%), colorato con bromuro d'etidio, del prodotto ottenuto mediante PCR di 708bp, esone 1 del gene GDF9. La Lane 10 corrisponde al controllo negativo.

I prodotti ottenuti con le successive amplificazioni sono stati sottoposti a digestione enzimatica usando l'enzima HhaI (Promega cod. R6441) e successivamente verificati mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio

1,8% in buffer TAE 1X, colorato con bromuro di etidio. Nei soggetti omozigoti in cui la mutazione G→A è assente il prodotto viene tagliato generando tre frammenti di 327bp; 254bp e 127bp (Fig. 21) nei soggetti omozigoti per la presenza della mutazione il prodotto viene tagliato generando due frammenti di 581bp e 127bp, infine nei soggetti eterozigoti l'amplificato viene tagliato solo in parte, per cui osserviamo quattro bande di 581bp; 327bp; 254bp e 127bp.

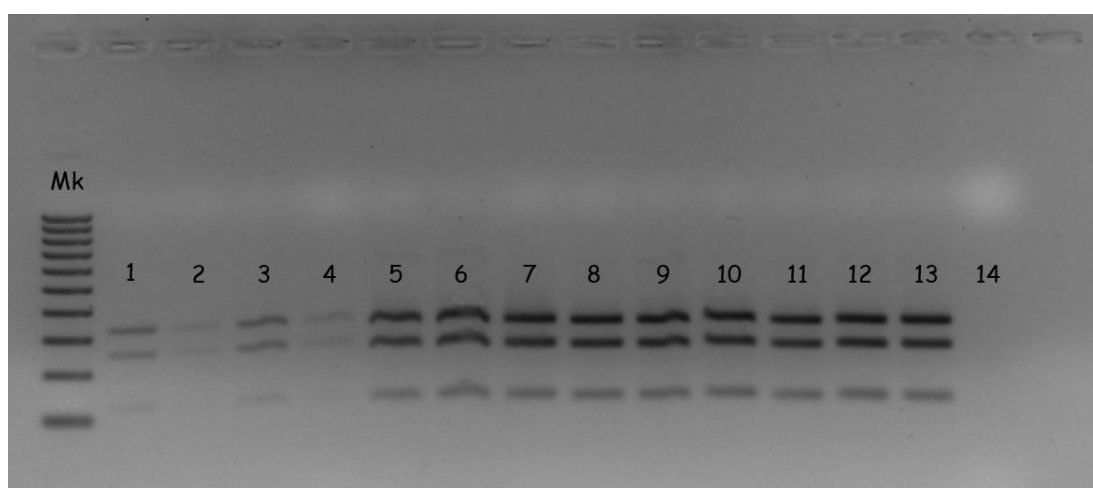


Fig. 21. Tracciato elettroforetico su gel d'agarosio (1,8%), colorato con bromuro d'etidio, dei prodotti PCR dopo digestione enzimatica con HhaI per verificare la presenza del polimorfismo G→A in 13 ovini esaminati. Lane 14 controllo negativo.

L'esone 2 è lungo 966bp ed è stato pertanto necessario impiegare 2 coppie di primer denominate OAR-GD2-1-F ed OAR-GD2-1-R; OAR-GD2-2-F ed OAR-GD2-2-R (Tabella 14) che generano rispettivamente un frammento di 701bp ed uno di 591bp. L'amplificazione è stata effettuata usando GoTaq polimerasi (Promega cod. M3175) con i seguenti parametri: 95° per 5' seguito da 35 cicli a 95°C per 30", 60-55°C per 30", e 72°C per 30" ed infine

1 ciclo a 72°C per 5'. I prodotti PCR sono stati quindi verificati mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio 1,8% in buffer TAE 1X, colorato con bromuro di etidio (Fig. 22) quindi purificati e sequenziati in ambo le direzioni mediante 3730 DNA Analyzer (ABI) sequencer. Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante i software Bioedit (version 7.1.3.0), e Blast.

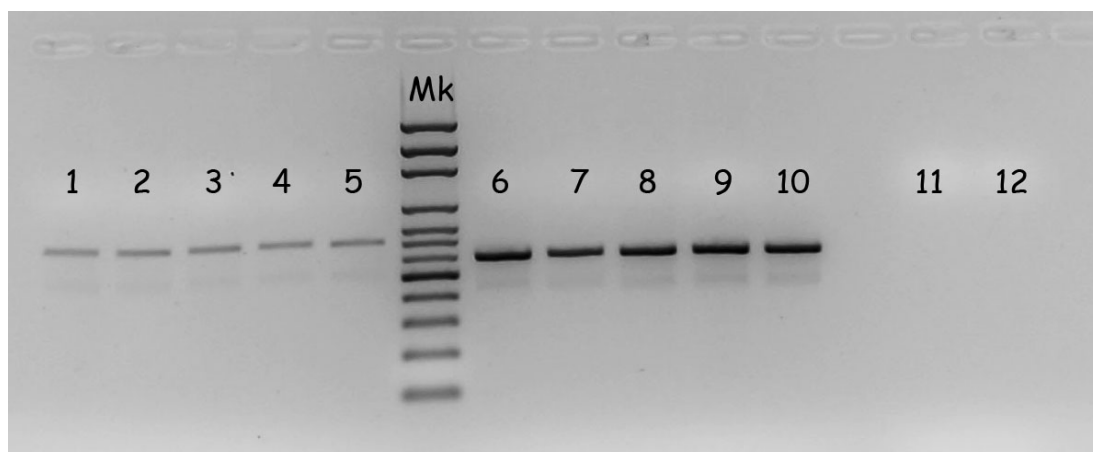


Fig. 22. Tracciato elettroforetico su gel d'agarosio (1,8%), colorato con bromuro d'etidio, dei prodotti ottenuti mediante PCR di 701bp (Lane 1-5) e 591bp (Lane6-7) costituenti nel loro insieme l'esone 2 del gene GDF9. Le Lane 11 e 12 corrispondono ai controlli negativi.

8. RISULTATI E DISCUSSIONI

BMPR1B

Il sequenziamento di controllo dei primer effettuato sui DNA dei primi dieci soggetti esaminati (5 di razza Laticauda e 5 di razza Bagnolese) non ha evidenziato polimorfismi rispetto alle sequenze depositate in genbank, risultava invece presente la mutazione puntiforme A→G volutamente inserita attraverso l'apposito primer al fine di generare, laddove fosse presente la mutazione A→G dell'allele FecB, il sito di restrizione GGACC riconosciuto dall'enzima Avall.

L'analisi di restrizione effettuata successivamente su altri 15 soggetti di razza Laticauda e 25 di razza Bagnolese non ha evidenziato in nessun soggetto la presenza dell'allele FecB.

La prolificità di queste due razze non trova quindi spiegazione nella presenza di questa mutazione pertanto si suppone che altri siano i geni responsabili di tale carattere.

BMP15

Il sequenziamento di controllo dei primer effettuato sui DNA dei primi dieci soggetti esaminati (5 di razza Laticauda e 5 di razza Bagnolese) ha evidenziato due polimorfismi rispetto alla sequenza depositata in genbank.

Il primo, presente in una femmina di razza Laticauda, è una transizione T→C localizzata al nucleotide 422 dell'esone 2.

Questo polimorfismo è stato già evidenziato in ovini di razza Belclare da Hanrahan et al. (2004) e non determina alterazioni amminoacidiche nella catena polipeptidica codificata.

Il secondo polimorfismo, riscontrato in 1 femmina di razza Bagnolese, è una trasversione G→T localizzata al nucleotide 395 dell'esone 2 responsabile del cambiamento Gln→His dell'amminoacido 718 nella catena polipeptidica.

Successivamente si è proceduto al sequenziamento dello stesso frammento in altri 15 soggetti di razza Laticauda e 25 di razza Bagnolese.

Dei due polimorfismi riscontrati il primo non è stato riscontrato in altri soggetti mentre il secondo è stato trovato in altre due femmine di razza Bagnolese ed in tutti e tre i casi è presente in forma eterozigote, mentre non è stata riscontrata in individui di razza Laticauda.

La trasversione G→T al nucleotide 395 dell'esone 2, ancora non segnalata in altre razze della specie ovina determina la sostituzione nella catena polipeptidica di un amminoacido polare (la glicina) con uno basico (l'istidina), condizione che potrebbe determinare una diversa funzionalità della proteina, tuttavia risulta difficile associare la maggiore prolificità riscontrata nella razza Bagnolese alla presenza di tale polimorfismo in quanto la sua frequenza allelica nel campione analizzato risulta essere di 0,05.

Inoltre dal confronto delle sequenze nucleotidiche del gene BMP15 tra le specie umana (*Homo sapiens* - HSA), murina (*Mus musculus* - MMU), e bovina (*Bos taurus* - BTA) con la specie ovina (OAR) è possibile osservare come al nucleotide 395 dell'esone 2 ritroviamo nell'uomo e nel topo una timina e nel bovino una guanina (Fig. 23), tutto ciò avvalorava l'ipotesi che in

realità tale mutazione non ha particolari effetti sulla funzionalità della proteina codificata. Potrebbe piuttosto rappresentare una mutazione tipica della razza Bagnolese di cui sarebbe interessante indagare l'origine.

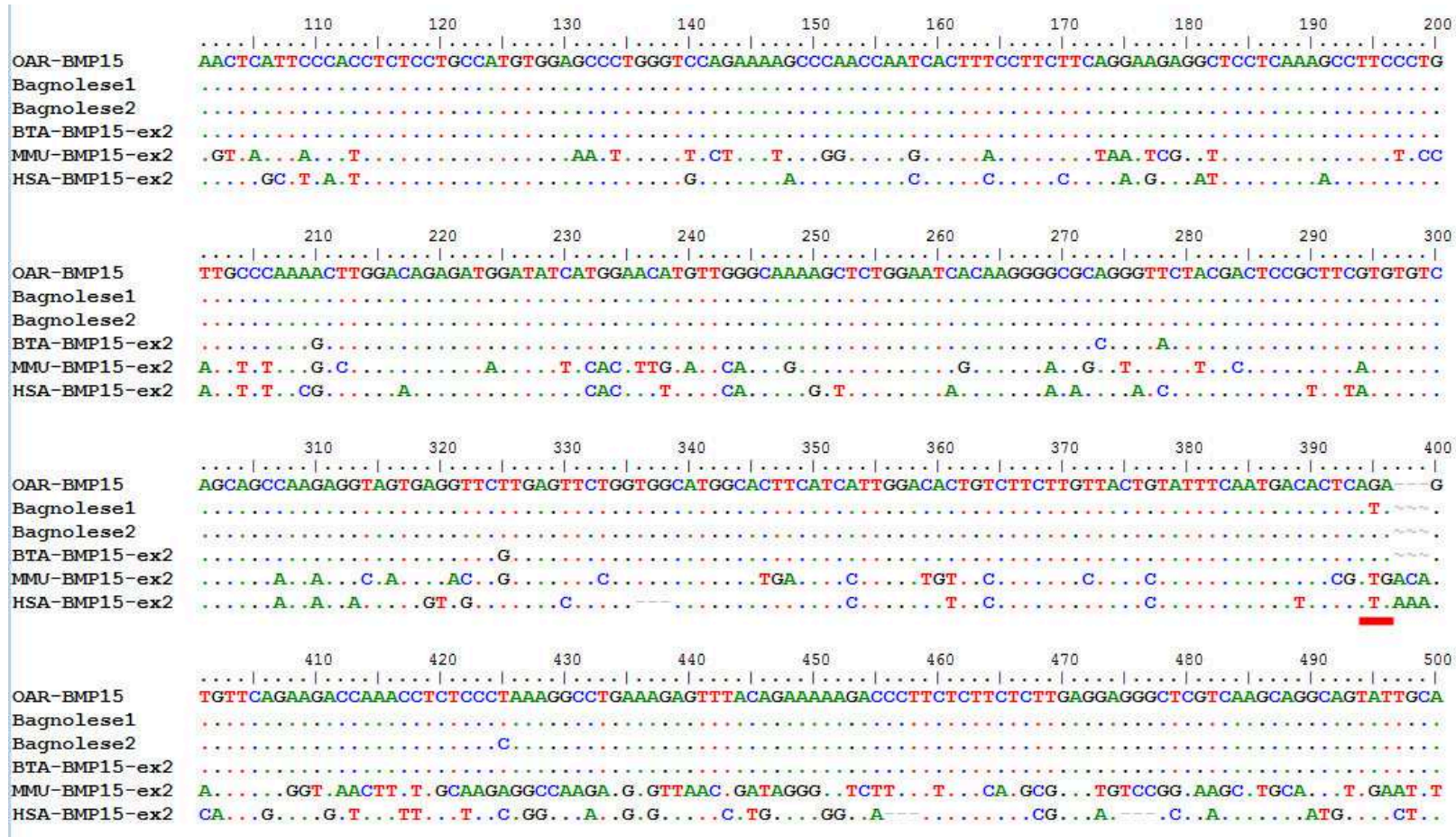


Fig.23. Confronto tra le sequenze dell'esone 2 del gene BMP15 nelle specie Ovina (OAR), Bovina (BTA), Murina (MMU) ed umana (HSA). In rosso viene indicata il nucleotide in cui è stata evidenziato il polimorfismo negli Ovini di razza Bagnolese.

GDF9

Per quanto riguarda l'esone 1 il sequenziamento di controllo dei primer effettuato sui DNA dei primi dieci soggetti esaminati (5 di razza Laticauda e 5 di razza Bagnolese) non ha evidenziato polimorfismi rispetto alle sequenze depositate in genbank, e nemmeno riportava in alcun soggetto la presenza del polimorfismo G→A riscontrato in diverse razze ovine autoctone (Hanrahan et al., 2004; da Javanmard et al, 2011). Tale condizione è stata successivamente confermata dall'analisi RFLP condotta su tutti i 50 soggetti esaminati.

L'analisi dell'esone 2 ha evidenziato la presenza di polimorfismi sia in soggetti di razza Laticauda che di razza Bagnolese (Fig. 24).

Considerando l'intera sequenza esonica del gene GDF9 nei 20 soggetti di razza Laticauda sono stati riscontrati i seguenti polimorfismi (Tab 15):

1. transizione C→T al nucleotide 471 in 2 femmine che non determina alterazioni amminoacidiche nella catena polipeptidica codificata;
2. transizione G→A al nucleotide 477 in 2 femmine che non determina alterazioni amminoacidiche nella catena polipeptidica codificata;
3. transizione G→A al nucleotide 617 in 1 femmina che comporta la sostituzione di una Arginina con una Lisina al residuo amminoacidico 206 del polipeptide;
4. transizione G→A al nucleotide 721 in 2 femmine responsabile di una variazione nella proteina codificata al residuo amminoacidico 241 dove al posto dell'Acido glutammico verrà inserita una Lisina;

5. transizione G→A al nucleotide 1358 in due femmine che determina una variazione nella catena polipeptidica il cui ultimo amminoacido sarà una Istidina invece che una Arginina.

Considerando l'intera sequenza esonica del gene GDF9 nei 30 ovini di razza Bagnolese sono stati trovati i seguenti polimorfismi (vedi Tab 15):

1. transizione C→T al nucleotide 471 in 1 femmina che non determina alterazioni amminoacidiche nella catena polipeptidica codificata;
2. una transizione G→A al nucleotide 477 in 5 femmine, che non determina alterazioni amminoacidiche nella catena polipeptidica codificata;
3. una transizione C→T al nucleotide 531 in una femmina che non determina alterazioni amminoacidiche nella catena polipeptidica codificata;
4. una transizione G→A al nucleotide 721 in un maschio responsabile di una variazione nella proteina codificata al residuo amminoacidico 241 dove al posto dell'Acido glutammico verrà inserita una Lisina;
5. una transizione G→A al nucleotide 750 in 4 femmine che non determina alterazioni amminoacidiche nella catena polipeptidica codificata;
6. una trasversione G→T al nucleotide 953 in una femmina responsabile di una variazione nella proteina codificata al residuo amminoacidico 318 dove al posto dell'Arginina verrà inserita una Isoleucina;

7. una transizione A→G al nucleotide 978 in un ariete che non determina alterazioni amminoacidiche nella catena polipeptidica codificata;
8. una transizione G→A al nucleotide 994 in una femmina responsabile di una variazione nella proteina codificata al residuo amminoacidico 332 dove al posto della Valina viene inserita Isoleucina;
9. una transizione G→A al nucleotide 1203 in una femmina che non determina alterazioni amminoacidiche nella catena polipeptidica codificata.

Variant e	Razza	nt sequenza esonica	Residuo amminoacidic o	Cambiamento Amminoacidic o
C→T	Lat - Bag	471	157	Val-Val
G→A	Lat - Bag	477	159	Leu-Leu
C→T	Bag	531	177	Asn-Asn
G→A	Lat	617	206	Arg-Lys
G→A	Lat - Bag	721	241	Glu-Lys
G→A	Bag	750	250	Arg-Arg
G→T	Bag	953	318	Arg-Ile
A→G	Bag	978	326	Glu-Glu
G→A	Bag	994	332	Val-Ile
G→A	Bag	1203	401	Val-Val
G→A	Lat	1358	453	Arg-His

Tabella 15 Polimorfismi riscontrati nella sequenza esonica del gene GDF9 negli ovini di razza Laticauda (Lat) e Bagnolese (Bag).


```

      400      410      420      430      440      450      460      470      480      490
GDF9_OAR_ex2  GGAACCTTTCATCAGTGGATCTGCTGTTTAAACCTGGATCGTGTTACTGTTGTGGAACATTTATTCAAGTCAGTCTTGCTGTATACTTTCACAACCTCCA
Laticauda-GDF9-Ex2  .....T.....A.....
Bagnolese-GDF9-Ex2  .....T.....A.....
GDF9-BTA-ex2     .....C.....A.....

      500      510      520      530      540      550      560      570      580      590
GDF9_OAR_ex2  TTTCCTTCCCTTCCCTGTTAAATGTATATGCAACCTGGTGATAAAAGAGCCAGAGTTTCTAGCAAGACTCTCCCTAGAGCTCCATACTCATTACCTA
Laticauda-GDF9-Ex2  .....T.....
Bagnolese-GDF9-Ex2  .....T.....
GDF9-BTA-ex2     .....T.....

      600      610      620      630      640      650      660      670      680      690
GDF9_OAR_ex2  TAACTCACAGTTTGAATTTAGAAAGAAATACAAATGGATGGAGATTGATGTGACGGCTCCTCTTGAGCCTCTGGTGGCCCTCCACAAGAGGAATATTCAC
Laticauda-GDF9-Ex2  .....A.....
Bagnolese-GDF9-Ex2  .....T.....A.....
GDF9-BTA-ex2     .....T.....A.....

      700      710      720      730      740      750      760      770      780      790
GDF9_OAR_ex2  ATGCTCTGAAATTTTACATGTGCGGAAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGGGGACAGCCTGTTTAAACATGACTCTTCTCGTAGCGCCCTCACTGCTTT
Laticauda-GDF9-Ex2  .....A.....
Bagnolese-GDF9-Ex2  .....A.....A.....
GDF9-BTA-ex2     .....T.A.....A.....T.....C

      800      810      820      830      840      850      860      870      880      890
GDF9_OAR_ex2  TGTATCTGAACGACACAAGTGCTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCCCTGACCAGAAGAGAGGGGTATC
Laticauda-GDF9-Ex2  .....
Bagnolese-GDF9-Ex2  .....
GDF9-BTA-ex2     .....A.....A.....G.....

```

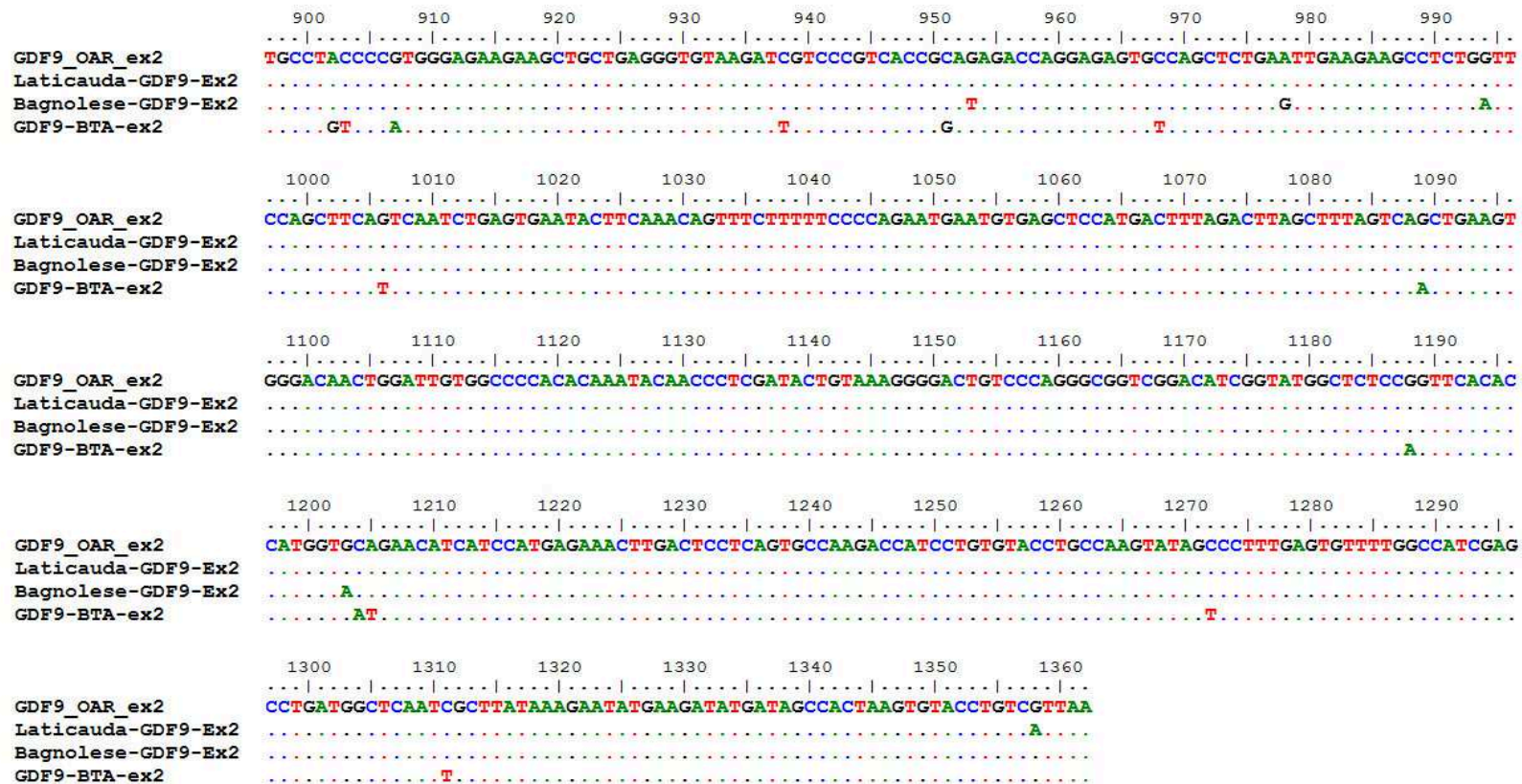


Fig. 24. Confronto tra la sequenza dell'esone 2 del gene GDF9 annotata in genbank (AF078545.2) per la specie Ovina (OAR), e le sequenze delle razze ovine Laticauda e Bagnolese con i relativi SNP riscontrati e con la sequenza annotata in in genbank (AC_000164) per la specie Bovina (BTA).

6. Le possibili varianti alleliche al gene GDF9, così come indicato dalla sequenza riportata in genbank AF078545.2, presenti negli ovini di razza Laticauda sarebbero 5, tuttavia i polimorfismi al nt 471, 477 e 721 risultano contemporaneamente presenti in forma omozigote nelle 2 femmine e costituiscono nel loro insieme un aplotipo (Fig. 25 e Fig. 26).
7. Di conseguenza le possibili forme alleliche presenti del gene GDF9 negli ovini di razza Laticauda identificate con questo studio sono 4:
 1. LAT1 caratterizzato dagli SNP agli nt 471, 477 e 721;
 2. LAT2 caratterizzato dal solo polimorfismo al nt 477;
 3. LAT3 caratterizzato dal solo polimorfismo al nt 617;
 4. LAT4 caratterizzato dal solo polimorfismo al nt 1358.

La frequenza allelica dei vari polimorfismi riscontrati risulta tuttavia bassa (Tabella 16), se escludiamo quella del SNP al nt 477 che però non comporta cambiamenti nella sequenza amminoacidica, pertanto nessuno di essi può spiegare in toto l'elevata prolificità della razza.

Analizzando i polimorfismi riscontrati nei soggetti di razza Bagnolese osserviamo associazioni tra i 9 SNP tali da far desumere 6 possibili varianti alleliche alla normale sequenza (Fig 24) che possiamo chiamare:

5. BAG1 caratterizzato dagli SNP agli nt 471, 477 e 721;
6. BAG2 caratterizzato dal solo polimorfismo al nt 477;
7. BAG3 caratterizzato dagli SNP agli nt 477 e 750;
8. BAG4 caratterizzato dal solo polimorfismo al nt 978;

9. BAG5 caratterizzato dal solo polimorfismo al nt 994;

10. BAG6 caratterizzato dal solo polimorfismo al nt 1203.

Risulta inoltre ipotizzabile un allele BAG 7 con associazione di polimorfismi agli nt 477 e 953 oppure agli nt 477, 750 e 953.

Anche nella razza Bagnolese il polimorfismo con maggiore frequenza risulta essere quello all'nt 477 che può presentarsi sia isolato che associato ad altri SNP.

SNP (nt)	Laticauda			Bagnolese		
	M	F	Tot	M	F	Tot
471	0	0.175	0.175	0	0.017	0.017
477	0	0.2	0.2	0	0.15	0.15
531	0	0	0	0	0.033	0.033
617	0	0.025	0.025	0	0	0
721	0	0.1	0.1	0.017	0	0.017
750	0	0	0	0	0.067	0.067
953	0	0	0	0	0.017	0.017
978	0	0	0	0.017	0	0.017
994	0	0	0	0	0.017	0.017
1203	0	0	0	0	0.017	0.017
1358	0	0.05	0.05	0	0	0

Tabella 16. Frequenza allelica nelle due razze degli SNP riscontrati.

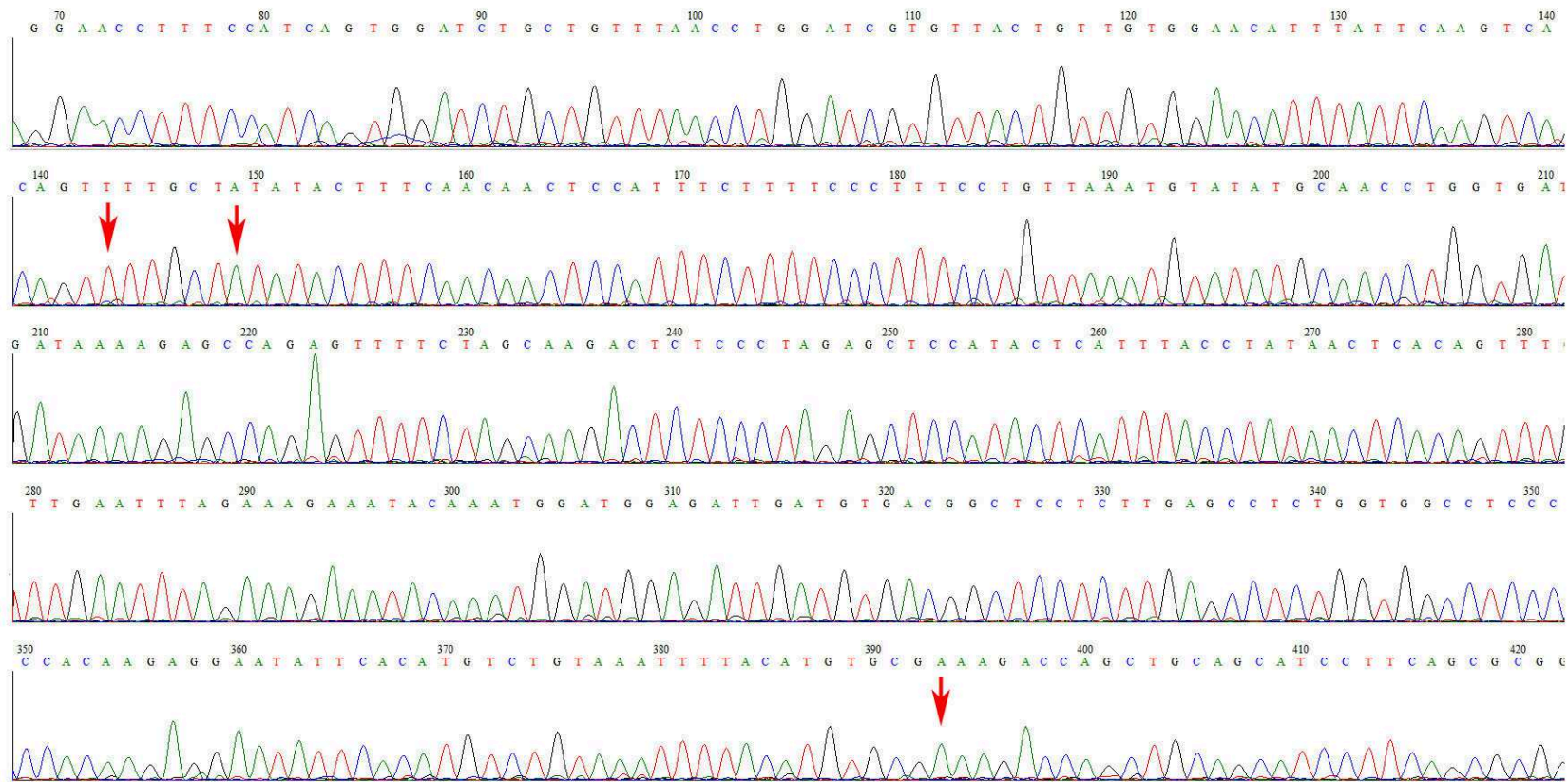


Fig. 25. Elettroferogramma della prima parte dell'esone 2 del gene GDF9 di un soggetto omozigote per l'allele con SNP agli nt 471, 477 e 721. Le frecce indicano le posizioni degli SNP.

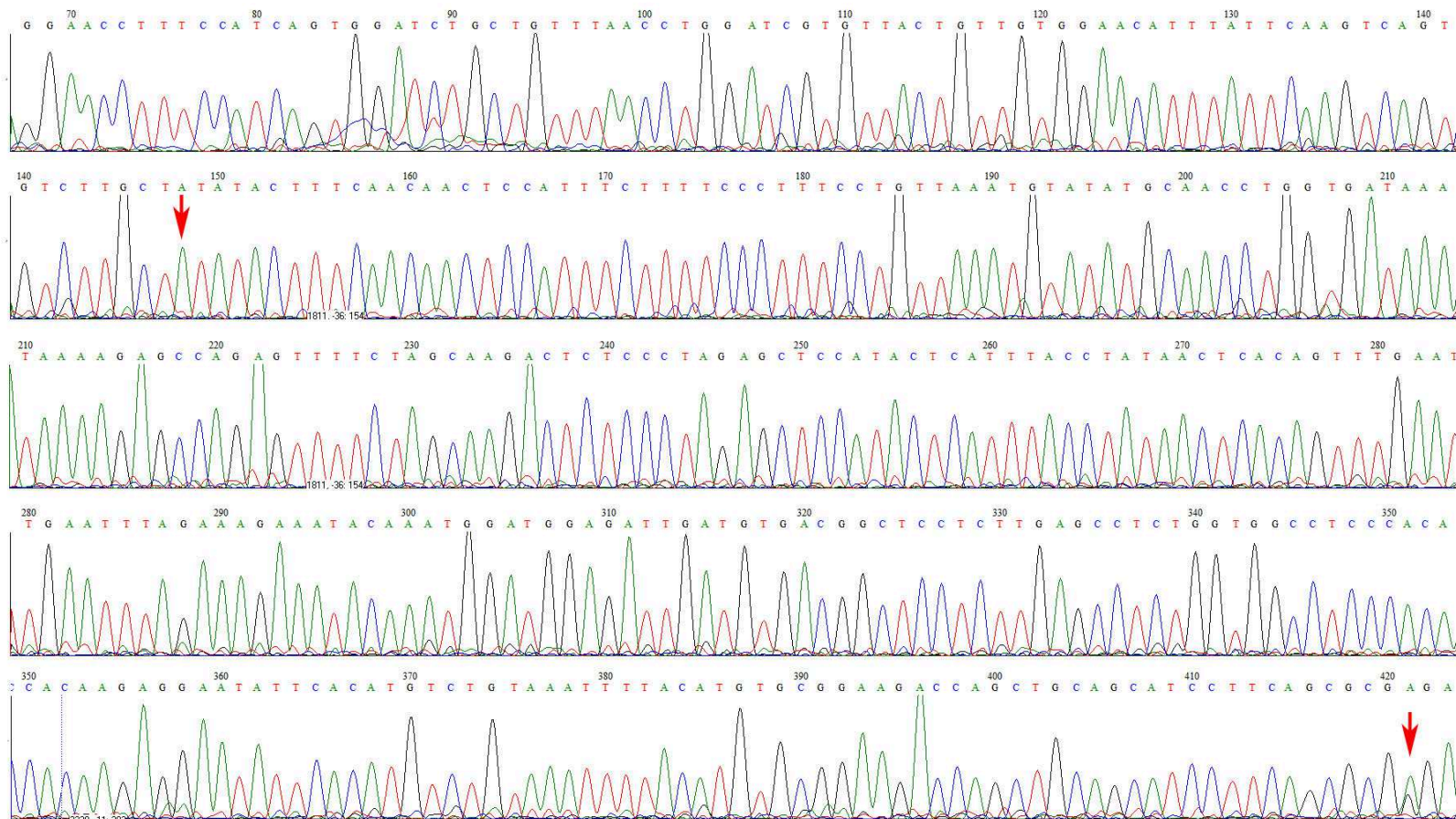


Fig. 26. Elettroferogramma della prima parte dell'esone 2 del gene GDF9 di un soggetto omozigote l'SNP al nt 477 ed eterozigote per l'SNP al nt 750. Le frecce indicano le posizioni degli SNP.

Dei polimorfismi riscontrati nel gene GDF9 durante questo studio non tutti risultano essere specifici delle due razze esaminate, infatti gli SNP C→T nt 471, G→A nt 477, G→A nt 721, A→G nt 978, G→A nt 994 sono stati riscontrati nelle razze Cambridge e Belclare in cui non risultano associati a variazioni dei tassi di prolificità (Hanrahan et al., 2004).

Di notevole interesse appaiono due SNP:

al nt 953 riscontrato nell'ovino Bagnolese e responsabile della sostituzione di una Arginina con una Isoleucina nella catena polipeptidica, e quindi della sostituzione di un amminoacido basico con uno polare-idrofobico

al nt 1358 riscontrato nell'ovino Laticauda che comporta la sostituzione dell'ultimo amminoacido della catena polipeptidica, una Arginina, con una Istidina.

Dal confronto con la corrispondente sequenza dell'esone 2 annotata il genebank per la specie bovina (fig. 24) si osserva come nessuno di tali polimorfismi risulta essere presente in tale specie mentre, pertanto risulta ancora più essenziale verificare i loro eventuali effetti.

Studi di proteomica e valutazioni genealogiche consentiranno di comprendere il significato di tali mutazioni e di definire quanto possano influenzare la prolificità delle due razze.

9. CONCLUSIONI

Le razze autoctone rappresentano una risorsa molto importante per i loro territori di origine, sia perché ne rappresentano la memoria storica e culturale sia perché la loro evoluzione ha seguito di pari passo quella dell'area in cui sono state allevate sviluppando forme di adattamento che le rende capaci di sfruttare al meglio le risorse ambientali che le circondano. Tale unicità si rispecchia nelle loro produzioni che presentano caratteristiche organolettiche peculiari che possono diventare un'importante risorsa per il territorio di appartenenza e generare forme di economia locale.

Nel secolo scorso il cambiamento delle pratiche zootecniche e l'obiettivo di ottenere elevate produzioni a costi estremamente ridotti hanno indotto molti allevatori a sostituire le razze locali con quelle a maggior attitudine produttiva senza considerare la scarsa competitività che tali produzioni hanno sul mercato proprio per la mancanza di caratteristiche di unicità.

Negli ultimi anni le produzioni locali stanno subendo una forte rivalutazione sia dal punto di vista culturale che economico e sempre maggiore è la richiesta da parte dei consumatori di prodotti di nicchia che spuntano quindi sul mercato prezzi molto più vantaggiosi per i produttori.

L'aumento della richiesta di prodotti tipici ha indotto gli allevatori a reintrodurre nelle loro stalle razze autoctone che negli anni passati risultavano quasi scomparse.

Il loro allevamento risulta tuttora non economicamente vantaggioso, soprattutto perché l'abbandono degli anni passati ha notevolmente ridotto la

selezione genetica e lo sviluppo delle tecniche di allevamento più appropriate.

In tale contesto risulta fondamentale il ruolo delle istituzioni che possono favorire il recupero delle razze autoctone mediante lo stanziamento di finanziamenti destinati non solo all'allevamento delle stesse ma anche a progetti di ricerca i cui obiettivi siano l'individuazione delle pratiche di allevamento più corrette per le tali razze e delle linee di miglioramento genetico e di selezione da seguire.

Il progetto "Valorizzazione delle Specie/Razze autoctone allevate in Campania e caratterizzazione delle loro produzioni tipiche", denominato RARECA, approvato nell'ambito del PSR Campania 2007-2013 Misura 214 - Pagamenti Agroambientali e "Allevamento delle specie animali locali in via di estinzione", ha come principale scopo l'individuazione delle caratteristiche di peculiarità dei TGA e del sistema di allevamento e la riqualificazione delle produzioni tipiche.

Tra le razze incluse nel progetto vi sono l'ovino Laticauda e l'ovino Bagnolese in cui si osserva un'incidenza di parti gemellari e trigemellari superiore a quella che si riscontra nella maggior parte della altre razze ovine attualmente allevate in Italia. L'incidenza di parti gemellari e trigemellari e la conseguente prolificità sono nella specie ovina un carattere che ha sempre suscitato molto interesse perché influenzano la redditività dell'allevamento.

Diversi studi genetici hanno evidenziato che l'elevata prolificità nella specie ovina è dovuta a particolari varianti alleliche dei geni BMPR-1B, BMP-15 e

GDF9 di cui si è voluta verificare la presenza nelle due razze oggetto di questo studio.

Tra le principali difficoltà riscontrate nell'effettuazione di questa indagine vi è sicuramente il reperimento di corrette informazioni relative ai soggetti studiati. La disinformazione e le metodiche utilizzate nell'allevamento di queste razze fanno sì che non sia facile identificare in modo univoco i soggetti con parti plurimi da quelli con parti singoli. Per tale motivo non è possibile correlare con certezza le varianti alleliche eventualmente identificate con la tendenza al parto plurimo.

Si sta pertanto ricorrendo ad un diverso approccio, ossia tenere sotto osservazione i soggetti per i quali si sono osservate particolari nuove varianti alleliche dei geni esaminati.

I risultati ottenuti con questo studio hanno permesso di evidenziare la presenza nelle razze ovine Laticauda e Bagnolese di peculiarità genetiche finora non descritte nella specie ovina il cui significato sia da un punto di vista produttivo che da un punto di vista filogenetico sarà molto interessante indagare e di escludere l'esistenza di varianti alleliche responsabili di maggiore prolificità in altre razze.

In particolare per quanto riguarda l'allele FecB, riscontrato per la prima volta nel ceppo Boorola della razza Merinos, è stato dimostrato essere originario degli ovini di razza asiatica, ed in particolare la Garole e la Hu in cui risulta essere fissato (Davis et al., 2006).

La sua assenza nelle razze ovine Laticauda e Bagnolese è indice della mancanza di antenatori comuni con le razze asiatiche in cui la mutazione

deve aver avuto origine o comunque di una divergenza filogenetica antecedente la comparsa della mutazione.

È stato calcolato che la sua introduzione in razze in cui non è presente mediante l'incrocio con soggetti che ne sono portatori determinerebbe un aumento del tasso di ovulazione variabile da 1.1 fino a 2.0 ed un numero di agnelli in più per parto da 0.5 fino a 1.3, con effetto variabile in relazione al background genetico della razza in cui viene introdotto.

L'aumento del tasso di prolificità sarebbe quindi notevole ma richiede significative implementazioni delle tecniche di allevamento (Davis, 2004). Di conseguenza, sebbene la sua introduzione nelle razze ovine Laticauda e Bagnolese potrebbe migliorare la prolificità e quindi la produttività, tale pratica appare economicamente svantaggiosa poiché ragioni principali di allevamento di queste razze sono l'elevata rusticità e la possibilità di allevarle anche in aree disagiate senza l'uso di particolari tecniche di allevamento.

Il gene BMP15 è fondamentale nella specie ovina per una corretta follicologenesi, pecore nel cui corredo genetico sono presenti in entrambi i loci varianti alleliche codificanti per una proteina inattiva o mal funzionante risultano sterili, mentre individui eterozigoti per mutazioni del gene codificanti per forme inattive o malfunzionanti della proteina hanno un maggior tasso di ovulazione (Hanrahan et al., 2004).

Nel caso degli ovini di razza Laticauda e Bagnolese non risultano presenti mutazioni a carico della regione genetica esaminata del gene BMP15 responsabili di malfunzionamento della proteina codificata e l'unico SNP

evidenziato nella razza Bagnolese presenta una frequenza troppo bassa per spiegare la prolificità della razza.

Una definitiva indicazione a tal proposito potrà venire da una corretta analisi che metta in correlazione la tendenza al parto gemellare con la presenza/assenza del polimorfismo, ed a tal fine i soggetti risultati portatori della mutazione sono attualmente sotto osservazione, nonché dall'effettuazione di analisi di proteomica che evidenzino le differenze di comportamento della proteina con diversa composizione amminoacidica.

Il gene GDF 9 è coinvolto nella proliferazione delle cellule della granulosa e nella regolazione dei meccanismi ormonali, in particolare agisce sulla produzione del progesterone. Negli ovini risulta essere molto importante ai fini di una corretta maturazione dei follicoli ovarici.

Questo studio ha evidenziato la presenza di polimorfismi nell'esone 2 sia nella Laticauda che nella Bagnolese di cui potrebbero quindi rappresentare varianti alleliche caratterizzanti.

In particolare nell'ovino Laticauda sono presenti SNP al nt 617 ed al nt 1358 che non risultano segnalati in altre razze ed essendo entrambi responsabili di mutazioni a carico della sequenza amminoacidica studi di proteomica e valutazioni genealogiche saranno necessari per definire l'effettiva funzione di tali cambiamenti.

È interessante osservare come due varianti alleliche, la prima caratterizzata dagli SNP agli nt 471, 477 e 721, e la seconda caratterizzata dal solo SNP al nt 477 siano presenti in entrambe le razze avvalorando l'ipotesi di un antenore comune.

Tutti gli altri SNP risultano invece presenti o in una o nell'altra razza e rappresenterebbero quindi delle mutazioni che negli anni si sono generate separatamente nelle due razze.

Per confermare tali ipotesi e comprendere l'origine ed il significato di tali mutazioni nel gene GDF9 risulta essenziale esaminare un numero più ampio di individui in modo da poter associare le varianti alleliche non solo alla razza ma anche all'area di allevamento.

Di fatto i soggetti analizzati per questo studio sono stati scelti in modo da definire lo status genetico generale dei diversi allevamenti presenti nella Regione Campania e pertanto le frequenze alleliche riscontrate sono rappresentative della popolazione ma non dei singoli ceppi che le costituiscono.

L'isolamento della razza in una zona di allevamento ben precisa potrebbe giustificare l'esistenza di tante varianti alleliche che a causa del ridotto numero di individui esaminati per allevamento risultano avere una bassa frequenza nella popolazione e sembrerebbero non essere fissate.

Gli studi sulla prolificità condotti dal 1980 ad oggi sulla specie ovina ed in particolare sulle razze maggiormente prolifiche hanno consentito di scoprire numerosi geni responsabili di questo carattere, nonché i loro meccanismi d'azione correlati alle diverse varianti alleliche di volta in volta individuati.

I test del DNA sono fondamentali per poter utilizzare al meglio le diverse varianti alleliche di tali geni nell'ambito delle produzioni ovine e sono stati uno strumento molto utile per determinare le basi genetiche dell'elevata prolificità nelle diverse razze esistenti.

I risultati di questo studio consentono di definire le future linee di ricerca da seguire nelle razze ovine Laticauda e sulla Bagnolese per individuare varianti alleliche favorevoli alle produzioni di tali razze e mettere a punto test genetici con i quali identificare sin dalla nascita i soggetti potenzialmente più produttivi permettendo in tal modo di pianificare programmi di allevamento e selezione che consentano di ottenere rapidi miglioramenti nella produttività condizione essenziale affinché l'allevamento di queste razze risulti più redditizio ed economicamente sostenibile.

Da non dimenticare poi l'obiettivo più importante che questi studi hanno ossia comprendere meglio i meccanismi molecolari che stanno alla base della riproduzione.

BIBLIOGRAFIA

1. Associazione nazionale della pastorizia Roma. L'allevamento Ovino. II edizione. Tipolitografia Iodice.
2. Baird D.T. e Campbell B.K. (1998). Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate *Molecular Cellular Endocrinology* 145:89–95.
3. Bigi D. e Zanon A. (2008). Atlante delle razze autoctone Bovini, Equini, Ovicapriini, Suini allevati in Italia. Ed agricole.
4. *Bioinformatics for Geneticists* (2003). Edited by Michael R. Barnes and Ian C. Gray.
5. Bodensteiner K.J., Clay C.M., Moeller C.L., Sawyer H.R. (1999). Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 60:381–386.
6. Bodin L., Lecerf F., Pisselet C., SanCristobal M., Bibe B., Mulsant P. (2003) How many mutations are associated with increased ovulation rate and litter size in progeny of Lacaune meat sheep? In *Proceedings of the Third International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goats: 8–11 December 2003; Toulouse* Edited by: Bodin L. CD-ROM communication; 2003:2-11.
7. Bodin L., Di Pasquale E., Fabre S., Bontoux M., Monget P., Persani L., Mulsant P. (2007). A novel mutation in the bone morphogenetic

protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology*. 148(1):393-400.

8. Campbell B.K., Scaramuzzi R., Webb R. (1995). Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* (49):335–350.
9. Campbell, B.K., Souza, C.J.H., Skinner, A.J., Webb, R., and Baird, D.T. (2007). Enhanced response of granulosa and theca cells from sheep carriers of the FecB mutation in vitro to gonadotropins and bone morphogenetic protein-2, -4, and -6. *Endocrinology*, 147: 1608-1620.
10. Davis G.H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 37 (1):S11-S23.
11. Davis G.H., Bruce G.D., Dodds K.G. (2001). Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecXI) and Hanna (FecXH) sheep. *Proc Assoc Advancement Anim Breeding Genet* 14:175–178.
12. Davis G.H., Balakrishnan .L, Ross I.K., Wilson T., Galloway S.M., Lumsden B.M., Hanrahan J.P., Mullen M., Mao X.Z., Wang G.L., Zhao Z.S., Zeng Y.Q., Robinson J.J., Mavrogenis A.P., Papachristoforou C., Peter C., Baumung R., Cardyn P., Boujenane I., Cockett N.E., Eythorsdottir E., Arranz J.J., Notter D.R.(2005). Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecX(I)) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Anim Reprod Sci* 2005 in press.

13. Davis G.H., Galloway S.M., Ross I.K., Gregan S.M., Ward J., Nimbkar B.V., Ghalsasi P.M., Nimbkar C., Gray G.D., Subandriyo, Inounu I., Tiesnamurti B., Martyniuk E., Eythorsdottir E., Mulsant P., Lecerf F., Hanrahan J.P., Bradford G.E., Wilson T. (2002). DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biol Reprod.* 66(6):1869-74.
14. Davis G.H., Balakrishnan L., Ross I.K., Wilson T., Galloway S.M., Lumsden L.M., Hanrahan J.P., Mullen M., Mao X.Z., Wang G.L., Zhao Z.S., Zenge Y.Q., Robinson J.J., Mavrogenis A.P., Papachristoforou C., Peter C., Baumung R., Cardyn P., Boujenane I., Cockett N.E., Eythorsdottir E., Arranz J.J., Nottero D.R. (2006). Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Animal Reproduction Science* 92:87–96.
15. Davis G.H., Dodds K.G. and Bruce G.D. (1999). Combined effect of the Inverdale and Booroola prolificacy genes on ovulation rate in sheep *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* 13; 74–77.
16. Davis G.H., McEwan J.C., Fennessy P.F., Dodds K.G., Farquhar P.A. (1991). Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. *Biol Reprod* 1991; 44:620–624.

17. Davis G.H., McEwan J.C., Fennessy P.F., Dodds K.G., McNatty K.P., O WS(1992). Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biol Reprod* 1992, 46:636-640.
18. Davis G.H., Montgomery G.W., Allison A.J., Kelly R.W., Bray A.R.(1982). Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *N.Z.J. Agric. Res.* 1982;25:525–629.
19. De Paolis P.(1954). Indagini biometriche sulla razza popolazione “Laticauda” in Campania. *Zootecnia e Veterinaria*, IX, 242 – 249.
20. Dong J., Albertini D.F., Nishimori K., Kumar T.R., Lu N., Matzuk M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996, 383:531-535.
21. Dube J.L., Wang P., Elvin J., Lyons K.M., Celeste A.J. and Matzuk M.M. (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X linked and expressed in oocytes *Molecular Endocrinology* 12 1809–1817.
22. Elvin J.A., Yan C., Matzuk M.M.(2000). Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:10288-10293.
23. Fabre S., Pierre A., Mulsant P., Bodin L., Di Pasquale E., Persani L., Monget P., Monniaux D. (2006). Regulation of ovulation rate in

mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:20.

24. Feary E., S., Juengel J.L., Smith P., French M.C., O'Connell A.R., Lawrence S.B., Galloway S.M., Davis G.H., and McNatty K.P. (2007). Patterns of expression of messenger RNAs encoding GDF9, BMP15, TGFBR1, BMPR1B and BMPR2 during follicular development and characterization of ovarian follicular populations in ewes carrying the Woodlands FecX2W mutation. *Biology of Reproduction*, 77: 990-998.
25. Fogarty, N.M. (2009). A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production. *Small Rum. Res.*, 85: 75-84.
26. Galloway S.M., McNatty K.P., Cambridge L.M., Laitinen M.P., Juengel J.L., Jokiranta T.S., McLaren R.J., Luiro K., Dodds K.G., Montgomery G.W., Beattie A.E., Davis G.H., Ritvos O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000, 25:279-283.
27. Gilboa L., Notte E., Geissendorter T., Sebald W., Henis Y.L. and Knaus P. (2000). Bone morphogetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine threonine kinase receptors. *Mol. Biol. Cell*, 11: 1023-35.
28. Hanrahan J.P., Gregan S.M., Mulsant P., Mullen M., Davis G.H., Powell R., Galloway S.M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both

- increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (Ovis aries). Biol Reprod Apr 70(4):900-9.
29. Hayashi M., McGee E.A., Min G., Klein C., Rose U.M., van Duin M., Hsueh (1999). Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. Endocrinology 1999, 140:1236-1244.
30. Hafez E.S., Hafez B. (2011). Riproduzione negli animali da allevamento, Libreria Universitaria.it.
31. Heath D.A., Caldani M. and McNatty K.P. (1996). Relationships between the number of immunostaining gonadotropes and the plasma concentrations of gonadotrophins in ewes with and without the FecBB gene, Journal of Reproduction and Fertility 10673–78.
32. Jansen S., Vandepitte W., Bodin L. (2004). Genet. Sel. Evol. 36 2004, 543–562 543.
33. Javanmard A., Azadzadeh N., Esmailizadeh A.K. (2011). Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds. Vet Res Commun 35:157–167.
34. Juengel, J.L., Bodensteiner, K.L., Heath, D.A., Hudson, N.L., Moeller, C.L., Smith, P., Galloway, S.M., Davis, G.H., Sawyer, H.R., and McNatty, K.P. (2004). Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. Animal Reproduction Science, 82-83: 447-460.

35. Juengel, J.L., Hudson, N.L., Heath, D.A., Smith, P., Reader, K.L., Lawrence, S.B., O'Connell, A.R., Laitinen, M.P., Granfield, M., Groome, N.P., Ritvos, O. and McNatty, K.P. (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod*, 67: 1777-1789.
36. Laitinen M., Vuojolainen K., Jaatinen R., Ketola I., Aaltonen J., Lehtonen E., Heikinheimo M. and Ritvos O. (1998). A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis *Mechanisms of Development* 78:135–140.
37. Lecerf F., Mulsant P., Elsen J.M., Bodin L. (2002). Localisation and mapping of a major gene controlling ovulation rate in Lacaune sheep. In *Proceedings of the 7th WCGALP Volume 30*. Montpellier;:753-756.
38. Ledda A. (1992), *Il latte e la caseificazione in ovinicoltura*; UNAPOC-Roma.
39. Liao W.X., Moore R.K., Otsuka F., Shimasaki S.(2003). Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *J Biol Chem* 2003, 278:3713-3719.
40. Lord E.A., Lumsden J.M., Dodds K.G., Henry H.M., Crawford A.M., Ansari H.A., Pearce P.D., Maher D.W., Stone R.T., Kappes S.M.,

Beattie C.W. and Montgomery G.W. (1996). The linkage map of sheep chromosome 6 compared with orthologous regions in other species Mammalian Genome 7:373–376.

41. Matassino D., Zullo A. (1991). Alcuni risultati preliminari conseguiti dal primo programma di selezione della Laticauda - Atti del Convegno su Valorizzazione e Miglioramento della razza ovina Laticauda - 18 dicembre 1991 - Regione Campania 25-51.
42. McGrath, S.A., Esquela, A.F., Lee, S.J., (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. Mol. Endocrinol. 9, 131-136.
43. McNatty K.P., Juengel J.L., Reader K.L., Lun S., Myllymaa S., Lawrence S.B., Western A., Meerasahib M.F., Mottershead D.G., Groome N.P., Ritvos O., Laitinen M.P. (2005). Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. Reproduction 2005, 129:481-487.
44. McNatty K.P., Moore L.G., Hudson N.L., Quirke L.D., Lawrence S.B., Reader K., Hanrahan J.P., Smith P., Groome N.P., Laitinen M., Ritvos O., Juengel J.L. (2004). The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. Reproduction 2004, 128:379-386.
45. McNatty K.P., Heath D.A., Lundy T., Fidler A.E., Quirke L., O'Connell A., Smith P., Groome N., Tisdall D.J. (1999). Control of early ovarian follicular development Journal of Reproduction and Fertility (5)43–16.

46. McNatty K.P., Smith P., Moore .G., Reader K., Lun S., Hanrahan J.P., Groome N.P., Laitinen M., Ritvos O., Juengel .JL. (2005). Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate Mol Cell Endocrinol. 2005 Apr 29;234(1-2):57-66.
47. McNatty K.P., Juengel J.L., Reader K.L., Lun .S, Myllymaa S., Lawrence S.B., Western A., Meerasahib M.F., Mottershead D.G., Groome N.P., Ritvos O., Laitinen M.P.(2005). Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. Reproduction 2005, 129:481-487.
48. McNatty K.P., Lun S., Heath D.A., Ball K., Smith P., Hudson N.L., McDiarmid J., Gibb M., Henderson K.M (1986). Differences in ovarian activity between Booroola Merino ewes which were homozygous, heterozygous and non-carriers of a major gene influencing their ovulation rate. J Reprod Fertil 1986, 77:193-205.
49. Montgomery G.W., McNatty K.P., Davis G.H. (1992). Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. Endocr Rev 1992, 13:309-328.
50. Montgomery GW, Lord EA, Penty JM, Dodds KG, Broad TE, Cambridge L, Sunden SL, Stone RT, Crawford AM. The Booroola fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6. Genomics 1994; 22:148–153.

51. Montgomery G.W., Galloway S.M., Davis G.H., McNatty K.P. (2001). Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 121:843–852.
52. Moore, R.K., Erickson G.F. and Shimasaki S. (2004). Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15, 8.
53. Moore R.K., Shimasaki S. (2005). Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol Cell Endocrinol* 2005, 234:67-73.
54. Mulsant P., Lecerf F., Fabre S., Schibler L., Monget P., Lanneluc I., Pisselet C., Riquet J., Monniaux D., Callebaut .I, Crihiu E., Thimonier J., Teyssier J., Bodin L., Cognie Y., Chitour N., Elsen J.M. (2001) Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:5104-5109.
55. Nilson, E.E, Skinner, M.K. (2002). Growth and differentiation factor 9 stimulate progression of early primary but not primordial rat ovarian development. *Biol. Reprod*, 67(3): 1018-1024.
56. Orsillo N. (1996) Studio dell'attitudine alla caseificazione del tipo genetico ovino Bagnolese. Tesi di laurea.
57. Otsuka, F., Yao Z., Lee, T., Yamamoto S., Erickson, G.F. and Shimasaki, S. (2000). Bone morphogenetic protein-15:

- identification of target cells and biological functions. *J. Biol. Chem*, 275 (39): 523-528.
58. Pierre A., Fabre S., Mulsant P., Elsen J.M., Pisselet C., Monniaux D., and Monget P. (2002). Ces bone morphogenetic proteins qui régulent le quota ovulatoire. *Nouvelles Magasine*, 18 : 1195-1196.
59. Piper L.R., Bindon B.M., Davis G.H.(1985). The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola Merino. In *Genetics of Reproduction in Sheep* Edited by: Land RB, Robinson DW. London: Butterworths; 1985:115-125.
60. Piper L.R. and Bindon B.M. (1982). The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale. In: Piper, L.R., B.M. Bindon and R.D. Netherv (eds.), *The Booroola Merino*, p: 9. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Melbourne.
61. Silva B.D., Castro E.A., Souza C.J., Paiva S.R., Sartori R., Franco M.M., Azevedo H.C., Silva T.A., Vieira A.M., Neves J..P, Melo E.O.(2011). A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Anim Genet*. 2011 Feb;42(1):89-92.
62. Solimene R. ,Marrone R., Solimene R. (2001). Incidenza dei parti plurigemellari nella razza ovina Laticauda- *Giornate Scientifiche delle Facoltà di Medicina e Chirurgia, Farmacia, Medicina Veterinaria ed Agraria*, Napoli 14/15 giugno 2001, 230.

63. Souza C.J., MacDougall C., Campbell B.K., McNeilly A.S., Baird D.T.(2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *J Endocrinol* 2001, 169:R1-R6.
64. Shackell G.H., Hudson N.L., Heath D.A., Lun S., Shaw L., Condell L., Blay L.R. and McNatty K.P. (1993). Plasma gonadotrophin concentrations and ovarian characteristics in Inverdale ewes that are heterozygous for a major gene (FecXI) on the X chromosome that influences ovulation rate *Biology of Reproduction* 48 1150–1156.
65. Souza C.J., Campbell B.K., McNeilly A.S., Baird D.T. (2002). Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction* 2002, 123:363-369.
66. ten Dijke P., Korchynskyi O., Valdimarsdottir G., Goumans M.J.(2003) Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2003, 211:105-113.
67. Vacca G.M. , Dhaouadi A. , Rekik M., Carcangiu V. , Pazzola M. , Dettori M.L. (2010). *Small Ruminant Research* 88 67–71.
68. Vecchi G., Natalini S. ,Mattioli R.,Boattini B.,Boni P.,Cortini M. (1994). Indagine sulle Caratteristiche Merceologiche ed Igienico Sanitarie del Latte Ovino prodotto in Emilia Romagna. *Atti XI Congresso Nazionale SIPAOC*, pp. 423-426.

69. Walkden-Brown S.W. , Wolfenden D.H. and Piper L.R. (2009).
Biological and economic consequences of introgression of the FecB
mutation into Merino sheep in Australia. ACIAR proceedings 133,
pp100-110.
70. Webb R., Driancourt M.A. and Hanrahan J.P. (1998). Ovulation rate in
the ewe: mechanisms underlying genetic variation. In The 6th World
Congress on Genetics Applied to Livestock Production, University of
New England, Armidale, Australia pp 3–10.
71. Wilson T., Wu X.Y., Juengel J.L., Ross I.K., Lumsden J.M., Lord E.A.,
Dodds K.G., Walling G.A., McEwan J.C., O’Connell A.R., McNatty
K.P., Montgomery, G.W.(2001). Highly prolific Booroola sheep have a
mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic
protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and
granulosa cells. Biol. Reprod. 64,1225–1235.
72. Zullo A. (2005) Studio delle caratteristiche somatiche delle popolazioni
ovine e caprine a limitata diffusione per la definizione dello standard di
razza. Ed. D.I.S.C.I.Z.I.A. – I.S.B.N. 88-901572-2-4.

Siti internet consultati

1. http://statistiche.izs.it/portal/page?_pageid=73,12918&_dad=portal&_schema=PORTAL&op=nav_rep&p_report=plet_rep_r1_ovi_capr&p_titolo=Consistenza%20Capi%20Ovini%20e%20Caprini%20Risultante%20dai%20Censimenti%20Annuali
2. <http://agri.istat.it/jsp/dawinci.jsp?q=plB040000010000012000&an=2011&ig=1&ct=204&id=8A|9A>
3. <http://www.assonapa.com/>
4. <http://www.onaf.it/web/>
5. <http://www.agraria.it/regione/cap1.htm>