

ANALISI DELLA VARIABILITÀ GENETICA IN UNA POPOLAZIONE OVINA DI RAZZA MASSESE E STUDIO DI ASSOCIAZIONE CON PARAMETRI DI QUALITÀ DEL LATTE

A SURVEY OF THE GENETIC VARIABILITY IN MASSESE EWES AND ASSOCIATION ANALYSIS WITH MILK QUALITY TRAITS

ROBERTA CIAMPOLINI ⁽¹⁾, FRANCESCA CECCHI ⁽¹⁾, ELENA CIANI ⁽²⁾,
ELISA MAZZANTI ⁽¹⁾, MARIELLA TANCREDI ⁽³⁾,
BARBARA MATTEOLI ⁽³⁾, DARIO CIANCI ⁽⁴⁾

RIASSUNTO

Il presente lavoro ha come obiettivo la ricerca di associazioni tra marcatori microsatelliti e la composizione chimica del latte. È stato condotto uno studio su 68 pecore di razza Massese provenienti da un allevamento toscano. A partire da latte fresco, sono stati valutati: composizione chimica standard, contenuto in caseina e frazioni caseiniche, proteine seriche, pH e parametri reologici. I capi sono stati sottoposti a genotipizzazione impiegando 17 marcatori microsatelliti; sono, quindi, stati calcolati i valori di similarità genetica tra individui ed alcuni parametri genetici classici. Il numero medio di alleli per locus è risultato pari a 7,18 e l'eterozigosità osservata presentava variazioni tra 0,403 e 0,867 (media 0,677). La similarità genetica tra individui era 0,460. Cinque marcatori (BM8124, CSN3, BM1258, BMS468 e TGLA387) hanno mostrato una deviazione significativa dalle proporzioni di Hardy-Weinberg. Lo studio ha messo in evidenza alcuni microsatelliti con alleli significativamente associati a caratteri di composizione del latte ($P < 0,01$). In particolare, la significatività più alta ($P < 0,001$) è stata osservata per l'associazione dell'allele 2 del marcatore OIFNG con la α -lattoalbumina, dell'allele 10 del marcatore BL4 con il livello di immunoglobuline, dell'allele 2 del marcatore BMC1009 con il contenuto di grasso e dell'allele 9 del marcatore ILSTS42 con il parametro a_{30} . Sono necessari ulteriori approfondimenti al fine di convalidare i risultati preliminari ottenuti nel presente lavoro e si rende necessaria l'estensione dello studio ad un numero maggiore di soggetti e la tipizzazione di un numero maggiore di loci, principalmente sui cromosomi 3 e 20 dove mappano i marcatori risultati più interessanti nella presente analisi.

Parole chiave: variabilità genetica; marcatori microsatelliti; qualità del latte; ovini di razza Massese.

⁽¹⁾ Dipartimento di Produzioni Animali, Direttore Prof. Paolo Verità.

⁽²⁾ Dottorando in Produzioni Animali, Sanità ed Igiene nei Paesi a Clima Mediterraneo, Anno 2003.

⁽³⁾ Collaboratore esterno.

⁽⁴⁾ Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Direttore Prof. Valeria Casavola, Università di Bari.

Research supported by "ARSIA": "Valorizzazione della qualità del latte ovino prodotto in Toscana".

SUMMARY

Current research aims to establish statistical associations between DNA microsatellites and milk chemical composition. A trial was carried out on 68 Massese ewes reared in a farm of the Tuscany. The following parameters were evaluated on fresh milk: standard chemical composition, casein and its fractions, whey proteins, pH and rheological parameters. Animals were genotyped at 17 microsatellite loci. Genetic similarities among individuals and classical genetic parameters were evaluated. For each locus, average values of considered parameters were calculated in all the subjects carrying a given allele; these were compared statistically with the average values of subjects not carrying the allele, and the significance of the difference was estimated. The average number of alleles per locus resulted 7.18 and the observed heterozygosity ranged from 0.403 to 0.867 (0.677 medium value). The genetic similarity among individuals was 0.460. Five markers pointed out a significant deviation from the Hardy-Weinberg proportions (BM8124, CSN3, BM1258, BMS468 and TGLA387). The study revealed several microsatellites with alleles significantly linked to milk composition traits ($P < 0.01$). In particular the highest significance ($P < 0.001$) has been found for the allele 2 of OIFNG marker with α -lactalbumin, for the allele 10 of the BL4 marker with immunoglobulins, for the allele 2 of BMC1009 with fat, and for allele 9 of ILSTS42 with a_{30} . Further analyses are needed to validate these preliminary results, in particular increasing the number of subjects and of typed loci above all on the chromosomes 3 and 20 where the more interesting markers map.

Keywords: genetic variability; microsatellites marker; milk quality; Massese ewes.

INTRODUZIONE

Per molte specie animali, la ricerca di schemi produttivi ad alte risposte quantitative ha già condotto, anche in Italia, alla perdita di gran parte del germoplasma autoctono (bovini, suini, equini e, in misura minore, caprini; AA.VV., 2002). L'allevamento ovino resiste ancora nelle grandi linee, con le sue razze autoctone, peraltro sovrastate dalla pecora sarda ed affette dai gravi problemi legati alla contrazione drastica del patrimonio, nonché ad incroci e meticciami indisciplinati.

Trovare un equilibrio tra le disponibilità quantitative, la domanda crescente di qualità e la necessità di proteggere le risorse naturali ed il germoplasma animale è uno dei dilemmi attuali. È necessario ed urgente dedicare a queste razze una concreta attenzione, attraverso una meticolosa ricognizione del materiale genetico autoctono (AA.VV., 1996), valutandone accuratamente pregi e difetti, e procedendo alla analisi genomica di ciascuna popolazione in modo da consentirne il recupero e la definizione delle linee di miglioramento attraverso la stima della più efficace combinabilità.

La conservazione dei tipi genetici autoctoni e dei sistemi di allevamento tradizionali può, infatti, fornire a produttori e consumatori una maggiore possibilità di diversificazione dei prodotti derivati dalla trasformazione del latte, consentendo di meglio rispondere alle esigenze della nutrizione umana (Boyazoglu, 1992). È infatti ormai accertato che i prodotti ottenuti da razze autoctone, allevate secondo i tradizionali sistemi estensivi, hanno delle caratteristiche specifiche che li rendono diversi dai prodotti delle razze allevate nei sistemi intensivi e semintensivi.

In questo contesto la ricerca dal titolo “Valorizzazione della Qualità del latte ovino prodotto in Toscana”, condotta grazie ad un finanziamento ARSIA, vede per la prima volta effettuare analisi di genetica molecolare mediante marcatori microsatellite sul genoma della razza ovina Massese al fine di evidenziare il livello di variabilità genetica esistente al suo interno. I risultati ottenuti dalla presente indagine, sebbene di natura preliminare, possono contribuire al consolidamento delle razza ed al suo miglioramento, al fine di renderla suscettibile di valorizzazione economica nell’ambito dei sistemi di produzione a basso input e ad alta qualificazione delle produzioni.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Sono stati selezionati 68 animali con parentela non superiore al 6,25%, dai quali si è provveduto alla raccolta di campioni di latte e di sangue periferico ed alla estrazione del DNA.

Analisi chimiche

Sui campioni di latte sono state effettuate le analisi macro-qualitative, la distribuzione percentuale delle frazioni caseiniche e delle frazioni sieroproteiche e la determinazione dei parametri tromboelastografici, secondo le seguenti procedure:

- il pH del latte, l’estratto secco e le ceneri sono state determinate su tutti i campioni secondo le procedure standard;
- proteine, grasso e lattosio sono stati valutati mediante il Milkoscan (FOSS, Denmark);
- le frazioni caseiniche (α -CN, β -CN, γ -CN, κ -CN), sono state analizzate mediante elettroforesi PAGE secondo Gripon et al. (1978) e la loro distribuzione è stata valutata mediante il densitometro con Ultrascan XL (LKB-PHARMACIA, Sweden) dopo colorazione con il Blue di Coomassie;
- le frazioni siero-proteiche [β -serumprotein (BSA), immunoglobuline (IG), α -lattoalbumina (α -LA), β -lattoglobulina (β -LG)] sono state analizzate mediante RP-HPLC (Pellegrino et al., 1992) su colonna PLRP-S (POLYMER LAB, United Kingdom) ed è stata determinata la loro relativa percentuale;
- il tempo di coagulazione (T), la velocità di rassodamento del coagulo (K20) e la consistenza del coagulo (a_{30}) sono stati valutati mediante il Formagraph (Foss, Denmark) su 10 ml di latte a 37°C addizionato a 200 ml di caglio, a titolo 15.000 (HANSEN, Denmark) preventivamente diluito allo 0,8%.

Analisi del DNA

Il DNA è stato estratto da campioni di 8 ml di sangue periferico, utilizzando il metodo descritto da Jeanpierre (1987). Per questo lavoro sono stati impiegati 17 marcatori microsatellite. Le reazioni di PCR sono state condotte secondo la metodologia descritta da Vaiman et al. (1994) ed i frammenti amplificati sono stati separati mediante sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). I

dati sono stati, quindi, analizzati utilizzando i software dedicati GENESCAN 2.0 e GENOTYPER 2.0.

Analisi Statistica

Per l'elaborazione dei risultati, i parametri genetici classici (coefficienti di eterozigosi, difetto o eccesso di eterozigosi, rispetto di HW) sono stati stimati mediante i softwares Biosys e Arlequin, mentre le rassomiglianze genetiche tra soggetti sono state calcolate mediante l'Individual Multilocus Genotype di Ciampolini et al. (1995).

Per rilevare le possibili associazioni significative tra parametri di qualità del latte e marcatori microsatelliti, per ciascun locus, i valori medi dei parametri di qualità dei soggetti portatori di ogni alleles sono stati confrontati statisticamente con i valori dei soggetti non portatori; le significatività delle differenze sono state stimate usando il software J.M.P. (2002).

RISULTATI E DISCUSSIONI

I marcatori utilizzati hanno rivelato un elevato livello di polimorfismo nella razza Massese; il numero medio degli alleli per locus è infatti di 7.18 con estremi di 2 alleli per il marcatore OIFNG e 15 per il marcatore ILSTS087 (Tab. I).

Tab. I. Principali parametri genetici per i loci analizzati. *Main genetic parameters for the analyzed loci.*

Marker	Chromosome	Total sample (N = 68)			
		N _a	H _{exp}	H _{obs}	P value
BL4	3	12	0,853	0,814	0,8523
BM1258	20	9	0,426	0,828	0,000
BM8124	6	3	0,324	0,403	0,040
BMC1009	3	6	0,574	0,624	0,568
BMS468	20	3	0,338	0,453	0,039
CSN3	6	9	0,676	0,805	0,010
ILSTS018	6	5	0,632	0,678	0,204
ILSTS042	3	13	0,779	0,757	0,242
ILSTS087	6	15	0,809	0,873	0,576
LYZ	3	4	0,500	0,485	0,559
MAF214	16	5	0,529	0,571	0,317
MAF23	3	4	0,735	0,646	0,311
OARVH34	3	8	0,824	0,806	0,619
OIFNG	3	2	0,456	0,488	0,797
OLADRB2	20	12	0,838	0,867	0,381
OMHC1	20	8	0,779	0,662	0,228
TGLA387	20	4	0,254	0,744	0,000

Tab. II A. Associazioni significative tra marcatori microsatelliti e composizione chimica (Proteine e grasso). *Significant associations between microsatellite markers and milk chemical composition (Protein and fat).*

Locus Allele	N (%)	Protein %	Protein Q	Fat %	Fat Q.
OMCH1	allele 7 ete others	13,23%		1,15* 1,02	
	allele 8 ete others	25%		0,96* 1,06	
OIFNG	allele 2 omo others	16,18%			7,13* 5,84
					1,33* 1,06
BMS486	allele 2 omo others	55,22%	5,65* 5,98		
ILSTS42	allele 2 ete others	49,25%			5,52* 6,52
	allele 9 ete others	16,42%			6,90* 5,86
	allele 12 ete others	14,92%	6,19* 5,73		
BL4	allele 7 ete others	41,18%			
	allele 10 ete others	26,47%			5,57* 6,30
BM1258	allele 7 omo others	10,45%			
ILSTS018	allele 5 ete others	13,23%			
TGLA387	allele 1 omo others	25,37%		0,96* 1,07	
BM8124	allele 2 omo others	61,76%	5,94* 5,59		
BMC1009	allele 2 omo others	32,35%			6,88*** 5,69
	allele 3 ete others	39,70%			
*: P<0,05; **:P<0,01; ***:P<0,001. Q = quantity; % = percentage					

Tab. II B. Associazioni significative tra marcatori microsatelliti e composizione chimica (Lattosio, ceneri e residuo secco). *Significant associations between microsatellite markers and milk chemical composition (lactose, ash and DM).*

Locus	Allele	N (%)	Lactose %	Lactose Q.	Ash %	Ash Q. DM
OMCH1	allele 7 ete	13,23%	5,79*	1,11**		19,02**
	others		5,08	0,90		17,67
	allele 8 ete	25%				
	others					
OIFNG	allele 2 omo	16,18%	4,63*			
	others		5,29			
BMS486	allele 2 omo	55,22%				
	others					
ILSTS42	allele 2 ete	49,25%				
	others					
	allele 9 ete	16,42%				
	others					
BL4	allele 12 ete	14,92%				
	others					
	allele 7 ete	41,18%	5,48*			
	others		4,98			
	allele 10 ete	26,47%				
	others					
BM1258	allele 7 omo	10,45%			0,91*	
	others				0,84	
ILSTS018	allele 5 ete	13,23%		1,07*	0,76**	
	others			0,91	0,86	
TGLA387	allele 1 omo	25,37%			0,89*	17,19*
	others				0,83	18,14
BM8124	allele 2 omo	61,76%				
	others					
BMC1009	allele 2 omo	32,35%	5,48*			
	others		4,99			
	allele 3 ete	39,70%				
	others					

*: P<0,05; **:P<0,01; ***:P<0,001.
Q = quantity; % = percentage

Tab. III A. Associazioni significative tra marcatori microsatelliti e parametri tecnologici. *Significant associations between microsatellite markers and milk technological parameters.*

Locus	Allele	N (%)	a_{\max}	pH	T	K20
OLADRB2	allele 3 ete	14,70%			20,81*	2,88*
	others				27,28	4,08
	allele 8 ete	35,29%		6,70*		
	others			6,61		
BL4	allele 11 ete	8,82%			34,45**	5,23*
	others				25,35	3,74
ILSTS42	allele 2 ete	49,25%		6,66*		
	others			6,61		
	allele 9 ete	16,42%	67,14***			
	others		58,71			
CSN3	allele 2 ete	12,00%		6,72*	37,74**	5,80**
	others			6,62	25,23	3,72
	allele 9 ete	13,43%	67,28**			
	others		59,01			
BM1258	allele 7 omo	10,45%	50,71**			
	others	61,46				
	allele 7 ete	10,44%	52,78*			
	others		61,19			

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.
T = coagulation time; a_{\max} = curd firmness; K20 = rate of firming.

L'eterozigosi osservata oscilla da 0,254 (TGLA387) a 0,853 (BL4) con un valore medio di 0,607. Cinque loci presentano valori significativi di difetto di eterozigosi; in particolare, i microsatelliti BM1258 e TGLA387 manifestano un difetto di eterozigosi altamente significativo ($P < 0,001$). I patterns di deviazione dalle proporzioni attese per i loci analizzati suggeriscono un possibile ruolo del fenomeno di trascinamento selettivo ("genetic hitchhiking"). Quanto alla variabilità intrapopolazione, il valore medio di 0,416 (0,018 SD) della rassomiglianza genetica sembrerebbe caratterizzare una popolazione (almeno quella analizzata) sufficientemente omogenea, sulla quale il processo selettivo avrebbe già agito efficacemente. È necessario evidenziare, tuttavia, che mancano riferimenti bibliografici per la specie ovina in termini di similarità genetica e che, pertanto, tale valore viene confrontato con quanto finora osservato nella specie bovina (Ciampolini et al., 1995); in aggiunta, l'omogeneità osservata a livello genetico non risulta altrettanto evidente sui parametri

Tab. III B. Associazioni significative tra marcatori microsatelliti e parametri tecnologici. *Significant associations between microsatellite markers and milk technological parameters.*

Locus	Allele	N (%)	Q _a _{max}	pH	T	K20
OMCH1	allele 4 omo	20,59%			22,08*	3,15*
	others				27,45	4,10
	allele 8 ete	25%		6,68*		
	others			6,62		
BMC1009	allele 2 omo	32,35%	65,12**			
	others		57,84			
	allele 2 ete	41,18%				4,36*
	others					3,50
	allele 3 ete	39,70%	55,21**			
	others		63,49			
TGLA387	allele 1 omo	25,37%	55,15*			
	others		62,41			
ILSTS087	allele 7 ete	30,88%		6,67*		
	others			6,61		
LYZ	allele 1 omo	45,59%		6,67***	28,92*	
	others			6,60	24,29	
	allele 1 ete	45,59%		6,60*		
	others			6,66		
*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001.						
T = coagulation time; a _{max} = curd firmness ; K20 = rate of firming.						

di qualità del latte, che sono altamente variabili e consentono la caratterizzazione dell'intero campione in sottopopolazioni ben distinte tra loro (dati non riportati).

Lo studio delle associazioni tra marcatori microsatelliti e parametri qualitativi del latte (Tab. II A, II B, III A, III B, IV A, IV B, V A e V B) ha rivelato diversi microsatelliti significativamente associati a caratteri di composizione del latte (P<0,01). In particolare la più alta significatività (P<0,001) è stata trovata per l'associazione tra l'allele 2 del marcatore OIFNG con alti valori di immunoglobulina e con bassi valori di α -lattoalbumina. Al contrario i soggetti portatori dell'allele 10 del microsatellite BL4 hanno mostrato significativamente bassi valori di immunoglobuline (P<0,001). Si può anche osservare che l'allele 2 di BMC1009 influenza il grasso totale del latte, mentre l'allele 9 di ILSTS42 influenza la consistenza del coagulo (P<0,001).

Tab. IV A. Associazioni significative tra marcatori microsatelliti e frazioni caseiniche. *Significant associations between microsatellite markers and milk serum casein.*

Locus	Allele	N (%)	Casein %	Casein Q.	γ -CN %	β -CN %	κ -CN %	α -CN %
MAF23 others	allele 1	14,70%	4,22*					
	allele 2	4,70				31,80*		47,79*
	others	29,41%				34,76		44,44
OARVH34	allele 1	48,53%						43,75*
	others							46,98
OLADRB2	allele 2	14,70%					12,26**	
	others						14,29	
	allele 3	14,70%			6,30*			
	others				4,61			
	allele 6	13,23%			3,35*			
	others				5,10			
allele 8	35,29%		4,87*		5,96**		43,58*	
	others		4,50		4,25			46,47
OIFNG	allele 2	16,18%			3,30*	36,70*		
	others				5,14	33,38		
OMCHI	allele 3	31,34%				35,62*		43,40*
	others					33,09		46,37
	allele 4	70,15%				34,85**		44,34**
	others					31,60		48,01
	allele 7	13,23%						
	others							
allele 8	25%							
	others							0,757*
								0,848
BMS486	allele 1	11,76%					15,51*	
	others						13,79	
	allele 2	55,22%					13,49*	
	others						14,59	

*: P<0,05; **:P<0,01; ***:P<0,001.

Q = quantity; % = percentage

Tab. IV B. Associazioni significative tra marcatori microsatelliti e frazioni caseiniche. *Significant associations between microsatellite markers and milk serum casein.*

Locus	Allele	N (%)	Casein %	Casein Q.	γ -CN %	β -CN %	κ -CN %	α -CN %
ILSTS018	allele 1	20,59%	4,95*					
	others		4,55					
BL4	allele 4	45,59%			32,03**	14,68*		
	others				35,38	13,42		
	allele 10 others	26,47%			5,87* 4,95			
BM8124	allele 2	27,94%	4,32*					
	others		4,75					
	allele 2	61,76%	4,82**	0,86**				
	others		4,32	0,77				
	allele 3 others	27,94%	4,31* 4,76	0,77** 0,85				
TGLA387	allele 1	25,37%		0,77*			13,00*	
	others			0,85			14,46	
	allele 4 others	13,43%			2,81*** 5,18			
ILSTS42	allele 2	22,39%			6,64**	36,35*		41,23**
	others				4,35	33,18		46,65
	allele 9	16,42%			3,25**			
	others				5,18			
BM1285	allele 1	14,92%			3,03**			
	others				5,19			
	allele 7 others	11,94%			30,29* 34,37			
BMC1009	allele 3	39,70%						43,16**
	others							46,97
	allele 4 others	27,94%	4,89* 4,53					

*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001.

Q = quantity; % = percentage

Tab. V A. Associazioni significative tra marcatori microsatelliti e proteine sieriche. *Significant associations between microsatellite markers and milk serum protein.*

Locus	Allele	N (%)	IG%	IG Q.	SPmg/100 g	SP %	β -LG %	β -LG Q.	α -LA %	BSA %	BSA Q
MAF23	allele 1	14,70%									53,76*
	others										38,19
	allele 2	29,41%	14,79*	159,84*							
	others		17,24	220,14							
MAF24	allele 3 homoz.	38,80%					58,64**			4,25*	
	others						63,39			3,07	
	allele 3 heteroz.	46,27%					63,75*			2,98	
	others						59,67			4,00	
OIFNG	allele 2	16,18%	20,58***	288,14**					13,39***		
	others		15,80	187,02					19,31		
	allele 1	45,59%							19,95*		
	others								17,11		
OLADRB2	allele 5	26,47%						633,14*			
	others							752,13			
	allele 6	13,23%		282,14*	1427,84*	1,43*		857,64*			
	others			189,69	1135,53	1,13		700,88			
OMCHI	allele 4	20,59%	14,39*	150,84							
	others		17,07	215,66*							
BMS486	allele 2	55,22%	15,47*								
	others		17,79								
	allele 1	11,76%		299,56**		1,46**		882,42*			
	others			188,90		1,13		700,18			

*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001.

Q = quantity; % = percentage

IG = immunoglobulin; SP = serumprotein; β -LG = β -lactoglobulin; α -LA = α -lactalbumin; BSA = β -serumalbumin.

CONCLUSIONI

Lo studio ha messo in evidenza un elevato livello di polimorfismo per la maggior parte dei loci microsatellite impiegati. Tuttavia, la popolazione sembra essere caratterizzata da una certa omogeneità genetica, ascrivibile, almeno in parte, alla azione indiretta della selezione; la eventuale presenza di linkage tra i loci STR analizzati e geni che influenzano caratteristiche di interesse produttivo o funzionale potrebbe, infatti, aver determinato un effetto di “trascinamento selettivo” tale da spiegare la riduzione della variabilità genetica (ed il conseguente aumento della similarità genetica) osservata a carico di marcatori anonimi del DNA; in aggiunta, non può essere escluso un possibile ruolo legato alla presenza, all’interno della popolazione, di soggetti con un livello di parentela solo relativamente moderato, che potrebbe aver contribuito alla omogeneità genetica messa in evidenza nella popolazione in esame.

La disponibilità di informazioni fenotipiche relative ai principali caratteri qualitativi del latte ha, infine, consentito di osservare interessanti associazioni tra marcatori molecolari e parametri chimico-tecnologici del latte di pecora Massese. Questi risultati incoraggiano a proseguire nelle ricerche, con ulteriori analisi che confermino tali evidenze preliminari, in particolare ampliando il numero dei soggetti ammessi al lavoro e dedicando attenzioni specifiche ad un maggior numero di loci, soprattutto sui cromosomi 3 e 20, dove mappano i marcatori risultati dal presente studio maggiormente meritori di approfondimento.

BIBLIOGRAFIA

- AA.VV. (1996). Atti Convegno “Ruolo del germoplasma animale autoctono nella salvaguardia del territorio”, Bari, 17 settembre 1996.
- AA.VV. (2002). Risorse genetiche animali autoctone della Toscana. ARSIA.
- BOYAZOGLU J. (1992). L'allevamento ovino da latte nel bacino mediterraneo. *L'Allevatore di Ovini e Caprini*, 9: 3-8.
- CIAMPOLINI R., MOAZAMI-GOUDARZI K., VAIMAN D., DILLMANN C., MAZZANTI E., FOULLEY J.L., LEVEZIEL H., CIANCI D. (1995). Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphism permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *J. Anim. Sci.*, 73: 3259-3268.
- JEANPIERRE M. (1987). A rapid method for purification of DNA blood. *Nucl. Ac. Res.*, 15: 9611.
- J.M.P. (2002). User's Guide (Version 5.0) Statistical Analysis System Inst., Cary, NC, U.S.A.
- GRIPON J.C., DESMAZEAUD M.J., LE BARS D., BERGERE J.L. (1978). Etude du role des microorganismes et des enzymes au cour de la maturation des fromages. II. Influence de la prèsure commerciale. *Lait*, 55: 502-516.
- PELLEGRINO L., TIRELLI A., MASOTTI F. (1992). Detection of cow milk in non-bovine cheese by HPLC of whey proteins. 2 - Application to ewe's milk cheese. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 43: 297-310.
- VAIMAN D., MERCIER D., MOAZAMI-GOUDARZI K., EGGEN A., CIAMPOLINI R., LEPINGLE A., VELMALA R., KAUKINEN J., VARVIO S. L., MARTIN P., AND LEVEZIEL H. (1994). A set of 99 cattle microsatellites: Characterization, syntenic mapping and polymorphism. *Mamm. Genome*, 5: 288.