

LA STIMA DELLA VARIABILITÀ GENETICA DELLA RAZZA
CHIANINA ATTRAVERSO I DATI GENEALOGICI
E MOLECOLARI: IL CONFRONTO TRA PARENTELE
E RASSOMIGLIANZA GENETICA

THE EVALUATION OF THE GENETIC VARIABILITY OF THE CHIANINA
BREED USING GENEALOGICAL AND MOLECULAR DATA. NOTE II:
THE COMPARISON BETWEEN RELATIONSHIP COEFFICIENTS
AND GENETIC SIMILARITY

FRANCESCA CECCHI ⁽¹⁾, ROBERTA CIAMPOLINI ⁽¹⁾, ROBERTO LEOTTA ⁽¹⁾,
DAVIDE MEI ⁽²⁾, ENZA POLIZZI ⁽²⁾, DARIO CIANCI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

Sono stati considerati i dati genealogici e molecolari di 187 bovini di razza Chianina, suddivisi per sesso e provincia di provenienza. Sulla base delle loro parentele note (1300 soggetti in totale), sono stati calcolati i coefficienti di parentela additiva tra i soggetti, il coefficiente di consanguineità di ogni soggetto ed il coefficiente di parentela medio all'interno delle province. Mediante l'impiego della Cluster Analysis, sulla matrice dei coefficienti di parentela dei 187 soggetti, sono stati evidenziati 19 gruppi di parenti, con una parentela media compresa tra 0,125 e 0,500. La provincia con la parentela media più alta è risultata Perugia ($a_{ij} = 0,194$), mentre Grosseto e Firenze non hanno fatto registrare alcuna parentela al loro interno. Esistono limitati legami di parentela tra i soggetti di province diverse. Il confronto tra la rassomiglianza genetica ottenuta con l'IMG e le parentele additive dei soggetti non sempre ha indicato coerenza nei due metodi di stima. Questo può essere spiegato dal fatto che le parentele stimano la probabilità di geni identici per discendenza nelle ultime generazioni considerate, in questo caso sei, mentre l'IMG stima tutte le rassomiglianze conservate o disperse in tutto il processo evolutivo.

Parole chiave: variabilità genetica, razza Chianina, parentele, rassomiglianza genetica.

⁽¹⁾ Dipartimento di Produzioni Animali - Direttore Prof. Dario Cianci.

⁽²⁾ Collaboratori esterni.

Ricerca eseguita con finanziamenti ARSIA: "Progetto per la valorizzazione del materiale genetico bovino toscano e della produzione della carne; Sottoprogetto 1: Studio della variabilità genetica".

Il lavoro spetta in parti uguali agli Autori.

SUMMARY

The genealogical and molecular data of 187 Chianina bulls, subdivided for sex and province of origin, were considered. On the basis of their relationships (1300 subjects in total), the coefficients of additive relationship between subjects and the consanguinity coefficients of each subject were estimated. By using the Cluster Analysis on the matrix of the coefficients of relationship of the 187 individuals, 19 groups of relative subjects were identified, with an average relationship ranging between 0.125 and 0.500. The province with the higher average relationship resulted Perugia, while Grosseto and Florence don't exhibit any relationship. Very few bound exist between the subjects of different provinces. The comparison between genetic similarities estimated by the IMG method and the additive relationship not always gave a full consistency of the two methodology.

Key words: genetics variability, Chianina breed, relationship coefficients, genetics likeness.

INTRODUZIONE

La caratterizzazione genetica di una popolazione e la sua suddivisione in sottopopolazioni è tema di interesse quasi inesauribile e gli strumenti disponibili sono divenuti via via maggiori con l'avvento delle cosiddette biotecnologie. Tra gli indicatori di rassomiglianza genetica tra individui annoverano le distanze di Cavalli Sforza & Edwards (1967) ed il più recente Genotipo Multilocus Individuale (Ciampolini e coll., 1994 e 1995); altri indicatori, usati comunemente in genetica quantitativa, sono i coefficienti di parentela, quali il coefficiente di parentela additiva, di Malecot ed il coefficiente di consanguineità tra individui di Falconer, impiegato per lo più in umana.

In una nota precedente Ciampolini e coll. (2001) hanno studiato la variabilità genetica di 187 soggetti di razza Chianina, appartenenti a province diverse, mediante l'analisi del polimorfismo dei marcatori genomici microsatelliti. I risultati hanno sottolineato la grande eterogeneità del materiale genetico, evidente soprattutto per la popolazione nel suo complesso, che si riduce progressivamente considerando aree di allevamento più ristrette. Così, tra le diverse province allo studio, quella di Siena ha mostrato una realtà a se stante, sebbene siano rilevate delle similarità genetiche con il gruppo costituito da Terni, Firenze, Arezzo e Perugia.

Scopo della presente ricerca è stato quello di evidenziare le possi-

bili relazioni esistenti tra indicatori della variabilità genetica effettuati con l'impiego di marcatori molecolari (Ciampolini e coll., 2001) e altri di somiglianza genetica usati in genetica quantitativa, come i coefficienti di parentela additiva e l'applicazione di metodi di analisi multivariata (Cluster analysis) per la costituzione di gruppi di individui simili in base al valore dei coefficienti di parentela.

MATERIALI E METODI

Sono stati considerati i dati genealogici e molecolari di 187 soggetti di razza Chianina suddivisi per provincia di appartenenza e sesso.

Analisi genomica - È stata eseguita secondo quanto riportato in una precedente nota (Ciampolini e coll., 2001).

Analisi statistica: la stima della variabilità attraverso l'impiego di metodi di genetica quantitativa è stata sviluppata secondo alcune tappe:

- per evidenziare l'origine del materiale genetico è stata effettuata l'associazione tra la "provincia di provenienza dei tori padri" e delle "vacche madri" con i soggetti testati sempre suddivisi per provincia di appartenenza e anno di nascita;
- sono stati calcolati i coefficienti di parentela additiva tra 1487 soggetti coinvolti (187 soggetti in prova e loro genealogia), suddivisi in sei generazioni, ed il coefficiente di consanguineità di ogni soggetto, utilizzando la procedura "Proc inbreed" del S.A.S. (1999);
- per individuare gruppi di soggetti parenti è stata applicata la Cluster analysis, con il "single linkage method" (calcola le distanze tra oggetti o gruppi tra loro più vicini) sulla matrice dei coefficienti di parentela dei 187 soggetti in prova (JMP, 1996);
- all'interno di ogni gruppo, dopo aver escluso il valore del coefficiente di parentela additiva di un soggetto con se stesso, è stato calcolato il coefficiente di parentela medio, utilizzando la seguente formula:

$$\hat{a} = \sum_i^{1..n} a_{ij} / (n^2 - n)$$

dove n = numero dei soggetti del gruppo (o classe).

È stato calcolato il coefficiente di parentela medio all'interno delle varie Province.

È stata effettuata l'associazione tra famiglie e province di appartenenza.

La stima della variabilità attraverso l'impiego di metodi di genetica molecolare ha previsto l'applicazione del pacchetto Byosis per il calcolo delle frequenze alleliche, del rispetto delle proporzioni di Hardy-Weinberg, dell'eccesso o difetto di eterozigoti, nonché della distanza genetica secondo Cavalli Sforza & Edwards (1967).

Le rassomiglianze genetiche sono state stimate con la metodologia di Ciampolini e coll. (1995) che prevede l'impiego del Genotipo Multilocus Individuale (IMG).

Ogni soggetto è stato definito mediante il proprio genotipo multilocus (nel nostro caso 20 loci di microsatelliti) costituito da una serie di 40 alleli per ogni animale. Per stimare la rassomiglianza genetica tra due individui o tra due gruppi di individui, viene calcolata la proporzione (P) di alleli comuni (A) in relazione alle $2L$ possibilità (L = numero di loci considerati).

La rassomiglianza genetica è misurata da $P = A/2L$ e la distanza genetica è $1-P$. Le rassomiglianze calcolate tra ogni coppia di soggetti sono mediate per ottenere valori di rassomiglianza entro razze o sottopopolazioni. Per stimare la rassomiglianza (o la distanza genetica) tra razze o sottopopolazioni vengono calcolati i valori medi delle rassomiglianze tra ogni soggetto di un gruppo e ciascun soggetto del gruppo a confronto. Per avere un confronto con i dati genealogici, il campione studiato della razza Chianina è stato suddiviso in sottopopolazioni secondo le province di allevamento.

Il confronto tra i dati scaturiti dai due tipi di analisi statistica della variabilità genetica è stato eseguito calcolando la differenza tra i coefficienti di parentela additiva medi e la rassomiglianza genetica per ogni provincia e, all'interno di questa, per ogni famiglia evidenziata con la Cluster analysis. Al fine di evidenziare correlazioni tra i dati genealogici e i valori di rassomiglianza genetica, sono state eseguite le correlazioni non parametriche di Spearman & Kendall.

Inoltre è stata analizzata la distribuzione dei soggetti ad alta rasso-

miglianza genetica (HGS) ed a bassa rassomiglianza genetica (LGS), raggruppamenti eseguiti in base all'IMG (Ciampolini e coll., 2001), all'interno delle varie province e le famiglie evidenziate con la Cluster analysis.

Tutte le elaborazioni sono state eseguite con l'uso del pacchetto statistico JMP (1996).

RISULTATI

L'area di allevamento dei soggetti analizzati

I 187 soggetti della prova provengono soprattutto da allevamenti delle province di Siena (60 soggetti), Arezzo (35), Terni (20), Pisa (17), Livorno (15), Grosseto (11), Firenze (19) e Perugia (10).

Nella tabella 1 è riportata la distribuzione dei soggetti testati per sesso e Provincia di appartenenza; come possiamo vedere la maggior parte dei soggetti di Grosseto, Pisa, Siena e la totalità dei soggetti di Terni sono di sesso femminile, tutti i soggetti di Perugia e Firenze sono maschi, mentre a Livorno i due sessi sono distribuiti equamente.

Nella Tabella II è riportata la provenienza dei padri dei soggetti testati: questi provengono soprattutto dalle Province di Siena, Perugia, ed Arezzo; questi dati sono in accordo con quanto riportato da Cecchi e coll. (2001) sulla stessa razza ma sui soggetti in prova di performance.

A conferma di quanto rilevato in quest'ultimo lavoro, la provincia di Siena risulta essere quella che utilizza maggiormente i riproduttori locali (il 100% vs. all'80,57% rilevato nella ricerca sui soggetti in prova di performance), seguita da Perugia (100% vs. 43,69%), Firenze (73%), Arezzo (70,59% vs. 43,18%) e Terni (52,63%). Livorno e Pisa invece utilizzano soprattutto i riproduttori provenienti da altre provin-

Tab. I. Distribuzione dei soggetti testati per sesso e provincia di appartenenza (%).

	AR	FI	GR	LI	PG	PI	SI	TR
F	2,9	0	65,0	50,0	0	70,6	56,7	100
M	97,1	100	35,0	50,0	100	29,4	43,3	0

Tab. II. Provenienza dei padri dei soggetti (%).

Prov. Padri	Provincia soggetti							
	Area 1			Area 2			Area 3	
	Arezzo	Terni	Firenze	Perugia	Siena	Grosseto	Livorno	Pisa
Arezzo	70,59					44,44	8,33	18,75
Grosseto						11,12		
Livorno							41,67	6,25
Perugia				100			8,33	
Firenze			73,00					
Pisa								12,25
Siena	29,41	52,63	27,00		100	44,44	41,67	62,50
Terni		47,34						

ce (58,33% e 87,50% rispettivamente); inoltre mentre Livorno importa in uguale misura tori provenienti da Siena (41,67%), Pisa si serve ancor più di riproduttori provenienti da allevamenti senesi (62,50%). Stesso andamento si rileva anche per la Provincia di Grosseto.

I risultati rilevati in questa nota ed in un lavoro precedente (Cecchi e coll., 2002), non concordano rispetto a quanto rilevato in una nota precedente (Ciampolini e coll., 2002) relativamente alle rassomiglianze genetiche tra province. Infatti i nostri risultati sembrano indicare che Pisa e Livorno siano molto vicini a Siena in quanto importano i riproduttori soprattutto da quest'ultima provincia. Nel lavoro di Ciampolini e coll. (2002) i valori della rassomiglianza genetica indicano Pisa, Livorno e Grosseto, che costituiscono il l'area di rassomiglianza 3, molto più distanti geneticamente rispetto alle altre province, appartenenti all'area di rassomiglianza genetica 1.

I padri dei soggetti testati di Arezzo provengono soprattutto dalla stessa Provincia e da Siena (con un rapporto 2:1).

Come è logico attendersi, a differenza di quanto visto per i padri, le madri sono normalmente della stessa provincia dei figli (Tab. III); è comunque interessante rilevare come una buona percentuale di madri dei soggetti esaminati a Pisa ed a Livorno provenga dalla provincia di Siena (31,25 e 16,67 % rispettivamente).

Tab. III. Provenienza delle madri dei soggetti della prova (%).

Prov. Padri	Provincia soggetti							
	Area 1			Area 2			Area 3	
	Arezzo	Terni	Firenze	Perugia	Siena	Grosseto	Livorno	Pisa
Arezzo	100					33,33		
Grosseto						66,67	8,33	
Livorno							75,00	
Perugia				100				
Firenze			100					
Pisa								68,75
Siena		5,00			91,67		16,67	31,25
Terni		95,00			8,33			

Famiglie, parentela e confronto con la rassomiglianza genetica

L'impiego della Cluster analysis ha permesso di formare gruppi di individui con un certo grado di parentela. Infatti, sono state rilevate 19 famiglie, o clusters, con un numero di componenti superiore o uguale a due, per un totale di 92 soggetti e 10 gruppi di soggetti parenti, con un numero di componenti superiore a 4 soggetti, per un totale di 69 individui. Nessun soggetto è risultato essere consanguineo.

Gran parte delle 19 famiglie sono costituite da gruppi di mezzi fratelli ($a_{ij} = 0,250$); soltanto una è composta da un padre ed un figlio ($a_{ij} = 0,500$) e una, con sei componenti, da cugini ($a_{ij} = 0,125$).

Per quanto riguarda la parentela media all'interno delle varie province, i risultati sono riportati nella Tabella IV. Come possiamo vedere le province di Grosseto e di Firenze non ha fatto registrare soggetti parenti, la parentela media è infatti nulla; all'opposto, la provincia di Perugia è quella con il coefficiente di parentela medio più alto (0,194) e questo è dovuto al fatto che l'80% dei soggetti sono parenti, ovvero mezzi fratelli di padre ($a_{ij} = 0,250$).

La provincia di Siena è quella che ha fatto registrare il numero maggiore di famiglie, 9 per un totale di 35 soggetti; anche se la parentela media, calcolata su tutti e 60 i soggetti, non è molto elevata ($a_{ij} = 0,0135$), si osservano 7 gruppi di mezzi fratelli, 1 gruppo di cugini e 1 gruppo costituito da padre e figlio, parentele tutte confermate dallo

Tab. IV. Parentele e rassomiglianza genomica media per Provincia e famiglie.

Provincia		Soggetti n°	Parentela media	Rassomiglianza genomica	Differenza media
SIENA		60	0,014	0,395	0,381
Famiglie	9	35	0,255	0,462	0,207
AREZZO		35	0,041	0,453	0,412
Famiglie	5	30	0,250	0,497	0,247
PISA		17	0,017	0,360	0,343
Famiglie	1	4	0,250	0,513	0,263
PERUGIA		10	0,194	0,482	0,288
Famiglie	1	8	0,250	0,498	0,248
LIVORNO		15	0,011	0,387	0,376
Famiglie	1	3	0,250	0,513	0,263
TERNI		20	0,057	0,429	0,372
Famiglie	2	12	0,250	0,447	0,197
GROSSETO		11	0,000	0,460	0,460
Famiglie	0	0			
FIRENZE		19	0,000	0,460	0,460
Famiglie	0	0			

studio delle relative genealogie. Anche Arezzo e Terni, i cui coefficienti di parentela medi sono risultati intermedi a quelli di Pisa e Perugia, hanno evidenziato alcune famiglie di elevata consistenza (9 soggetti).

Se analizziamo le parentele tra province vediamo che soltanto Pisa ha un soggetto parente con un individuo della provincia di Grosseto ($a_{ij} = 0,250$ e $0,450$ di rassomiglianza genetica) ed uno con la provincia di Livorno ($a_{ij} = 0,250$ e $0,450$ di rassomiglianza genetica). Questo risultato potrebbe essere interessante in quanto queste province, secondo quanto rilevato da Ciampolini e coll. (2002) sono legate tra loro da una elevata rassomiglianza genetica ed hanno costituito una area ben distinta geneticamente dalle altre aree. Le altre province non sono legate da parentele.

Confrontando i coefficienti di parentela con i risultati dell'analisi genomica, si evidenziano valori decisamente superiori per quest'ultimi; anche dove non si registrano parentele tra i soggetti. Particolarmente, nelle province di Grosseto e di Firenze si contrappone una somiglianza genetica media molto alta, intorno al 46%.

Le differenze tra rassomiglianza genetica e coefficienti di parentela media per provincia e per famiglia, sono riportati nelle Tabelle IV e V. Come possiamo vedere le differenze sono elevate e variano, all'interno delle famiglie, da un minimo di 0,110 ad un massimo di 0,337 (Tab. V); all'interno delle province le differenze sono più alte e variano da un minimo di 0,288, nella provincia di Perugia, ad un massimo di 0,460 per Firenze e Grosseto dove, come già sottolineato, non sono state evidenziate parentele (Tab. IV). Le correlazioni non parametriche di Spearman e Kendall hanno rilevato valori non significativi e molto bassi (0,109 e 0,092 rispettivamente per i due tests).

Nella Tabella V sono riportati, inoltre, il numero dei soggetti, all'interno delle varie famiglie e province, appartenenti ai gruppi di rassomiglianza genetica HGS o LGS.

Una ulteriore analisi dei dati evidenzia che il 28,57% dei soggetti appartenenti alla provincia di Pisa si inserisce nel gruppo ad alta rassomiglianza genetica (HGS), la restante quota, il 71,43% si inserisce in quella a bassa rassomiglianza genetica (LGS); i 4 soggetti che costituiscono l'unica famiglia evidenziata appartengono tutti al gruppo HGS. Anche per la provincia di Livorno il 70% dei soggetti appartiene al gruppo LGS ed il 30% al gruppo HGS; dei 3 soggetti parenti soltanto 1 è ascrivibile al gruppo HGS. L'81,82% dei soggetti di Grosseto appartiene al gruppo LGS.

All'interno della provincia di Siena, la maggior parte dei soggetti si inserisce nel gruppo HGS (58%), ma nelle diverse famiglie non si osserva un comportamento omogeneo (Tab. V).

Gli animali allevati nelle province di Arezzo, Perugia, Terni e Firenze appartengono al gruppo HGS (66,67% - 60% - 55,56% e 73,68% rispettivamente), ma all'interno della stessa famiglia ci sono, per la grande maggioranza dei casi, sia soggetti HGS che LGS.

DISCUSSIONE

I bovini oggetto di questo lavoro provengono in buona parte dalla

Tab. V. Parentele e rassomiglianza genomica tra famiglie.

Provincia	Sogg. per famiglia	Parentela media	Famiglie Rassom. genomica	Differenza	HGS n° soggetti	LGS
SIENA	3	0,250	0,587	0,337	2	1
	2	0,250	0,370	0,120	1	1
	2	0,250	0,360	0,110	1	1
	5	0,250	0,574	0,324	3	2
	9	0,250	0,424	0,174	4	5
	2	0,250	0,360	0,110	2	-
	3	0,250	0,390	0,140	3	-
	2	0,500	0,630	0,130	1	1
	7*	0,125	-	-	-	-
AREZZO	3	0,250	1	0,283	3	-
	5	0,250	0,522	0,272	5	-
	5	0,250	0,561	0,311	4	1
	8	0,250	0,499	0,249	4	4
	9	0,250	0,480	0,230	4	5
PISA	4	0,250	1	0,263	4	-
PERUGIA	8	0,250	0	0,248	5	3
LIVORNO	3	0,250	0	0,243	1	3
TERNI	3	0,250	0	0,240	2	1
	9	0,250	0	0,194	6	3

provincia di Siena così come i padri dei soggetti testati, mentre le madri sono normalmente della stessa provincia di appartenenza dei figli.

I risultati evidenziano limitati gruppi di parenti: sono state rilevate, infatti, soltanto 9 famiglie, costituite da un numero di componenti superiori a 4 unità, per un totale di 67 soggetti. Le parentele all'interno di questi gruppi variano da un minimo di 0,125 ad un massimo di 0,250.

Anche all'interno delle varie province la parentela media è piuttosto bassa, varia da un massimo di 0,194 per la provincia di Perugia, ad un minimo di 0,0135 per la provincia di Siena. Le analisi molecolari

mostrano risultati decisamente diversi: la somiglianza genetica tra i soggetti appartenenti alle singole province è elevata e varia da un minimo di 0,360, per la provincia di Pisa, ad un massimo di 0,482 della provincia di Perugia.

È interessante rilevare anche che le province di Grosseto e Firenze, pur non avendo fatto registrare al loro interno alcuna parentela, presentano una somiglianza genetica tra gli individui rilevante, pari a 0,460 e 0,453 rispettivamente.

È comunque da evidenziare che le parentele esistono essenzialmente all'interno delle varie province. Soltanto la provincia di Pisa è legata alle province di Livorno e Grosseto per la presenza di un mezzo-fratello di padre per provincia.

Da una precedente nota (Ciampolini e coll., 2002) risulta che le province di Pisa, Livorno e Grosseto sono molto vicine; ciò potrebbe essere supportato dalla presenza di alcune parentele, anche se limitate e anche se la popolazione esaminata è di consistenza ridotta. Relativamente alle rassomiglianze tra province, i risultati scaturiti da questa nota sono invece piuttosto discordanti rispetto a quanto rilevato precedentemente (Ciampolini e coll., 2002): Siena che fornisce Pisa e Livorno di gran parte dei loro riproduttori, soprattutto maschi ma anche femmine, presenta una minore rassomiglianza genetica con queste province rispetto alle altre.

Le tre province che costituiscono la terza area di allevamento evidenziata da Ciampolini e coll. (2002) hanno al loro interno soggetti per lo più appartenenti al gruppo LGS (il 71,43% per Pisa, il 70% per Livorno ed l'81,82% per Grosseto), all'opposto di quanto rilevato per le altre due aree. Non è invece evidente il comportamento all'interno delle famiglie: i soggetti possono appartenere indifferentemente all'uno o all'altro gruppo, indipendentemente dal loro grado di parentela.

Da questa ricerca è comunque possibile concludere che non sempre vi è coincidenza tra i valori della rassomiglianza genetica stimati con il metodo molecolare IMG quelli calcolati attraverso le parentele additive. Queste ultime stimano la probabilità di geni simili per discendenza e la loro applicazione ha incluso le ultime sei generazioni, mentre la valutazione molecolare considera le rassomiglianze tra individui sia per i loci simili per discendenza sia per quelli simili "in stato", e conservate o disperse in tutto il processo evolutivo della popolazione studiata.

BIBLIOGRAFIA

- CAVALLI SFORZA L.L., EDWARDS A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis, models and estimation procedures. *An. J. of Human Genetics*. 19: 233-257.
- CECCHI F., LEOTTA R., FORABOSCO F., FILIPPINI F., CIANCI D. (2001). Analisi preliminare della razza Chianina attraverso i dati genealogici dei soggetti in prova di performance e studio delle loro relazioni di parentela mediante l'impiego della Cluster Analysis. *Taurus speciale* 12: 6, 39-57.
- CIAMPOLINI R., GROHS C., LEOTTA R., LEVEZIEL H., CIANCI D. (1994). Use of microsatellites to investigate genetic diversity in four italian beef cattle breeds. XXIV Int. Conf. Anim. Gen. Prague, 23-28 July 1994.
- CIAMPOLINI R., MOAZAMI GOUDARZI K., VAIMAN D., DILLMANN C., MAZZANTI E., FOULLEY J.L., LEVEZEIL H., CIANCI D. (1995). Individual multilocus using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italia beef cattle breeds. *J. Anim. Sci.*, 73, 3259-3268.
- CIAMPOLINI R., MOAZAMI GOUDARZI K., VAIMAN D., DILLMANN C., MAZZANTI E., FOULLEY J.L., LEVEZEIL H., CIANCI D. (1995). Individual multilocus using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italia beef cattle breeds. *J. Anim. Sci.*, 73, 3259-3268.
- CIAMPOLINI R., CECCHI F., MAZZANTI E., CIANCI D. (2002). Studio della variabilità genetica della razza Chianina attraverso i dati genealogici e molecolari: l'analisi molecolare. Inviato per la stampa a *Agricoltura Mediterranea*.
- JEANPIERRE M. (1987). A rapid method for purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res.*, 15: 9611.
- JMP (1996). J.M.P. User's Guide ver. 3.1.6.2, S.A.S Institute Inc., Ed. Cary (NC), U.S.A.
- S.A.S (1999). S.A.S. User's Guide Statistics. S.A.S Institute Inc., Ed. Cary (N.C.) U.S.A.
- VAIMAN D., MERCIER D., MOAZAMI-GOURDARZI K., EGGEN R., CIAMPOLINI R., LEPINGLE R., VELMALA J., KAIKIEN J., VARVIO S.L., MARTIN P., LEVEZIE H. (1994). A set of 99 cattle microsatellites: Characterization, syntesy mapping polymorphism. *Mamm. Genome*, 5: 288.