

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**



Facoltà di Agraria e di Medicina Veterinaria

**Corso di LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E  
TECNOLOGIE ANIMALI**

Tesi di laurea

**Sviluppo e applicazione dei marcatori genetici per la  
gestione del parco riproduttori in un allevamento di  
branzino**

*(Dicentrarchus labrax)*

**Relatore:**

Professor Luca Bargelloni

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene  
Veterinaria

**Laureando:**

Valeria Sambo 542095

**ANNO ACCADEMICO 2008-2009**



# Indice

<b>Sommario</b> .....	5
<b>1.Introduzione</b>	
1.1 L' Acquacoltura in Italia e nel mondo: aspetti generali.....	7
1.2 I tipi di allevamento .....	8
1.2.1 Allevamento estensivo .....	9
1.2.2 Allevamento intensivo .....	11
1.2.3 Maricoltura .....	12
1.3 Il branzino: morfologia .....	14
1.3.1 Ciclo di produzione .....	15
1.3.2 Riproduzione del branzino.....	17
1.4 Marcatori genetici .....	19
1.4.1 I microsatelliti.....	24
<b>2. Materiali e metodi</b>	
2.1 Raccolta dei campioni.....	27
2.2 Estrazione DNA.....	27
2.3 Isolamento e messa a punto dei microsatelliti.....	30
2.4 Amplificazione dei loci microsatelliti mediante PCR.....	32
2.5 Elettroforesi su gel d'agarosio.....	34
2.6 Genotyping.....	35
2.7 Analisi del grado di parentela dei candidati riproduttori .....	36
<b>3.Risultati e discussione</b> .....	39
<b>4.Bibliografia</b> .....	55
<b>Appendice</b> .....	57



# Sommario

Con questo lavoro si è svolta un'analisi genetica dei candidati riproduttori presenti in un allevamento di branzino (Valle Cà Zuliani), al fine di identificare la parentela tra gli individui utilizzati per rinsanguare il parco e quelli già presenti nell'impianto, cercando perciò di minimizzare l'inbreeding e gli effetti che questo può provocare nella progenie.

Questo è stato possibile grazie all'uso di marcatori molecolari che hanno consentito la determinazione di un profilo genetico individuale.

I marcatori maggiormente utilizzati nelle metodiche di identificazione individuale e di analisi di paternità sono i loci microsatelliti.

Per ogni individuo è stato raccolto un campione di tessuto di pinna caudale, da cui è stato estratto il DNA genomico.

Si è proceduto poi all'amplificazione di 9 loci microsatelliti mediante PCR per 216 riproduttori già presenti e 188 riproduttori candidati, per poi visualizzare il prodotto dell'amplificazione mediante elettroforesi capillare.

Grazie al software Genotyper 3.7 è stato determinato il profilo genetico di tutti gli individui esaminati .

Infine il programma ML-Relate ha permesso di attribuire un valore di relatedness per tutti i confronti a coppie tra i 188 candidati riproduttori provenienti da Valle Cà Zuliani di Monfalcone.

# Abstract

In this work a genetic analysis was conducted on the candidate fish to be included in the broodstock of a sea bass hatchery, in order to identify the relationships among the individuals used to renew the broodstock and those already present in the fish farm, to minimize the inbreeding and the effects that this can provoke.

This has been possible through the use of molecular markers, which allowed the definition of individual genetic profiles.

The most used markers for individual identification and analysis of paternity are microsatellite loci.

PCR amplification of the 9 microsatellite loci was carried for 216 broodfishes already present and 188 candidate broodfishes, for then visualize the product of the amplification through capillary electrophoresis.

Genotyper 3.7 was used to characterize a microsatellite profile for every individual.

Finally, the program ML-Relate allowed to attribute a value of relatedness for all the pair-wise comparisons among the 188 originating reproducing candidates from Valle Cà Zuliani of Monfalcone.

## **Introduzione**

### **1.1 L'ACQUACOLTURA : ASPETTI GENERALI**

Con il termine di acquacoltura vengono considerate tutte le attività umane finalizzate alla produzione di organismi acquatici, tali attività vengono realizzate in acque marine dolci o salmastre e comprendono le pratiche di allevamento ittico di tipo estensivo, semiestensivo ed intensivo. [5]

L'acquacoltura in generale e la maricoltura in particolare hanno assunto negli ultimi anni un ruolo sempre più importante nella produzione ittica, per cui oggi si può sostenere che, per alcune specie, tali attività costituiscono un valido supporto alla pesca nel soddisfacimento della crescente richiesta di mercato, contribuendo ad alleviare la condizione tuttora deficitaria della nostra bilancia alimentare in materia di prodotti ittici. [14]

L'acquacoltura è una realtà significativa in Italia e a livello comunitario. Essa è importante oltre che sotto il profilo produttivo anche per quanto riguarda la diversificazione delle specie allevate. L'acquacoltura a livello mondiale riguarda circa 250 specie tra pesci, crostacei, molluschi, di cui solo 65 vengono commercializzate in Italia. Di queste le più diffuse sono la trota, la spigola l'orata, il cefalo, i mitili, le vongole, le ostriche e l'anguilla.

L'acquacoltura italiana risente della concorrenza oltre che dei paesi dell'Unione Europea anche dalle produzioni ittiche provenienti da paesi terzi: infatti il mercato dei prodotti ittici risulta essere uno dei mercati più globalizzati. L'Unione Europea è la terza potenza mondiale nel settore produttivo ittico, dopo la Cina ed il Perù.

Nel 2006, il settore della pesca e dell'acquacoltura in Italia ha mostrato una ripresa significativa in termini produttivi, dopo alcuni anni di contrazione. Alla crescita ha contribuito in misura rilevante il comparto della pesca nelle acque del Mediterraneo, che ha registrato una positiva inversione di tendenza, grazie

all'importanza degli allevamenti estensivi delle valli del Nord ma anche per la gestione e la pesca negli ambienti lagunari.

Oggi l'Italia rappresenta uno dei maggiori produttori nel campo dell'acquacoltura comunitaria, dopo Francia e Spagna; e le aree maggiormente produttive sono per il 70% al Nord, 20% al Centro e per il restante 10% al Sud. [8]

In Italia, sono risultati determinanti per lo sviluppo produttivo la crescente diffusione di avannotterie e la notevole espansione dell'allevamento in gabbie, tecnica produttiva che si è affiancata all'allevamento intensivo praticato a terra e all'allevamento estensivo in ambienti naturali e/o di tipo naturale (valli, stagni e lagune).

Il settore produttivo italiano, per poter effettivamente competere con quello estero, da cui dipendiamo attraverso le importazioni per il 45-48 %, continua a sviluppare in maniera sempre più massiccia, tutte quelle iniziative tendenti alla qualificazione del proprio prodotto.

La certificazione del processo produttivo, i marchi e la certificazione di qualità, le etichettature sono gli esempi di una strada intrapresa, pur in misura diversa fra loro, da molti imprenditori del settore.[13]

Si prevede che, a causa dell'incremento demografico, sarà necessario un aumento della produzione ittica in maniera tale da mantenere gli attuali livelli di consumo; perciò l'unica risorsa in grado di soddisfare questa richiesta è rappresentata dalla pesca d'allevamento, poiché la pesca da cattura tradizionale ha già raggiunto livelli massimi di produzione.

Questo sarà possibile solo se tale tipo di allevamento sarà gestito in maniera responsabile. [6]

## ***1.2 I TIPI DI ALLEVAMENTO***

L'utilizzo di tecnologie sempre più sofisticate hanno fatto sì che negli ultimi anni il settore dell'acquacoltura abbia prodotto in maniera tale da soddisfare le richieste del mercato.

Negli ultimi 50 anni si è potuto notare un cambiamento nel modo di allevare, da un'acquacoltura di tipo rurale a gestione familiare ad una di tipo

imprenditoriale, più innovativa sia sotto il profilo delle tecnologie applicate sia nel determinare il valore del prodotto a seconda delle richieste di mercato.

### Tipi di allevamento



Fig1.2.1 Diffusione dei diversi tipi di allevamento

Tutto ciò è stato possibile grazie al sorgere di centri specializzati nella riproduzione artificiale di specie particolarmente pregiate come orata e branzino.

E' infatti necessario che un moderno impianto di allevamento debba contare su un sicuro e costante approvvigionamento di pesce, tanto più quanto più la montata naturale dal mare, si è andata progressivamente depauperando a causa del degrado ambientale. [4]

Si distinguono i diversi tipi di allevamento a seconda del tipo di ambiente in cui si esercita, delle specie allevate e dal ruolo dell'uomo nei confronti di queste: estensivo, intensivo e maricoltura.

#### 1.2.1 Allevamento estensivo

Esistono tuttora forme di acquacoltura interamente basate sull'uso delle risorse naturali. Si definisce allevamento estensivo quello in cui l'allevatore non somministra alimenti dall'esterno.

Il primo intervento dell'acquacoltore è la "semina" degli esemplari giovani provenienti da centri di riproduzione o raccolti in natura.

L'allevatore interviene, poi, controllando il flusso delle acque, attraverso chiaviche e griglie, installate su porzioni lagunari o presso le foci a delta di grandi fiumi.

Tale forma di allevamento consente di conservare ambienti acquatici naturali altrimenti destinati a bonifica.

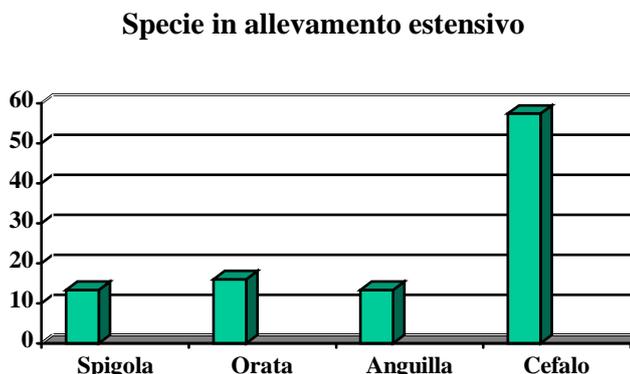


Fig1.2..Percentuale di diverse specie presenti nell'allevamento estensivo

Di norma l'acquacoltura estensiva viene praticata nelle lagune costiere, le cosiddette "valli da pesca" da cui il termine "*vallicoltura*".

Gli impianti più importanti sono ubicati quasi tutti nel Nord Italia ed in particolare in Veneto, Emilia-Romagna e Friuli-Venezia Giulia.

Nel resto del nostro Paese l'acquacoltura estensiva prende il nome di "*stagnicoltura*"; in questo caso si tratta della gestione ai fini produttivi di lagune e di laghi costieri. Importanti esempi possono trovarsi in Toscana, nel Lazio e in Sardegna.

Nell'uno e nell'altro caso l'acquacoltura estensiva costituisce senz'altro un esempio fondamentale di interazione tra attività umana e conservazione dell'ambiente.

Le zone lagunari, nel passato soggette a bonifica, sono oggi ambienti a rischio di degrado, soprattutto per i pericoli derivanti dall'ambiente circostante.

Poiché l'acquacoltore ha comunque l'interesse a garantire l'equilibrio ecologico della valle o dello stagno, egli porrà in essere tutti gli accorgimenti necessari per la salvaguardia dell'ambiente, al fine di assicurare la sopravvivenza delle specie allevate e conseguentemente la redditività delle valli da pesca. [16]

Il limite dell'allevamento estensivo è costituito dalle rese piuttosto basse se rapportate all'alto immobilizzo fondiario.

Soluzioni economicamente valide ed ecologicamente compatibili sono state realizzate, in alcune aree dove, accanto all'acquacoltura, è consentita anche

la pratica della caccia e la gestione di aziende ricettive di tipo agriturismo.  
[15]

### **1.2.2 Allevamento intensivo**

In Italia gran parte delle specie ittiche da allevamento, quali trote, anguille, spigole, orate ma anche pesci gatto e storioni, provengono da impianti intensivi.

Nell'allevamento intensivo è di fondamentale importanza l'apporto umano per la somministrazione di alimentazione di tipo artificiale, con formulazioni adatte alle specie allevate. Si attua per lo più sulla terra ferma in vasche di cemento o in terra. [11]



Fig 1.2.3 Vasche di cemento a terra nell'allevamento intensivo

Lo svantaggio dell'allevamento intensivo è l'emissione nell'ambiente di acqua carica di sostanze come cibo non consumato e feci, con la possibilità di alterazione dell'acqua marina; questo lo differenzia dall'allevamento estensivo che invece grazie alla capacità di autodepurazione biologica delle lagune, prevede che l'acqua restituita all'ambiente esterno risulti qualitativamente migliore rispetto a quella in entrata.

Sono stati così gli stessi acquacoltori a prendere coscienza della necessità di ridurre l'impatto ambientale degli allevamenti di tipo intensivo. Per gli impianti a terra si è cercato di riciclare le acque di scarico, essendo inattuabile, per motivi economici, un loro trattamento diretto. Nel caso delle acque dolci si è così proceduto al riutilizzo delle stesse per la fertirrigazione e per la produzione di alghe, mentre in caso di acqua salata, tramite il lagunaggio, si possono allevare specie minori e molluschi.

Esistono perciò forme integrate di acquacoltura in cui moduli intensivi possono essere collegati a bacini estensivi. In questo caso le acque reflue da

allevamento intensivo, per esempio di spigole e orate, vengono convogliate in un bacino dove sono introdotte specie ittiche che vivono preferibilmente in ambienti ricchi di sostanze organiche. In tal modo è possibile recuperare una parte dell'energia che l'allevamento intensivo ha dissipato restituendo simultaneamente acque più pulite.

Infatti, la capacità filtrante dei molluschi che utilizzano nutrienti provenienti dai residui dell'allevamento, ha sull'acqua un effetto depurante. Ciò implica ovviamente una limitazione nell'uso di prodotti chimici che rimarrebbero, altrimenti, negli apparati filtranti di mitili e ostriche.

Un altro problema che si pone per l'allevamento intensivo è quello derivante dalla introduzione di specie non originarie della zona. Il rischio è quello di introdurre patologie o parassiti e impatti ambientali indesiderati sulla flora e la fauna locali.

Nel primo caso è opportuno procedere con certificazioni e quarantene, nel secondo con studi preliminari dal punto di vista genetico ed ecologico. In Italia, prevalentemente, l'allevamento ittico intensivo è praticato in impianti a terra, con bacini artificiali di dimensioni relativamente ridotte (dai 100 ai 1.000 metri quadri).

Gli allevamenti, in genere, sono altamente specializzati e solitamente monocolturali.

### **1.2.3 Maricoltura**

Questa tipologia di allevamento prevede l'utilizzo di strutture semi-sommerse come gabbie in metallo o barriere in mare aperto, e rappresenta una variante dell'allevamento intensivo; inizialmente veniva effettuata solo per l'allevamento di salmoni in gabbia, poi si è estesa a branzini, orate e trote.

La maricoltura si pratica generalmente in aree costiere e in bacini piuttosto protetti dall'azione dei venti e delle correnti marine. Spesso nel caso di gabbie a mare le correnti contribuiscono alla dispersione dei rifiuti; perciò l'accorgimento nell'attuare questa attività può essere quello di spostarle in continuazione in modo da permettere ai fondali di ripristinarsi.

Questo tipo di attività comporta molti rischi, ma risulta essere anche molto conveniente, basti pensare al risparmio energetico per il pompaggio delle

acque durante l'attività, ma anche al risparmio di manodopera per la somministrazione del mangime, che viene effettuata con sistemi automatici su ponti galleggianti.

Lo svantaggio sta nell'impatto ambientale, a causa del rilascio di sostanze chimiche in mare e di nutrienti organici e inorganici.

Pur se oggi ancora scarsamente praticata, si ritiene, tuttavia, che tenderà ad avere uno sviluppo crescente nei prossimi anni, sia per i sempre più numerosi vincoli a salvaguardia dell'ambiente posti agli allevamenti a terra, sia per effetto di una riconversione di pescatori verso l'attività di allevamento a mare.

[11]



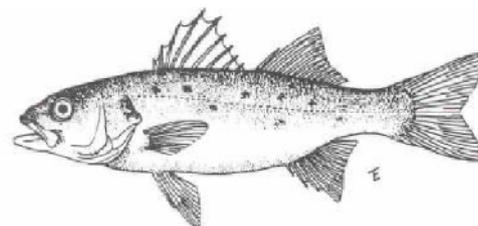
Fig 1.2.4 Gabbie a mare

Fig 1.2.5 Barriere tipiche dell'attività di maricoltura



### 1.3 IL BRANZINO (*Dicentrarchus labrax*)

<b>Regno</b>	Animalia
<b>Phylum</b>	Chordata
<b>Classe</b>	Osteichthyes
<b>Ordine</b>	Perciformes
<b>Famiglia</b>	Serranidae
<b>Genere</b>	Dicentrarchus
<b>Specie</b>	Labrax



Il branzino o spigola presenta un corpo lungo e robusto che può raggiungere un metro di lunghezza ed un peso di 15 Kg; il nome del genere *Dicentrarchus* (*Linnaeus, 1758*) deriva proprio dalla presenza di due pinne dorsali: la prima è formata da sette grossi raggi erettili.

Il dorso è scuro, i fianchi argentei e il ventre bianco. Ben visibile è la linea laterale grazie alla quale il branzino riesce a percepire la presenza delle proprie prede in qualsiasi condizione meteo marina.

Le pinne non hanno colorazioni particolari salvo qualche sfumatura grigiastrea. Il muso è appuntito e presenta una mandibola piuttosto prominente munita di denti aguzzi e sottili ed un opercolo con due spine.

Il branzino vive nelle acque temperate del Mediterraneo, Mar Nero e Atlantico Orientale, generalmente in acque costiere; è un predatore principalmente notturno, si nutre di piccoli pesci, anellidi, cefalopodi e crostacei. E' una specie solitaria nello stadio adulto, ma può vivere in gruppo nella fase giovanile.[18]

La sua attività riproduttiva si manifesta principalmente nei mesi invernali tra Gennaio e Marzo, nelle acque del Mediterraneo, cioè una volta raggiunta la maturità sessuale che nel branzino è di 2 anni nei maschi e 3 anni nelle femmine.

Al momento della riproduzione, allo stato naturale, i branzini si radunano in gruppi, e le uova, aventi diametro di 1,15-1,16 mm, deposte dalla femmina

vengono fecondate da più maschi; le uova sono pelagiche, galleggianti, in numero di circa 140000 per Kg di peso della femmina.

Dopo circa 3 giorni di incubazione, dalle uova originano delle piccole larvette di 3-4 mm; queste si spostano verso zone lagunari raggiungendo alcune volte zone di acque dolci, dove accrescono e vi rimangono fino al raggiungimento della maturità sessuale; sono infatti tolleranti a salinità molto basse.

Dopo circa 4-5 giorni dalla schiusa la larva si nutre di plancton, mentre nei giorni subito seguenti la schiusa continua l'organogenesi (in funzione della temperatura), e la larvetta trae energia dal riassorbimento del sacco vitellino.

La successiva fase di produzione della spigola avviene sia con tecniche di allevamento estensivo, principalmente nelle valli da pesca delle regioni che si affacciano all'Adriatico settentrionale, oppure in allevamento intensivo.

Tra le tecniche di allevamento intensivo utilizzate in questo stadio vi è l'assecondamento delle innate abitudini alimentari della larvetta, almeno fino a quando l'organogenesi non si sia completata, per poi iniziare la somministrazione di prodotti commerciali quali mangimi sintetici in polvere.

[14]

### **1.3.1 Ciclo di produzione all'interno di un allevamento moderno**

Il ciclo di produzione del branzino inizia con la semina delle uova precedentemente selezionate; infatti queste in opportuni incubatoi, ove permangono per circa 40 giorni si distinguono poichè quelle fecondate risultano trasparenti e galleggiano all'interno di un cestello, mentre quelle non fecondate risultano bianche e si depositano sul fondo della vasca.



Fig 1.3.1 Vasche incubatoio

Una volta raccolte, vengono sottoposte ad una successiva selezione mediante scrematura, in maniera da riconoscere le uova migliori, aventi diametro poco superiore ad 1 mm e peso in media di 1 mg.

Una volta schiuse (al terzo giorno di emissione ove 1 Kg uova=340000 avannotti) le uova liberano una larva provvista di sacco vitellino, che funge da riserva energetica per continuare l'organogenesi, fintanto che la larva non sarà in grado di alimentarsi con plancton vivo.



Fig1.3.2 Larveta al 9 giorno



Fig1.3.3 Larveta al 18 giorno

All'interno delle aziende è necessaria la produzione di linee parallele per la produzione di zooplanctonici, da offrire alla larva. Viene allevata l'*Artemia salina*, che viene commercializzata in forma di cisti che possono sopravvivere per anni all'asciutto senza alterarsi, poi a contatto con l'ambiente umido, durante l'idratazione, iniziano a svilupparsi dando vita, dopo la schiusa e perciò dopo la rottura della cuticola, al nauplio di artemia. Questo continua a svilupparsi cibandosi del substrato algale eventualmente disponibile fino a raggiungere la forma adulta.



Fig1.3.4 Cisti di Artemia



Fig 1.3.5 Nauplio di Artemia

L'*Artemia* può essere anche arricchita con acidi grassi polinsaturi e lavata, e deve essere somministrata quando è allo stadio di nauplio-metanuplio, in densità di almeno 3 individui/ml. La somministrazione avviene quando la larva

raggiunge l'età di 25 giorni (primo appastamento), mentre nei giorni precedenti vengono utilizzate popolazioni planctoniche di dimensioni inferiori come *Chlorella minutissima* e *Brachionus plicatilis*.

La fase di primo appastamento, cioè somministrazione di *Artemia salina*, si concretizza nelle prime due settimane di vita della spigola; successivamente la larva dovrà essere indotta a consumare mangime sintetico, più semplice da approvvigionare e somministrare. Questa fase detta "svezzamento" si completa verso il 30°-40° giorno di vita della larva.

Con il mangime sintetico vengono ultimati gli sviluppi organogenetici e la larva subisce una metamorfosi, assumendo le caratteristiche peculiari di pesce. Verso la fine del 2° mese di vita un'ulteriore crescita porterà allo sviluppo dell'avannotto, avente peso di 0,5-1 grammo, e che potrà essere seminato in vasche di preingrasso (vasche da 50-200 m<sup>2</sup> con densità massima di 240 pesci/m<sup>3</sup>) dove gli animali vi permangono fino ad 1 anno di età e vengono sottoposti ai primi programmi di selezione.

Dopo un'ulteriore crescita e selezione per taglie, il pesce viene trasferito all'ingrasso che rappresenta la conclusione del ciclo.

Una volta raggiunta la taglia di 350 g, in 15-24 mesi, a seconda della temperatura dell'acqua, il pesce può essere commercializzato. A questo punto vengono selezionati i capi idonei ad incrementare il parco riproduttori. [14]

### **1.3.2 La Riproduzione del Branzino**

La riproduzione artificiale negli allevamenti dei pesci è il processo con il quale si fornisce materiale per l'allevamento e attraverso il quale, mediante selezione genetica, si possono ottenere specie con particolari caratteristiche favorevoli.

Il processo riproduttivo inizia con la scelta dei riproduttori, maturi sotto il profilo sessuale a 2-3 anni, ma che manifestano la vera attività sessuale a 4-5 anni di età: maschi e femmine vengono allevati in appositi bacini, alimentati con acqua di mare, dove gli animali raggiungono naturalmente la maturità, seguendo cioè il ciclo stagionale tipico della specie.

Nel branzino la maturazione avviene con l'arrivo dei primi freddi, con un picco tra Gennaio e Febbraio. In tale periodo entrambi i sessi presentano un

rigonfiamento del ventre; sono molti i fattori che influenzano il processo riproduttivo: fotoperiodo, temperature, presenza del sesso opposto, fasi lunari. Una volta scelti i soggetti, mediante accorta selezione, vengono trasferiti alle vasche di deposizione, circolari con profondità 1-1,30 m; in tali vasche le uova raggiungono maturazione, e allo stesso tempo i maschi emettono i propri prodotti sessuali, completando il processo di fecondazione.

Le uova una volta fecondate diventano galleggianti, e perciò vengono raccolte grazie ad un getto di acqua, che sviluppa una corrente circolare, e la presenza di un tubo contro corrente in grado di prelevare le uova.



Fig 1.3.6 Tubo di raccolta uova

Queste vengono poi trasferite in vasche di incubazione; il reparto di incubazione è costituito da vasche cilindriche di 1 m<sup>3</sup>, nelle quali l'acqua viene mantenuta in condizioni fisico-chimiche costanti, ovvero temperatura di 13-18 C°, ossigeno superiore di 5 ppm che assicura il regolare sviluppo embrionale, e densità di 50-150 uova/l .

Inizia perciò il ciclo produttivo.

La *Selezione* nel branzino è di tipo "*massale*"; si attua scegliendo a ogni generazione, in seno alla popolazione presente, quegli individui che per caratteristiche morfologiche e/o funzionali sono ritenuti i più idonei agli scopi di allevamento.

Con questo sistema però gli accoppiamenti non vengono controllati, perciò non si conoscono le genealogie dei prodotti di F1, e si parla quindi di accoppiamento casuale.

Questo ultimo tende a mantenere invariata la struttura genetica della popolazione, salvo le variazioni di frequenza casuali dovuti al numero ristretto

di individui e allo stabilirsi di una parentela tra i componenti del gruppo, dopo alcune generazioni di riproduzione in condizioni di isolamento da altre popolazioni. [3]

Nel caso di piccole popolazioni il cui accoppiamento è casuale, si osserva infatti al trascorrere del tempo un aumento della consanguineità di  $1/2N$  per generazione, dove  $N$  è il numero di riproduttori.

Perciò l'equazione  $F=1/2N$  indica che l'incremento è inversamente proporzionale alla numerosità dei riproduttori, e che in popolazioni di qualsiasi dimensione, ad eccezione di quelle numericamente infinite, si verifica un aumento della consanguineità. [12]

Metodi di gestione genetica, che consentono di rallentare l'incremento della consanguineità, prevedono che il numero di riproduttori maschi sia il più vicino possibile al numero di riproduttori femmine; è perciò fondamentale diminuire il grado di parentela tra gli individui.

Questo è possibile mediante l'analisi genetica di questi, con l'utilizzo di marcatori genetici.

## **1.4 MARCATORI GENETICI**

Per marcatore genetico viene definito qualsiasi carattere polimorfico mendeliano che può essere impiegato per seguire l'ereditarietà di un segmento cromosomico attraverso un albero genealogico e quindi per confrontare l'espressione di un determinato carattere.[17]

E' infatti una sequenza di DNA che può essere identificata.

Diverse sono le applicazioni dei marcatori genetici:

- Selezione genetica dei riproduttori e perciò l'identificazione dell'individuo con applicazione di microchips.
  
- Accertamento della parentela: si basa sul fatto che i marcatori genetici di un individuo, essendo caratteri mendeliani semplici, devono essere presenti almeno in uno dei due genitori, mentre il figlio non potrà presentare marcatori che non siano presenti in almeno uno dei genitori.

- Studi di genetica di popolazione: il confronto tra le frequenze geniche, che esprimono il grado di diffusione di un allele in una popolazione, riscontrate ai diversi loci testati consente di paragonare tra loro le popolazioni, di calcolare le distanze genetiche e di formulare la filogenesi disegnando alberi genealogici. Inoltre è possibile controllare il grado di eterozigosità e omozigosità all'interno di una popolazione, e perciò i marcatori possono fornire il livello di variabilità genetica di una popolazione.
  
- Studio delle relazioni tra marcatori genetici e i caratteri quantitativi: la maggior parte dei caratteri produttivi sono detti quantitativi e risentono dell'influenza ambientale e presentano una variabilità continua. I loci che codificano per tali caratteri vengono detti QTL quantitative trait loci. Un marcatore genetico può essere perciò un QTL (pleiotropia) o può essere associato a qualche QTL (linkage). In tal caso la selezione per il carattere quantitativo può avvenire con tipizzazione degli individui per il marcatore e dell'utilizzo di tale informazione nelle scelte selettive (MAS selezione assistita del marcatore).
  
- Identificazione di marcatori genetici associati a geni responsabili di patologie (esempio: gene responsabile della Sindrome da Stress suino o Deficienza di adesione leucocitaria nel bovino o detta anche BLAD).

Si distinguono diverse *Classi di Marcatori Genetici*:

- Morfologici: la cui variabilità è espressa a livello fenotipico; sono caratteri mendeliani qualitativi.
  
- Biochimici: la cui variabilità è osservabile attraverso analisi biochimiche, come:
  - gruppi sanguigni
  - isoenzimi: formazione alternative di uno stesso enzima, che svolgono la stessa funzione in un determinato organismo, anche se differenzia per uno o più aminoacidi.

- proteine

- Molecolari: variabilità osservabile a livello genomico; appartengono a questa categoria SNP, microsatelliti, RFLP, AFLP, RAPD...

Il *Marcatore Molecolare* può essere definito come quel locus genomico, rilevabile attraverso sonde (probe) o primer specifici, che in virtù della sua presenza, contraddistingue il tratto cromosomico con il quale si identifica, e le regioni che lo circondano all'estremità 5' e 3'.

Perciò rilevano le diversità dovute a mutazioni di regioni di DNA omologhe di individui diversi appartenenti alla stessa specie o a specie diverse; rilevano perciò le differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA (nucleotidi); differenze dovute a inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi...

Le caratteristiche principali dei marcatori molecolari sono: non subiscono interferenze da parte dell'ambiente; coprono qualsiasi parte del genoma permettendo di rilevare differenze anche tra individui geneticamente simili e fenotipi indistinguibili; non presentano effetti epistatici, ovvero non vi è interazione tra geni di loci diversi; inoltre sono molto efficaci e affidabili. [11]

Ai *marcatori molecolari* appartengono diverse classi :

- A singolo locus, cioè sono visibili variazioni di paia di basi su un unico locus: RFLP e VNRT, basati su ibridazione di tipo SBH (Southern Blot Hybridization); Altri tipi come CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), SSR (Simple Sequence Repeat), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), vengono sottoposti alla PCR.
- Multi-locus: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SAMPL (Selective Amplified Microsatellite Polymorphic), S-SAP (Sequence Specific Amplification Polimorphism), RAPD (Random Amplified Polimorphic), AP-PCR (Arbitrarily Primed Polimerase Chain Reaction), I-SSR (Inter-Simple Sequence Repeat). Tutti vengono analizzati tramite PCR.

I primi marcatori molecolari studiati furono i *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*): tratti di DNA presenti nella popolazione e trasmessi in modo ereditario.

La regione del genoma di interesse viene amplificata tramite PCR (Saiki et al., 1985) e i prodotti ottenuti vengono incubati con un enzima di restrizione in grado di riconoscere una sequenza specifica di basi e di catalizzare una reazione di taglio al suo interno.

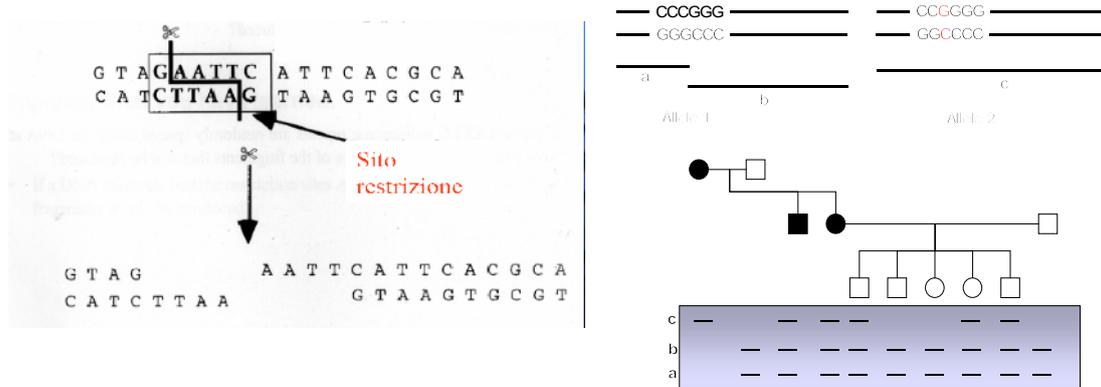


Fig 1.4.1 Taglio su sito di restrizione

Mediante elettroforesi su gel di agarosio si è in grado di determinare se il frammento amplificato è stato tagliato o meno, cioè se la specifica sequenza riconosciuta dall'enzima endonucleasi di restrizione, enzima di origine batterica capace di tagliare molecole di DNA a doppia elica in corrispondenza di una specifica sequenza nucleotidica detto *sito di restrizione*, è presente inalterata oppure no. [3]

Gli svantaggi dei RFLP sono: bassa informatività poiché solo 2 alleli sono possibili; occorre un pedigree completo con entrambi i genitori e un precedente figlio, occorre trovare un enzima di restrizione che nel genitore affetto frammenti il DNA in modo da creare una situazione di eterozigotità.

Negli anni '80 sono state scoperte nel genoma animale ampie regioni occupate da sequenze di basi puriniche e pirimidiniche ripetute in tandem; queste sequenze di DNA dette *VNTR* (*Variable Number Tandem Repeat*), le quali se sono costituite da oltre 5 basi ripetute prendono il nome di

“minisatelliti”, se sono invece prodotte da un numero inferiore di basi (dinucleotidi, trinucleotidi..) prendono il nome di “microsatelliti”.

Il numero di ripetizioni di tali gruppi di basi presentano variabilità: variabilità genetica associata ad un locus che non è gene codificante, cioè una sequenza di DNA non soggetta a trascrizione in RNA, privo di funzione ma ripetitivo, e perciò permette di definire i 2 alleli presenti e la loro eredità in base alle leggi di Mendel.

Si tratta di “marcatori genetici anonimi” con elevato polimorfismo perciò molti alleli sono possibili allo stesso locus e che mappati su un determinato cromosoma, permettono di riconoscere la trasmissione ereditaria di specifici segmenti di DNA da un individuo all'altro.

Lo svantaggio è che la loro messa a punto cioè la loro mappatura ovvero l'individuazione della localizzazione genomica ( locus) del marcatore per la costruzione di primer locus-specifici, è onerosa in termini di costi e tempi.

*SNP (Single Nucleotide Polymorfism)* sono un'altra categoria di marcatori molecolari; sono variazioni di sequenze di DNA che si verificano quando è alterato un singolo nucleotide della sequenza genomica; si possono trovare sia nelle regioni codificanti che non-codificanti del genoma.

Sono i marcatori più utilizzati perché hanno un alto polimorfismo che può essere genotipizzato e della loro elevata densità lungo tutto il genoma. Sono visualizzati attraverso sequenziamento di prodotti di PCR di campioni di DNA, isolati da un certo numero di individui geneticamente indifferenziati. Oppure ricerca in silico interrogando le principali banche dati genomiche e selezione di un certo numero di sequenze riconducibili ad un determinato gene clonato in individui diversi della stessa specie. [10]



Fig 1.4.2 Esempio SNP

### 1.4.1 I microsatelliti

I microsatelliti o *STR* (*Short Tandem Repeat*) sono blocchi di ripetizioni in tandem di corte sequenze di nucleotidi dispersi sul genoma; poiché il numero di ripetizioni varia frequentemente tra gli alleli si ha un alto grado di poliformismo.

Sono abbastanza comuni ripetizioni mononucleotidiche (A)<sub>n</sub> o (T)<sub>n</sub>; mentre le ripetizioni di (G)<sub>n</sub> e di (C) sono più rare.

Le ripetizioni dinucleotidiche CA/TG e CT/AG sono molto comuni, mentre CG/GC sono rare.

Le regioni fiancheggianti tali ripetizioni sono conservate entro la specie e spesso anche tra la specie; attraverso le regioni conservate è possibile costruire delle sonde o primer che permettano di rilevare queste regioni ripetute. La tecnica per la loro rilevazione è la PCR che rappresenta la possibilità di ottenere dei “molecular fingerprinting”, un’impronta digitale molecolare di un organismo, che permette di distinguerlo da individui strettamente correlati dal punto di vista genetico.

Questa metodologia consente di sintetizzare ripetutamente per via enzimatica uno o più segmenti di DNA situati tra due sequenze nucleotidiche note, producendo un numero elevato di copie attraverso una serie di reazioni di denaturazione del DNA, ibridazione dei primer e polimerizzazione dei nuovi filamenti.[9]



Fig 1.4.3 Ripetizioni sequenze

I *primer*, corti frammenti di DNA 18-20 basi costruiti in laboratorio attraverso una sintesi chimica, progettati esterni alla sequenza ripetuta ed utilizzati per amplificare le sequenze di microsatelliti, sono marcati covalentemente con differenti fluorofori; tali molecole assorbono l'energia fornita da un laser per poi rimetterla a lunghezze d'onda differenti per ciascun fluoroforo.

Un problema che si può manifestare è la formazione durante il processo di amplificazione di prodotti aspecifici "*stutter o shadowbands*"; questa formazione è influenzata dal processo della Taqpolimerasi: l'utilizzo di una Dna polimerasi termostabile può ridurre la formazione di prodotti aspecifici. Nel caso delle ripetizioni dinucleotidiche, la *stutter band* è di 2 bp più piccola rispetto al picco principale, con in più la formazione di *statter bands* è di 4 e 6 bp più piccole.

Perciò in conclusione si può affermare che l'analisi dei microsatelliti inizia con l'estrazione del DNA nei diversi tessuti; segue la PCR con primer specifici che appaiono alle regioni fiancheggianti l'elemento ripetuto, e l'elettroforesi su gel di agarosio.

Il risultato è un Elettroferogramma: l'area e l'altezza dei picchi indica l'intensità del segnale che dipende dalla quantità di frammento; la lunghezza del frammento, identificato con paia di basi, viene identificata confrontando i prodotti in esame con uno standard.



## **Materiali e Metodi**

### ***2.1 RACCOLTA DI CAMPIONI DI BRANZINO***

In questa fase si è proceduti al campionamento di 216 individui appartenenti al parco riproduttori dell'allevamento Valle Cà Zuliani, dove ho svolto l'attività di tirocinio.

Il campionamento prevedeva il prelievo di un frammento di pinna caudale previo riconoscimento dell'animale mediante lettura del chip.

Sono stati infine campionati 188 candidati riproduttori provenienti dall'allevamento Valle Cà Zuliani di Monfalcone.

### ***2.2 ESTRAZIONE DEL DNA***

Per i campioni raccolti si è proceduto all'estrazione del DNA.

Il DNA è stato estratto da frammenti di pochi milligrammi di tessuto (5-10 mg), mediante l'utilizzo di un collaudato kit di estrazione (Invisorb DNA Universal Clinical HTS 96 kit), presso il Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria a Legnaro.

Si è proceduto durante le operazioni di taglio al lavaggio di tutta la strumentazione con acqua demonizzata (dH<sub>2</sub>O) e alcool nel passaggio da un campione all'altro, per evitare di contaminare tra loro i campioni.

L'estrazione avviene in un contenitore con all'interno una piastra da 96 pozzetti in ciascuno dei quali viene inserito la porzione di tessuto da cui estrarre DNA.

Per l'estrazione sono possibili due differenti metodologie: l'uno prevede l'applicazione di una pressione attraverso l'utilizzo di una pompa a vuoto per far scendere le soluzioni dalle colonnine dei pozzetti, prelevando il DNA adeso alle pareti del filtro; l'altro metodo consiste nell'utilizzo di una resina, il Chelex in soluzione digestiva, che aggiunta al DNA da estrarre e posto in centrifuga,

fa precipitare sul fondo i residui indesiderati rendendo possibile il prelievo del surnatante limpido contenente DNA. Entrambi permettono di analizzare contemporaneamente 96 campioni.

I due metodi però differiscono sia in termini di rapidità nel procedimento di estrazione sia in termini di costo.

Il chelex è infatti risultato il metodo più veloce poiché sfrutta la rapidità della centrifugazione, e perciò il più conveniente in termini di costi, poiché ridotte saranno le ore di lavoro necessarie.

Le analisi, per questo motivo, sono state eseguite seguendo questo ultimo metodo.

Qui di seguito vengono riportati i protocolli di entrambe le metodologie.

Il primo metodo prevede la lisi del tessuto con l'aggiunta di ddH<sub>2</sub>O ad ogni campione di tessuto posto all'interno del pozzetto creando un volume finale di 200 µl ai quali viene aggiunto 280 µl di Lysis Buffer contenente la Proteinasi K; si mette in agitazione per circa 30 minuti a 56°C perché avvenga la lisi del tessuto.

Vengono aggiunti poi 450 µl di Binding Buffer, contenente etanolo al 99,8 %, ad ogni pozzetto della piastra; il prodotto lisato viene poi posto nella piastra contenente le 96 colonnine posta nel contenitore chiuso ermeticamente.

Viene applicata una pressione di 200 mbar (150mm/Hg) per aspirare la soluzione posta sulla colonnina finché quest'ultima non è passata del tutto attraverso il filtro della colonnina.

In questo modo solo il DNA rimane adeso al filtro della colonnina, mentre altri componenti della soluzione finiscono sul fondo del contenitore.

Per i lavaggi, che hanno lo scopo di pulire il DNA da residui di proteine, vengono utilizzati 750 µl di Wash Buffer per ogni colonnina e si applica nuovamente una pressione per circa 2 minuti.

Questo passaggio si ripete, per poi sottoporre il tutto ad una stessa pressione ma, diversamente da prima, per 20 minuti; tale procedimento ha lo scopo della completa eliminazione di etanolo.

Le soluzioni presenti oramai sul fondo del contenitore possono essere eliminate, mentre sotto la piastra se ne pone un'altra che raccoglierà il DNA estratto.

Alle colonnine viene aggiunto 100 µl di Elution Buffer, avente una temperatura di 52 C°; questo permette il distacco del DNA dal filtro; si applica nuovamente una pressione finchè il trasferimento di DNA non si è completato.

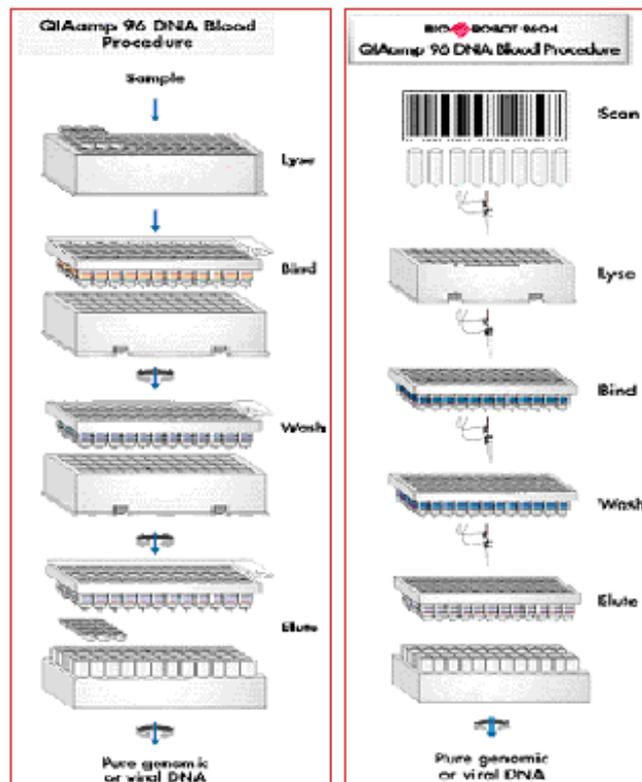


Fig 2.2.1 Piastra estrazione DNA

Il metodo che utilizza il Chelex prevede che i pozzetti vengano riempiti con 100-150 µl di soluzione digestiva, contenente 5% w/v Chelex 100 resin e 0,07 µg/µl di proteinasi K in acqua distillata; la proteinasi K è un enzima isolato da *Tritirachium album*, utilizzata per digerire le proteine cellulari e in particolare le nucleasi durante le procedure di purificazione degli acidi nucleici.

La piastra viene sigillata con un involucro in plastica, che aderisce perfettamente a questa, e incubata nella macchina per la PCR a 55 C° per 1 ora.

In seguito all'incubazione la proteasi viene inattivata, poiché sottoposta alla temperatura di 95 C° per 10 minuti, e la piastra viene per breve tempo o posta

in centrifuga (2000 rpm per 2 min) o lasciata sul tavolo per 5-10 min, in maniera tale che il sedimento di resina di Chelex si depositi sul fondo, lasciando in superficie un limpido surnatante (contenente DNA) che, una volta prelevato e isolato, può essere usato come template per l'amplificazione di PCR. [7]

I DNA genomici estratti sono stati conservati poi a -20 °C in appositi contenitori per eseguire le successive analisi.

### **2.3 ISOLAMENTO E MESSA A PUNTO DI MICROSATELLITI**

Come primo obiettivo si è dovuto selezionare un numero sufficiente di marcatori dopo un'attenta valutazione della letteratura scientifica inerente l'analisi genetica della specie in esame. [1]

Sono stati presi in esame 100 loci microsatelliti, da questi ne sono stati selezionati 9 rispondenti a determinate caratteristiche:

- elevata variabilità (elevato numero di alleli, almeno 9-12)
- specifiche tecniche in grado di assicurare un ottimale sviluppo del marcatore (sequenza del clone adeguata al disegno di un saggio specifico per dimensioni e fluorocromo).

I 9 marcatori (loci) sono stati amplificati suddividendoli in due gruppi di cinque e quattro loci secondo la dimensione dell'amplicone (prodotto di PCR).

Il 5plex è così composto:

small	Dla 248 FAM
	Dla 228 HEX
	Dla 244 TAMRA
medium	Dla 20 FAM
	Dla 105 HEX

Il 4plex è così composto:

medium	Dla 145 TAMRA
large	Dla 8 FAM
	Dla 119 HEX
	Dla 16 TAMRA

I prodotti di amplificazione sono stati opportunamente mescolati, al fine di ottenere un rapporto ottimale in termini di costo/qualità tra i marcatori analizzati per singola corsa elettroforetica.

I loci microsatelliti selezionati sulla base dei criteri elencati in precedenza sono stati analizzati mediante reazione di amplificazione PCR (Polymerase Chain Reaction) nella quale si utilizzano come starter due oligonucleotidi sintetici (coppia di *primer*).

Il prodotto di amplificazione è stato controllato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.8% e in seguito fatto correre al sequenziatore automatico.

In ogni coppia un *primer* è stato marcato all'estremità 5' con un fluoroforo che emette fluorescenza ad una specifica lunghezza d'onda, se eccitato opportunamente da una luce laser. In questo modo è possibile individuare i frammenti durante la migrazione elettroforetica in un sequenziatore automatico. Nel caso specifico sono stati utilizzati tre tipi di fluorocromi distinti per il colore: verde (HEX), blu (6-FAM) e giallo (TAMRA).

I primer sono stati ulteriormente testati utilizzando il software Oligo Analyzer 1.1.2 per avere una maggior sicurezza nel determinare l'esatta temperatura di *annealing* per ogni coppia. (Tutti i primer sono stati ordinati alla MWG Biotech). Di seguito sono riportate le sequenze delle coppie di primer del nonetto utilizzato. I primer sono divisi in tre gruppi di taglie e sono stati amplificati in due reazioni multiplex distinte.

#### LARGE SIZE

Locus	Repeat	Sequence	Dye	T <sub>a</sub>	Size range	alleles	LG
DLA0008	(AC) <sub>24</sub>	F:AAGCTATCTGATCTCGCTTG R:ACGTGATTAAGTGTGTTGTGAG		56	236-298	11	24
DLA0119	(TG) <sub>10</sub>	F:GCAGGTTCAAATTATTTTGTCTC R:TCCTCCTTTTGTCTGCTAGG		54	219-261	10	14
DLA0016	(TG) <sub>24</sub>	F:GTGACCGCAGATGAAGAAC R:ACTGTGGGCTCATAAACATC		54	228-258	11	1

#### MEDIUM SIZE

Locus	Repeat	Sequence	Dye	T <sub>a</sub>	Size range	Alleles	LG
DLA0020	(TG) <sub>20</sub>	F:GTCTAATGAGCAGTGGAGCAG R:GCATGTTAGATCCACCTCTTTC		56	153-175	8	12

<b>DLA0105</b>	(AC) <sub>16</sub>	F:GAGGCTGTATGCTGTTGCAG R:ACCCATGCATAAAGGTCAGTG		56	138-172	9	8
<b>DLA0145</b>	(TC) <sub>20</sub>	F:CCCACAATAGATTCAAATAG R:CACACATGCAATTATACTG		54	152-188	10	17

#### SMALL SIZE

Locus	Repeat	Sequence	Dye	T <sub>a</sub>	Size range	Alleles	LG
DLA0248	(TC) <sub>5</sub> ACAT(TC) <sub>5</sub> (T) <sub>2</sub> (TC) <sub>7</sub> (AC) <sub>3</sub> (ACGC) <sub>4</sub>	F:TGCATGATGATGTGTGAGCA R:TGGCAGGCTAAAACCTCAAG		54	111-127	5	?
<b>DLA0228</b>	(AAAG) <sub>3</sub> (AG) <sub>4</sub> (AAAG) <sub>3</sub>	F:CCAATGTTTTTCATCCCCTCA R:TTGCTGCTTGTGAAGTGACC		54	86-98	3	?
<b>DLA0244</b>	(TG) <sub>12</sub> (AG) <sub>5</sub> (TG) <sub>2</sub>	F:ACTGAAAGCACAGCCTGGTT R:CCCCATCCAATACACTCAC		54	100-104	3	?

Fig 2.3.1 Loci microsatelliti sviluppati suddivisi in base alla dimensione dell'amplificato. Nome del locus (Locus), numero di unità ripetute (Repeat), sequenza del primer (Sequence), colore del fluoroforo (Dye), temperatura di annealing (T<sub>a</sub>), lunghezza del frammento amplificato (Size range), numero di alleli e linkage group (LG).

## 2.4 AMPLIFICAZIONE DEI LOCI MICROSATELLITI MEDIANTE PCR

La PCR ( Polymerase Chain Reaction ) è un metodo ideato da K.B.Mullis nel 1985 grazie al quale uno specifico frammento di Dna può essere prodotto in più copie; per l'amplificazione sono necessari:

- Una coppia di *primer* (oligonucleotidi) dove per primer si intende un filamento di acido nucleico che serve da innesco per la replicazione del DNA. I primer sono necessari perché molte DNA-polimerasi (enzimi che catalizzano la reazione di replicazione di DNA) non possano iniziare la sintesi di un nuovo filamento ma possono solo aggiungere nucleotidi ad un filamento pre-esistente. Tali primer aderiscono al DNA in una fase detta *annealing* . I due primer utilizzati per la PCR vengono definiti *forward* e *reverse*, a seconda che siano complementari al filamento 3'→5' o a quello inverso 5'→3'.
- Una DNA polimerasi termostabile, solitamente Taq polimerasi, che estende i primer copiando i filamenti stampo di DNA. Tale enzima opera ad una temperatura ottimale di 70-80 C°, e presenta un tasso di estensione di più di 60 nucleotidi al secondo.
- DNA genomico che funge da stampo.

- Deossinucleotidi trifosfato ( dATP, dGTP, dTTP, dCTP ) che vengono aggiunti ai nuovi filamenti della Taq polimerasi.
- Ione MgCl<sub>2</sub> importante per l'attività della Taq polimerasi, ibridizzazione dei primer e aumenta la temperatura cui il DNA stampo si denatura.
- Tampone di reazione che crea un ambiente ottimale a pH e forza ionica perché avvenga la reazione.

L'amplificazione dei filamenti si ottiene grazie alla ripetizione di cicli che prevedono tre stadi:

- denaturazione: rottura dei legami idrogeno tra le basi azotate e la conseguente separazione dei due filamenti della doppia elica di DNA dello stampo;
- annealing: avviene l'appaiamento specifico dei oligonucleotidi con la sequenza complementare;
- estensione: in cui avviene la sintesi del DNA mediante allungamento dei primer e la formazione dei nuovi filamenti.

La mix di amplificazione è stata aggiunta ad un'aliquota del DNA genomico estratto (circa 10 ng) in apposite piastre da 96 pozzetti; [7]

Tale mix comprende:

Buffer 5x (GoTaq Buffer)	4 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,8 µl
DNTP's (25 mM)	0,056 µl
Primer Rev/For	0,3 µl (large)/0,25 (medium)/0,15 (small) a seconda della taglia del locus amplificato
Taq Polimerasi (Promega)	0,16 unità/µl

H2O	Fino a 15 $\mu$ l
gDNA diluito	5 $\mu$ l

Tot 20 $\mu$ l

Il profilo di amplificazione, condotta dall'apparecchiatura One Advanced, prevede:

- Primo ciclo 2 minuti a 94C°  
30 secondi a 52 C°  
2 minuti a 72 C°
- 33 cicli 30 sec a 94 C° (Denaturazione)  
30 sec a 52 C° (annealing)  
40 sec a 72 c° (extension o polimerizzazione)
- 5 minuti a 72 C° (final extension)

(Ai 5  $\mu$ l di DNA estratto trasferiti in ogni pozzetto della piastra si sono aggiunti 15  $\mu$ l della mix di reazione.)

## **2.5 ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO**

Per il controllo dell'avvenuta amplificazione è stata fatta una corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1,8% che ha una capacità di separare frammenti dai 0,4 Kb ai 50 Kb, per frammenti più piccoli si usa un gel di poliacrilammide, per frammenti maggiori si usa la tecnica pulse filter elettroforesis.

L'elettroforesi è una tecnica che si basa sul movimento di particelle elettricamente cariche immerse in un fluido e che per effetto di un campo elettrico applicato mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso, separa i frammenti.

L'elettroforesi sul gel d'agarosio è infatti una tecnica che serve per analizzare e purificare il DNA tagliato precedentemente dagli enzimi di restrizione; tale tecnica utilizza le cariche presenti nelle molecole di DNA (caricata negativamente) per farle correre attraverso un gel di selezione, costituito da una serie di pori, che ha la funzione di separare le molecole in base alla loro grandezza; quelle più piccole attraverseranno più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi, quindi si avrà una separazione in funzione della velocità.

L'elettroforesi avviene a 80 V (voltaggio costante) per circa 1,5-2 ore, a temperatura ambiente in tampone TAE.

L'agarosio è un polisaccaride lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosilici; l'agarosio è uno zucchero solubile in acqua alla temperatura di ebollizione, mentre diventa solido man mano che si raffredda formando una matrice attraverso dei legami a idrogeno tra le catene lineari.

La preparazione del gel avviene con l'aggiunta di 1,8 g di agarosio a 100 ml di TAE 1X (tampone salino); per sciogliere l'agarosio nel TAE si è utilizzato un forno a microonde, la soluzione viene fatta raffreddare quindi si aggiunge Syber Safe 1X (Invitrogen) cioè 0,1 mg su ml di gel d'agarosio.

Il TAE 1X utilizzato viene diluito da una concentrazione iniziale di 50X così composta:

- 242 mM di Tris-base
- 18,6 mM di EDTA
- 5,7 % (v/v) di acido acetico

Perciò 5 µl di prodotto di PCR ( 20µl di cui vengono usati 0,5µl di estratto di Chelex +4,5 µl di H<sub>2</sub>O) vengono caricati su gel d'agarosio.

Quindi vengono mescolati a 5 µl di colorante Loading\_Dye 2X composto da Glicerolo 30%, Blu di Bromofenolo 0,25%, Xilene 0,25%, Orange 0,25%.

Il glicerolo contenuto nel colorante permette di aumentare il peso del campione e facilitarne il caricamento evitando che esso si disperda nel Buffer di corsa (TAE 0,5%), mentre il colorante permette di seguire visivamente la migrazione dei campioni in quanto esposti a luce ultravioletta.

Ultimata la corsa infatti il gel viene posto sotto un transilluminatore, perciò i frammenti di DNA colorati vengono colpiti dai raggi UV, rendendo visibile le bande date dai frammenti di DNA amplificati.

## **2.6 GENOTYPING**

Il servizio di elettroforesi su capillare dei frammenti (sequenziatore automatico *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* o *ABI PRISM 3100 DNA Analyzer*, Applied

*Biosystems*) è stato fornito dal Centro di Ricerca Interdipartimentale in Biotecnologie Innovative (CRIBI) dell'Università di Padova.

Per l'elaborazione dei risultati è stato utilizzato il programma *Genographer 1.6.0* (<http://hordeum.msu.montana.edu/genographer/> Benham J. J., 2001) che permette di visualizzare la dimensione dei frammenti ricostruendo l'immagine grafica della corsa elettroforetica a partire da file in formato ABI3100 - ABI3700.

Per ogni campione è stato possibile identificare i frammenti amplificati per colore del fluoroforo e quindi dimensionare gli alleli di ogni locus microsatellite. Il dimensionamento dei singoli alleli avviene per confronto con lo standard interno (GS 400 Hd Rox) marcato con fluoroforo Rox.

*Genographer 1.6.0.* ha permesso, in particolare, di definire le categorie alleliche per ogni locus tra diverse corse elettroforetiche basandosi sulle dimensioni attese del prodotto di PCR.

Con il programma *Genotyper 3.7 (Applied Biosystems)* è possibile caratterizzare per ogni individuo un tipico profilo microsatellite.

Ogni prodotto amplificato di un locus microsatellite può essere visualizzato in un grafico avente per ascissa il tempo di migrazione nel capillare (proporzionale alle dimensioni del frammento) e per ordinata l'intensità del prodotto amplificato.

## **2.7 ANALISI DEL GRADO DI PARENTELA DEI CANDIDATI RIPRODUTTORI DI MONFALCONE**

Per stimare il grado di relatedness tra i candidati riproduttori sono stati utilizzati tre diversi software.

Con il software *GenAlEx* sono stati confrontati i valori di relatedness media tra l'insieme degli individui ora in riproduzione a Cà Zuliani e l'insieme degli individui dei candidati riproduttori.

Con lo stesso programma è stato calcolato anche il coefficiente di inbreeding (Fis) per i candidati riproduttori (CR) e per il parco riproduttori Cà Zuliani.

E' stato ottenuto un valore di 0,00 e 0,05 per le due popolazioni rispettivamente.

Con il software *Genetix*, è stato utilizzato per effettuare confronti tra le popolazioni prese in esame mediante l'analisi dei componenti principali (PCA), cioè delle frequenze alleliche; mediante questo algoritmo si riassumono i dati delle frequenze alleliche in due o tre variabili principali che, appunto, sintetizzano i dati (eterozigosità media osservata  $H_o$  cioè la presenza di individui eterozigoti nella popolazione per ciascuno dei loci presi in esame, eterozigosità media attesa  $H_e$  supponendo che la popolazione sia in equilibrio di Hardy-Weimberg, e frequenze alleliche per locus). Le nuove variabili sintetiche sono calcolate sempre partendo dalle frequenze alleliche, e tramite algoritmi di algebra lineare si calcolano delle nuove variabili che sono una combinazione lineare delle frequenze alleliche originali.

Il programma *ML-Relate* ha permesso di attribuire un valore di relatedness per tutti i confronti a coppie tra i 188 individui.

Il valore è compreso tra 1 e 0, dove 1 indica il massimo grado di parentela.

Il valore soglia al di sotto del quale risulta statisticamente bassa la probabilità che due individui siano imparentati è stato individuato a 0.2.



### 3. Risultati e Discussione

I soggetti che sono stati utilizzati nella nostra indagine sono stati individuati previa lettura del chip, inserito nell'animale quando ha raggiunto un peso minimo di 200 gr.

Di questi, 216 provengono dal parco riproduttori di Valle Cà Zuliani di Pila mentre 118 sono i candidati riproduttori di Cà Zuliani di Monfalcone.

**Tabella 1:** elenco dei 216 riproduttori campionati.

ID	CHIP	SESSO			
			R37	501E642138	Femmina
R1	404E15045E	Femmina	R38	452E62170	Femmina
R2	404F701F7B	Femmina	R39	45376D7A26	Femmina
R3	404E531955	Femmina	R40	20203D146F	Maschio
R4	452F2E6014	Femmina	R41	501D616D6B	Femmina
R5	501E68487C	Femmina	R42	404F6E513A	Femmina
R6	20265B104F	Femmina	R43	452E7F5C48	Femmina
R7	2026246234	Femmina	R44	4463606105	Femmina
R8	2023740346	Maschio	R45	501E597725	Maschio
R9	2023077640	Femmina	R46	452E67675F	Femmina
R10	4050071D49	Femmina	R47	2026416F0A	Maschio
R11	404E1B341F	Maschio	R48	501E586C1E	Femmina
R12	404D7C7145	Maschio	R49	43196E1C01	Femmina
R13	2023730E3C	Femmina	R50	501E595B7A	?
R14	404E3D1E12	Femmina	R51	4324184A3E	Femmina
R15	501E687669	Femmina	R52	501E5E067D	Femmina
R16	4323496C45	Femmina	R53	501E623B5F	Femmina
R17	452E78506B	Femmina	R54	501F16636C	Femmina
R18	20262C5D31	Maschio	R55	501E6B635D	Femmina
R19	20263C433B	Maschio	R56	501E632E0C	Femmina
R20	501E690263	Femmina	R57	501F0F1D2F	Femmina
R21	501E624707	Femmina	R58	404E173567	Femmina
R22	407A244C07F	Femmina	R59	501E5B1A47	Femmina
R23	452E791125	Femmina	R60	501E641252	Maschio
R24	501E657705	Femmina	R61	501E6B7D4B	Femmina
R25	404E0A2B52	Maschio	R62	501F0A3665	Maschio
R26	407A1C1E18	Femmina	R63	501E6A5023	Femmina
R27	43197F6215	Femmina	R64	40797F1903	Femmina
R28	501E58087E	Femmina	R65	501E57306D	Femmina
R29	431A354826	Femmina	R66	22174C4F51	Femmina
R30	2026441462	Maschio	R67	501E670552	Maschio
R31	404E1D5A66	Femmina	R68	405000180F	Femmina
R32	501D540F3B	Femmina	R69	501D5D742D	Femmina
R33	501E672472	Femmina	R70	501E617842	Femmina
R34	20255D5509	Femmina	R71	501E64364B	Femmina
R35	501E612E6B	Femmina	R72	501E6C4870	Femmina
R36	4538031021	Femmina	R73	501E5B7661	Femmina

R74	501E691E41	Femmina	R223	452E7E5234	Femmina
R75	501E653245	Maschio	R224	431A366A62	Femmina
R76	501E5E4B7B	Femmina	R225	452F0B4018	
R77	501F120623	Femmina	R226	452F594151	Femmina
R101	404E313022		R227	452E473355	Femmina
R102	452F7F465D		R228	452E63381F	Femmina
R103	404E0E7412		R229	452E79591A	Femmina
R104	501E5D743E	Maschio	R230	4537106839	Femmina
R105	45336E4C5A		R231	452E764D56	Femmina
R106	452F13343D		R232	4533680E7C	Femmina
R107	501E6A060A		R233	45CE523321	Femmina
R108	501F0A3E23		R234	4319700916	Femmina
R109	453F7A4F7B		R235	452F13234E	Femmina
R110	2033671234		R236	431A176F58	Femmina
R111	452F79155B		R237	4464100C55	Femmina
R112	404E357D28		R238	4536612A1E	Femmina
R113	45373A105C		R239	452E6D1371	Femmina
R114	452F46173C		R240	454A412E49	Femmina
R115	45340D1A39		R241	501E65200F	Femmina
R116	201F521F50	Maschio	R242	452E656C69	Femmina
R117	453F7D6D33		R243	452E340056	Femmina
R118	4066261E29		R244	431976022C	Femmina
R119	201F4E1D56	Maschio	R245	4322220F1E	
R120	452E771F71		R246	501E602300	Femmina
R121	4535315C2A		R01A	981100000143373	
R122	404F7F3C47	Maschio	R02A	981100000144753	
R123	501E6B6A38		R03A	981100000143161	
R124	501E5B4874		R04A	981100000141983	
R125	4536524B4F		R05A	981100000141471	
R126	404F2D531C		R06A	981100000141099	
R201	452E30460D		R07A	981100000144770	
R202	452F31144E		R08A	981100000143676	
R203	452F025940	Femmina	R09A	981100000139438	
R204	4323243A55	Femmina	R10A	981100000142694	
R205	452F4C1D7E	Femmina	R11A	981100000142716	
R206	44635F4B27	Maschio	R12A	981100000144010	
R207	431A124B59	Femmina	R13A	981100000139855	
R208	454A6A4765	Femmina	R14A	98110000013438	
R209	452E41067A	Femmina	R15A	981100000139028	
R210	452F28053C	Femmina	R16A	981100000144226	
R211	501E660651	Femmina	R17A	981100000141961	
R212	501F061E7B	Femmina	R18A	981100000141489	
R213	431B2B294B		R19A	981100000143087	
R214	452F0E524A	Femmina	R20A	981100000139917	
R215	454B0C340F	Femmina	R21A	981100000140066	
R216	40500A5D7F	Maschio	R22A	981100000143587	
R217	454A0A6C41	Femmina	R23A	981100000139336	
R218	452E422729	Femmina	R24A	981100000140365	
R219	40670A2C42	Maschio	R25A	981100000142870	
R220	4533744F11	Femmina	R26A	981100000139620	
R221	452E640441		R27A	981100000141624	
R222	45341A7101		R28A	981100000140374	

R29A	981100000138929	R49a	981100000143206
R30A	981100000141397	R50a	381100000143035
R31A	981100000142755	R51a	981100000143550
R32A	981100000143565	R52a	981100000142999
R33A	981100000143263	R53a	981100000143863
R34A	981100000141116	R54a	981100000140332
R35A	981100000141552	R55a	981100000142641
R36A	981100000144800	R56a	981100000142783
R37A	981100000139642	R57a	981100000139658
R38A	981100000143093	R58a	981100000139521
R39A	981100000142560	R59a	981100000143628
R40A	981100000142495	R60a	981100000142174
R41A	981100000144694	R61a	981100000139346
R42A	981100000141476	R62a	981100000141526
R43A	981100000143717	R63a	981100000140872
R44a	981100000142996	R64a	981100000142774
R45a	981100000139368	R65a	981100000142757
R46a	981100000139538	R66a	981100000142863
R47a	981100000140061	R67a	981100000142221
R48a	981100000140533		

**Tabella 2:** elenco dei 188 candidati riproduttori

<b>ID</b>	<b>CHIP</b>	<b>SESSO</b>			
CR_1	655025	Femmina	CR_25	653110	
CR_2	665066	Femmina	CR_26	653358	
CR_3	660598		CR_27	661977	
CR_4	662119	Femmina	CR_28	654249	Femmina
CR_5	660125	Femmina	CR_29	662309	Maschio
CR_6	654581		CR_30	656627	
CR_7	664584	Femmina	CR_31	661400	Maschio
CR_8	652640		CR_32	664336	Femmina
CR_9	655053		CR_33	651294	Maschio
CR_10	660397		CR_34	659941	Femmina
CR_11	664998	Maschio	CR_35	658995	
CR_12	654631	Maschio	CR_36	652944	Femmina
CR_13	663212	Maschio	CR_37	660021	Femmina
CR_14	660542	Femmina	CR_38	659461	Maschio
CR_15	651293	Femmina	CR_39	658298	Femmina
CR_16	659844	Femmina	CR_40	663835	Maschio
CR_17	664449	Maschio	CR_41	664276	
CR_18	664880	Femmina	CR_42	656131	Maschio
CR_19	664389	Femmina	CR_44	660361	Maschio
CR_20	653916		CR_45	659327	
CR_21	662760	Femmina	CR_46	654047	
CR_22	662021		CR_47	657176	
CR_23	658306	Femmina	CR_48	658197	
CR_24	652330	Maschio	CR_49	653808	Femmina
			CR_50	655056	Femmina

CR_51	654768	Femmina	CR_104	651784	
CR_52	663253		CR_105	654215	Femmina
CR_54	656307		CR_106	653139	Femmina
CR_56	664199		CR_107	661242	Maschio
CR_57	663477	Femmina	CR_108	604982	Femmina
CR_58	653102		CR_109	615092	Femmina
CR_61	662893	Maschio	CR_110	616256	Maschio
CR_62	660464		CR_111	605733	Femmina
CR_63	652682		CR_112	604556	Femmina
CR_64	661831		CR_113	604682	
CR_65	658337	Femmina	CR_114	604232	Femmina
CR_66	654956	Maschio	CR_115	612870	Femmina
CR_67	664047		CR_116	606428	Femmina
CR_70	662560	Femmina	CR_117	603453	Maschio
CR_71	661105	Maschio	CR_118	607934	Femmina
CR_72	656848	Femmina	CR_119	605363	Femmina
CR_73	664071	Femmina	CR_120	604231	Maschio
CR_74	662774	Femmina	CR_121	612290	Femmina
CR_75	663065	Femmina	CR_122	604861	Femmina
CR_76	659198		CR_123	605113	Femmina
CR_78	653617		CR_124	605726	Maschio
CR_79	664173	Maschio	CR_125	615443	Femmina
CR_80	658538	Femmina	CR_126	608979	Femmina
CR_81	658362		CR_127	603621	
CR_82	661219	Femmina	CR_128	617470	
CR_83	656504		CR_129	613668	Maschio
CR_84	656920	Maschio	CR_130	615466	
CR_85	664345	Femmina	CR_131	605633	Femmina
CR_86	662532		CR_132	613408	Maschio
CR_87	659866	Femmina	CR_133	603358	Femmina
CR_88	658610	Femmina	CR_134	603878	Femmina
CR_89	663509	Femmina	CR_135	605786	Femmina
CR_90	657217	Femmina	CR_136	603749	Femmina
CR_91	652322	Femmina	CR_137	615040	Femmina
CR_92	651472	Femmina	CR_138	603937	Femmina
CR_93	661068		CR_139	618225	Femmina
CR_94	661227		CR_140	606677	
CR_95	661259		CR_141	604887	Femmina
CR_96	660614		CR_142	605873	
CR_97	651993	Femmina	CR_143	617134	Femmina
CR_98	664957	Maschio	CR_144	603347	Maschio
CR_99	662369	Femmina	CR_145	605785	
CR_100	661549	Femmina	CR_146	606496	Maschio
CR_101	664468	Femmina	CR_147	604240	Femmina
CR_102	660370		CR_148	607783	Maschio
CR_103	662754	Femmina	CR_149	605620	Femmina

CR_150	604754	Maschio	CR_174	603865	Femmina
CR_151	605213		CR_175	616226	Femmina
CR_152	604242		CR_176	605293	Maschio
CR_153	605254	Femmina	CR_177	615190	Maschio
CR_154	611329		CR_178	613511	Femmina
CR_155	615078		CR_179	615020	Femmina
CR_156	604031	Femmina	CR_180	603855	
CR_157	603820	Femmina	CR_181	603323	Femmina
CR_158	605628	Femmina	CR_182	604465	Maschio
CR_159	604512	Femmina	CR_183	605625	
CR_160	617339		CR_184	603913	Femmina
CR_161	605653	Maschio	CR_185	605896	
CR_162	605405		CR_186	605156	
CR_163	604016	Femmina	CR_187	607948	Femmina
CR_164	604081	Femmina	CR_188	604163	
CR_165	612080	Femmina	CR_189	608529	
CR_166	618258	Maschio	CR_190	604523	
CR_167	605064	Maschio	CR_192	608121	
CR_168	604422		CR_193	603705	Maschio
CR_169	603312	Femmina	CR_194	605358	Femmina
CR_170	605062	Femmina	CR_195	604395	Femmina
CR_171	618640	Femmina	CR_196	615976	
CR_172	605085	Maschio	CR_197	604652	Femmina
CR_173	615958	Femmina			

Sottoposti all'estrazione di DNA genomico, come descritto nella sezione Materiali e Metodi, si è ottenuto il profilo genetico degli individui.

Nelle rispettive Tabelle in Appendice sono indicati i genotipi dei riproduttori di Valle Cà Zuliani, dei 468 avanotti esaminati e dei 188 candidati riproduttori di Monfalcone.

Una volta estratto il DNA e amplificato, questo è stato controllato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Il risultato, di cui qui di seguito abbiamo un esempio, dimostra come il prodotto di amplificazione di quattro marcatori relativo ad un individuo processato viene identificato con una banda.

L'altezza della banda, confrontata con un marcatore di peso molecolare conosciuto, dà una prima stima delle dimensioni dei frammenti amplificati.

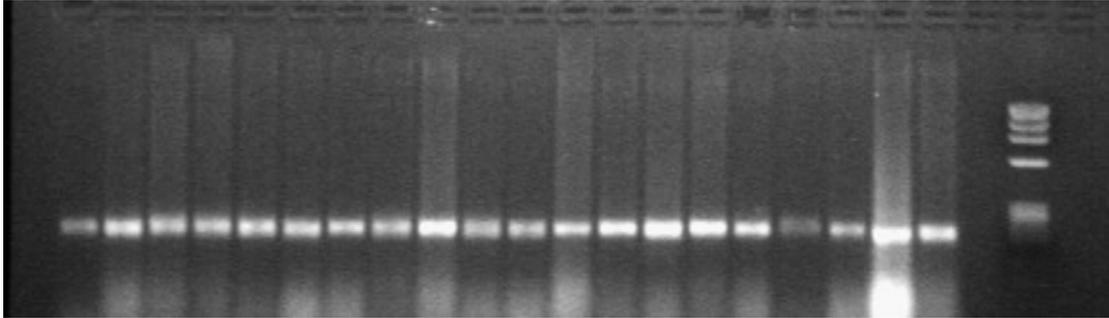


Fig 3.1 Corsa elettroforetica su gel d'agarosio

In gel di agarosio non è possibile stabilire differenze di poche coppie di basi ed è quindi necessario procedere con il “*genotyping*” mediante elettroforesi capillare dei frammenti.

Con l'utilizzo del software Genotyper 3.7 è stato possibile analizzare i risultati del sequenziamento riconoscere gli alleli di ogni locus microsatellite grazie alle diverse colorazioni che rappresentano l'emmissione del marcatore fluorescente, e dimensionarli in paia di basi confrontandoli ad una scala di lunghezza qui non riportata.

Viene riportato in un grafico avente per ascissa il tempo di migrazione sul gel e per ordinata l'intensità del prodotto amplificato.

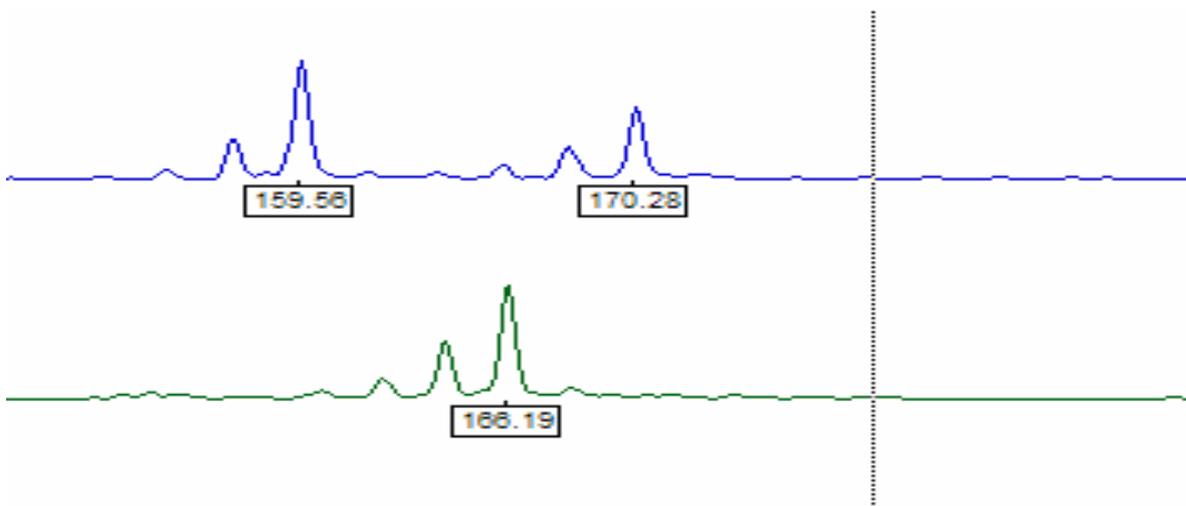


Fig 3.2 Output del software per l'analisi dei frammenti Genotyper 3.7

L'analisi di ogni picco allelico ha permesso di ricavare il profilo allelico di ogni individuo.

Si sono osservati, tra gli individui del parco riproduttori di Cà Zuliani e l'insieme dei candidati riproduttori, valori di relatedness media molto simili, non presentano infatti differenze statisticamente significative.

Per questo tipo di calcolo è stato utilizzato il software *GenAIEx*.

Nella figura sottostante si riporta l'output del programma.

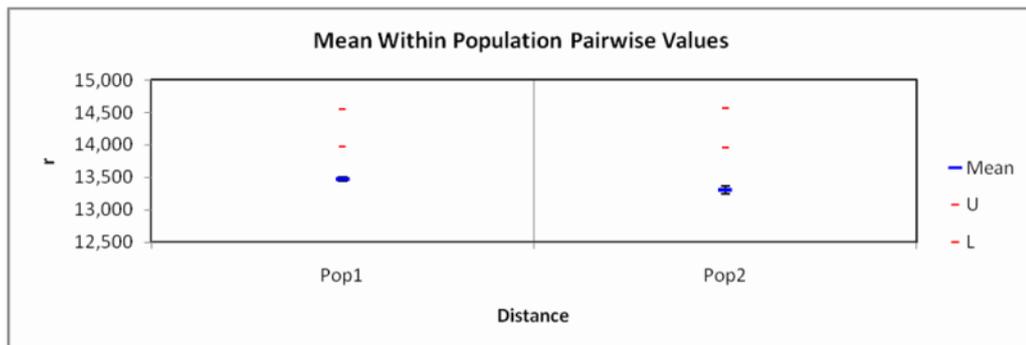


Figura 3.3: relatedness media delle popolazioni dei riproduttori Cà Zuliani (pop1) e candidati riproduttori (pop2).

Calcolato anche il coefficiente di inbreeding ( $F_{is}$ ) per i candidati riproduttori (CR) e per il parco riproduttori di Cà Zuliani si sono ottenuti valori compresi tra 0,00 e 0,05; dove questo ultimo misura un più alto grado di parentela ovvero la percentuale di geni provenienti da un antenato in termini statistici e probabilistici.

Nella figura sottostante è rappresentata la finestra di output del programma Genetix, dove ogni individuo è rappresentato da un quadratino.

Il risultato che si presenta manifesta la diversità genetica delle popolazioni o degli individui all'interno delle stesse. Questa è calcolata sulla base delle frequenze alleliche.

I valori di calcolo delle distanze genetiche tra le popolazioni sono compresi tra 0 e 1, e all'aumentare del valore aumenta la distanza genetica tra le popolazioni.

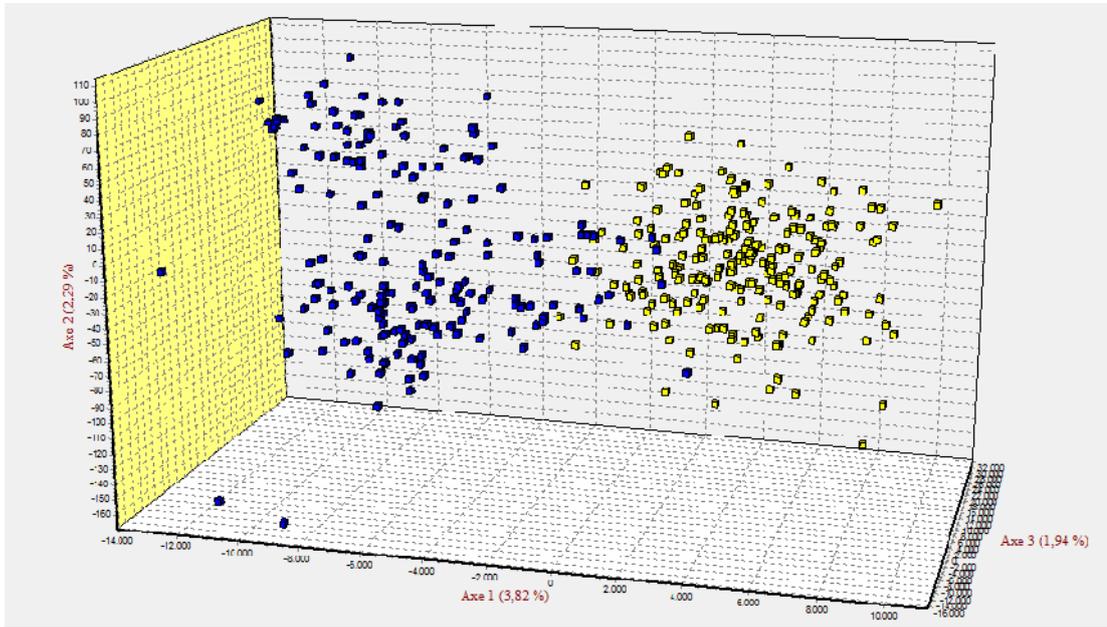


Figura 3.4 : Analisi delle componenti principali dei dati genetici per la popolazione di riproduttori Cà Zuliani (in giallo) e la popolazione di candidati riproduttori di Monfalcone (in blu).

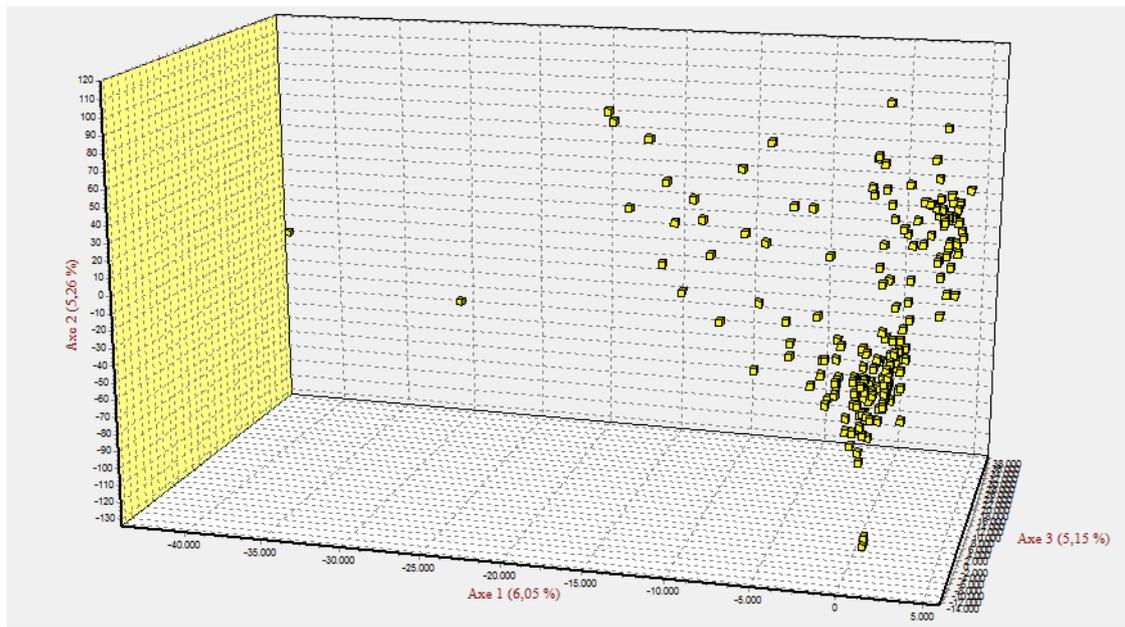


Figura 3.5 : Analisi delle componenti principali dei dati genetici per la popolazione dei candidati riproduttori di Monfalcone (in giallo).

**Tabella 3:** elenco dei candidati riproduttori che risultano geneticamente più distanti nell'analisi delle componenti principali (PCA).

ID	CHIP	SESSO	CR8	652640
CR6	654581		CR12	654631 Maschio
CR7	664584	Femmina	CR15	651293 Femmina

CR20	653916		CR103	662754	Femmina
CR26	653358		CR104	651784	
CR34	659941	Femmina	CR116	606428	Femmina
CR36	652944	Femmina	CR117	603453	Maschio
CR37	660021	Femmina	CR120	604231	Maschio
CR39	658298	Femmina	CR129	613668	Maschio
CR40	663835	Maschio	CR132	613408	Maschio
CR41	664276		CR133	603358	Femmina
CR42	656131	Maschio	CR136	603749	Femmina
CR45	659327		CR138	603937	Femmina
CR57	663477	Femmina	CR140	606677	
CR61	662893	Maschio	CR155	615078	
CR64	661831		CR157	603820	Femmina
CR65	658337	Femmina	CR159	604512	Femmina
CR70	662560	Femmina	CR165	612080	Femmina
CR74	662774	Femmina	CR168	604422	
CR75	663065	Femmina	CR173	615958	Femmina
CR76	659198		CR180	603855	
CR79	664173	Maschio	CR183	605625	
CR81	658362		CR184	603913	Femmina
CR85	664345	Femmina	CR186	605156	
CR91	652322	Femmina	CR187	607948	Femmina
CR92	651472	Femmina	CR192	608121	
CR94	661227		CR195	604395	Femmina
CR96	660614				
CR99	662369	Femmina			
CR100	661549	Femmina			
CR102	660370				

Con l'utilizzo del programma ML-Relate e perciò confrontando gli individui, si è potuto concludere che individui con relatedness molto bassa possono essere lasciati nella vasca di origine; mentre gli individui evidenziati con il colore si trovano, per numero di confronti  $>0,2$ , nella parte superiore della mediana che bipartisce i dati e questo indica una relazione di parentela troppo stretta tra loro; questi perciò dovrebbero essere rimossi dalle rispettive vasche di appartenenza.

Infine i campioni contrassegnati con un asterisco sono quelli che, pur trovandosi al di sopra della mediana, possono essere trasferiti in altre vasche diverse da quelle di appartenenza senza il rischio di metterli insieme a probabili parenti.

**Tabella 4:** Confronti con percentuale di relatedness (R) >0,2 dei candidati riproduttori della vasca V1 settore1 2008.

<b>ID</b>	<b>CHIP</b>	<b>SESSO</b>	<b>% Confronti con R &gt; 0,2</b>
<b>CR_148</b>	607783	Maschio	0,000
<b>CR_4</b>	662119	Femmina	0,002
<b>CR_166</b>	618258	Maschio	0,002
<b>CR_116</b>	606428	Femmina	0,003
<b>CR_117</b>	603453	Maschio	0,003
<b>CR_132</b>	613408	Maschio	0,003
<b>CR_150</b>	604754	Maschio	0,003
<b>CR_12</b>	654631	Maschio	0,004
<b>CR_138</b>	603937	Femmina	0,004
<b>CR_79</b>	664173	Maschio	0,005
<b>CR_99</b>	662369	Femmina	0,005
<b>CR_101</b>	664468	Femmina	0,005
<b>CR_106</b>	653139	Femmina	0,005
<b>CR_29</b>	662309	Maschio	0,006
<b>CR_80</b>	658538	Femmina	0,006
<b>CR_90</b>	657217	Femmina	0,006
<b>CR_122</b>	604861	Femmina	0,006
<b>CR_126</b>	608979	Femmina	0,006
<b>CR_181</b>	603323	Femmina	0,006
<b>CR_39</b>	658298	Femmina	0,006
<b>CR_139</b>	618225	Femmina	0,006
<b>CR_169</b>	603312	Femmina	0,006
<b>CR_66*</b>	654956	Maschio	0,007
<b>CR_97</b>	651993	Femmina	0,007
<b>CR_105</b>	654215	Femmina	0,007
<b>CR_108</b>	604982	Femmina	0,007
<b>CR_111</b>	605733	Femmina	0,007
<b>CR_170</b>	605062	Femmina	0,007
<b>CR_112</b>	604556	Femmina	0,008
<b>CR_121</b>	612290	Femmina	0,008
<b>CR_123</b>	605113	Femmina	0,008
<b>CR_164</b>	604081	Femmina	0,008
<b>CR_11</b>	664998	Maschio	0,009
<b>CR_167</b>	605064	Maschio	0,009
<b>CR_187</b>	607948	Femmina	0,009
<b>CR_75</b>	663065	Femmina	0,010
<b>CR_82*</b>	661219	Femmina	0,010
<b>CR_114</b>	604232	Femmina	0,010
<b>CR_124</b>	605726	Maschio	0,010
<b>CR_136</b>	603749	Femmina	0,010
<b>CR_149</b>	605620	Femmina	0,010
<b>CR_158</b>	605628	Femmina	0,010
<b>CR_163</b>	604016	Femmina	0,010
<b>CR_49*</b>	653808	Femmina	0,011
<b>CR_71*</b>	661105	Maschio	0,011
<b>CR_135</b>	605786	Femmina	0,011
<b>CR_65</b>	658337	Femmina	0,012

**Tabella 5:** Confronti con percentuale di relatedness (R) >0,2 dei candidati riproduttori della vasca V2 settore1 2008.

<b>ID</b>	<b>CHIP</b>	<b>SESSO</b>	<b>% Confronti con R &gt; 0,2</b>
CR_70	662560	Femmina	0,000
CR_42	656131	Maschio	0,001
CR_7	664584	Femmina	0,002
CR_91	652322	Femmina	0,002
CR_157	603820	Femmina	0,002
CR_159	604512	Femmina	0,002
CR_32	664336	Femmina	0,003
CR_44	660361	Maschio	0,003
CR_61	662893	Maschio	0,003
CR_85	664345	Femmina	0,003
CR_100	661549	Femmina	0,003
CR_134	603878	Femmina	0,003
CR_13	663212	Maschio	0,004
CR_81	658362	Femmina	0,004
CR_57	663477	Femmina	0,004
CR_133	603358	Femmina	0,004
CR_173	615958	Femmina	0,004
CR_179	615020	Femmina	0,004
CR_21	662760	Femmina	0,005
CR_34	659941	Femmina	0,005
CR_51	654768	Femmina	0,005
CR_146	606496	Maschio	0,005
CR_174	603865	Femmina	0,005
CR_24*	652330	Maschio	0,006
CR_31*	661400	Maschio	0,006
CR_38*	659461	Maschio	0,006
CR_92*	651472	Femmina	0,006
CR_103	662754	Femmina	0,006
CR_109	615092	Femmina	0,006
CR_119	605363	Femmina	0,006
CR_129*	613668	Maschio	0,006
CR_156	604031	Femmina	0,006
CR_2*	665066	Femmina	0,007
CR_73	664071	Femmina	0,007
CR_74*	662774	Femmina	0,007
CR_98*	664957	Maschio	0,007
CR_110	616256	Maschio	0,008
CR_118	607934	Femmina	0,008
CR_143	617134	Femmina	0,008
CR_171	618640	Femmina	0,008
CR_19	664389	Femmina	0,010
CR_147	604240	Femmina	0,010
CR_33	651294	Maschio	0,012
CR_172	605085	Maschio	0,005

**Tabella 6:** Confronti con percentuale di relatedness (R) >0,2 dei candidati riproduttori della vasca quarantena 2008.

<b>ID</b>	<b>CHIP</b>	<b>SESSO</b>	<b>% Confronti con R &gt; 0,2</b>
CR_28	654249	Femmina	0,000
CR_16	659844	Femmina	0,001
CR_1	655025	Femmina	0,003
CR_18	664880	Femmina	0,003
CR_37	660021	Femmina	0,003
CR_40	663835	Maschio	0,003
CR_84	656920	Maschio	0,003
CR_120	604231	Maschio	0,003
CR_23	658306	Femmina	0,004
CR_36	652944	Femmina	0,004
CR_125	615443	Femmina	0,004
CR_195	604395	Femmina	0,004
CR_50	655056	Femmina	0,005
CR_72	656848	Femmina	0,005
CR_89	663509	Femmina	0,005

<b>CR_165</b>	612080	Femmina	0,005	<b>CR_197</b>	604652	Femmina	0,008
<b>CR_193</b>	603705	Maschio	0,005	<b>CR_5</b>	660125	Femmina	0,009
<b>CR_15</b>	651293	Femmina	0,007	<b>CR_87</b>	659866	Femmina	0,009
<b>CR_88</b>	658610	Femmina	0,007	<b>CR_144</b>	603347	Maschio	0,009
<b>CR_141</b>	604887	Femmina	0,007	<b>CR_153</b>	605254	Femmina	0,009
<b>CR_177</b>	615190	Maschio	0,007	<b>CR_161</b>	605653	Maschio	0,009
<b>CR_182</b>	604465	Maschio	0,007	<b>CR_176</b>	605293	Maschio	0,009
<b>CR_14*</b>	660542	Femmina	0,008	<b>CR_194</b>	605358	Femmina	0,009
<b>CR_17*</b>	664449	Maschio	0,008	<b>CR_115</b>	612870	Femmina	0,011
<b>CR_175</b>	616226	Femmina	0,008	<b>CR_131</b>	605633	Femmina	0,011
<b>CR_178</b>	613511	Femmina	0,008	<b>CR_107</b>	661242	Maschio	0,012
<b>CR_184</b>	603913	Femmina	0,008	<b>CR_137</b>	615040	Femmina	0,012

**Tabella 7:** Confronti con percentuale di relatedness (R) >0,2 di tutti i 188 candidati riproduttori.

<b>ID</b>	<b>CHIP</b>	<b>SESSO</b>	<b>% Confronti con R &gt; 0,2</b>				
<b>CR_70</b>	662560	Femmina	0,000	<b>CR_102</b>	660370		0,001
<b>CR_7</b>	664584	Femmina	0,000	<b>CR_120</b>	604231	Maschio	0,001
<b>CR_28</b>	654249	Femmina	0,000	<b>CR_9</b>	655053		0,001
<b>CR_91</b>	652322	Femmina	0,000	<b>CR_57</b>	663477	Femmina	0,001
<b>CR_140</b>	606677		0,000	<b>CR_44</b>	660361	Maschio	0,001
<b>CR_159</b>	604512	Femmina	0,000	<b>CR_52</b>	663253		0,001
<b>CR_116</b>	606428	Femmina	0,000	<b>CR_81</b>	658362		0,001
<b>CR_157</b>	603820	Femmina	0,000	<b>CR_100</b>	661549	Femmina	0,001
<b>CR_104</b>	651784		0,001	<b>CR_8</b>	652640		0,001
<b>CR_76</b>	659198		0,001	<b>CR_20</b>	653916		0,001
<b>CR_26</b>	653358		0,001	<b>CR_89</b>	663509	Femmina	0,001
<b>CR_30</b>	656627		0,001	<b>CR_98</b>	664957	Maschio	0,001
<b>CR_85</b>	664345	Femmina	0,001	<b>CR_101</b>	664468	Femmina	0,001
<b>CR_12</b>	654631	Maschio	0,001	<b>CR_132</b>	613408	Maschio	0,001
<b>CR_35</b>	658995		0,001	<b>CR_133</b>	603358	Femmina	0,001
<b>CR_36</b>	652944	Femmina	0,001	<b>CR_134</b>	603878	Femmina	0,001
<b>CR_37</b>	660021	Femmina	0,001	<b>CR_45</b>	659327		0,001
<b>CR_40</b>	663835	Maschio	0,001	<b>CR_92</b>	651472	Femmina	0,001
<b>CR_80</b>	658538	Femmina	0,001	<b>CR_125</b>	615443	Femmina	0,001
<b>CR_138</b>	603937	Femmina	0,001	<b>CR_155</b>	615078		0,001
<b>CR_1</b>	655025	Femmina	0,001	<b>CR_183</b>	605625		0,001
<b>CR_42</b>	656131	Maschio	0,001	<b>CR_2</b>	665066	Femmina	0,001
<b>CR_62</b>	660464		0,001	<b>CR_4</b>	662119	Femmina	0,001
<b>CR_96</b>	660614		0,001	<b>CR_17</b>	664449	Maschio	0,001
				<b>CR_84</b>	656920	Maschio	0,001
				<b>CR_93</b>	661068		0,001
				<b>CR_117</b>	603453	Maschio	0,001
				<b>CR_166</b>	618258	Maschio	0,001
				<b>CR_195</b>	604395	Femmina	0,001
				<b>CR_38</b>	659461	Maschio	0,001

<b>CR_39</b>	658298	Femmina	0,001	<b>CR_110</b>	616256	Maschio	0,002
<b>CR_49</b>	653808	Femmina	0,001	<b>CR_123</b>	605113	Femmina	0,002
<b>CR_79</b>	664173	Maschio	0,001	<b>CR_152</b>	604242		0,002
<b>CR_99</b>	662369	Femmina	0,001	<b>CR_156</b>	604031	Femmina	0,002
<b>CR_168</b>	604422		0,001	<b>CR_189</b>	608529		0,002
<b>CR_173</b>	615958	Femmina	0,001	<b>CR_58</b>	653102		0,002
<b>CR_14</b>	660542	Femmina	0,001	<b>CR_61</b>	662893	Maschio	0,002
<b>CR_34</b>	659941	Femmina	0,001	<b>CR_88</b>	658610	Femmina	0,002
<b>CR_66</b>	654956	Maschio	0,001	<b>CR_119</b>	605363	Femmina	0,002
<b>CR_74</b>	662774	Femmina	0,001	<b>CR_127</b>	603621		0,002
<b>CR_182</b>	604465	Maschio	0,001	<b>CR_139</b>	618225	Femmina	0,002
<b>CR_18</b>	664880	Femmina	0,001	<b>CR_150</b>	604754	Maschio	0,002
<b>CR_25</b>	653110		0,001	<b>CR_163</b>	604016	Femmina	0,002
<b>CR_41</b>	664276		0,001	<b>CR_169</b>	603312	Femmina	0,002
<b>CR_56</b>	664199		0,001	<b>CR_176</b>	605293	Maschio	0,002
<b>CR_148</b>	607783	Maschio	0,001	<b>CR_10</b>	660397		0,002
<b>CR_177</b>	615190	Maschio	0,001	<b>CR_11</b>	664998	Maschio	0,002
<b>CR_188</b>	604163		0,001	<b>CR_15</b>	651293	Femmina	0,002
<b>CR_24</b>	652330	Maschio	0,001	<b>CR_19</b>	664389	Femmina	0,002
<b>CR_47</b>	657176		0,001	<b>CR_95</b>	661259		0,002
<b>CR_126</b>	608979	Femmina	0,001	<b>CR_97</b>	651993	Femmina	0,002
<b>CR_154</b>	611329		0,001	<b>CR_109</b>	615092	Femmina	0,002
<b>CR_13</b>	663212	Maschio	0,001	<b>CR_153</b>	605254	Femmina	0,002
<b>CR_54</b>	656307		0,001	<b>CR_178</b>	613511	Femmina	0,002
<b>CR_193</b>	603705	Maschio	0,001	<b>CR_164</b>	604081	Femmina	0,002
<b>CR_22</b>	662021		0,001	<b>CR_175</b>	616226	Femmina	0,002
<b>CR_23</b>	658306	Femmina	0,001	<b>CR_67</b>	664047		0,002
<b>CR_32</b>	664336	Femmina	0,001	<b>CR_86</b>	662532		0,002
<b>CR_71</b>	661105	Maschio	0,001	<b>CR_87</b>	659866	Femmina	0,002
<b>CR_6</b>	654581		0,001	<b>CR_170</b>	605062	Femmina	0,002
<b>CR_31</b>	661400	Maschio	0,001	<b>CR_73</b>	664071	Femmina	0,002
<b>CR_78</b>	653617		0,001	<b>CR_106</b>	653139	Femmina	0,002
<b>CR_94</b>	661227		0,001	<b>CR_108</b>	604982	Femmina	0,002
<b>CR_165</b>	612080	Femmina	0,001	<b>CR_185</b>	605896		0,002
<b>CR_3</b>	660598		0,001	<b>CR_63</b>	652682		0,002
<b>CR_27</b>	661977		0,001	<b>CR_65</b>	658337	Femmina	0,002
<b>CR_29</b>	662309	Maschio	0,001	<b>CR_75</b>	663065	Femmina	0,002
<b>CR_50</b>	655056	Femmina	0,001	<b>CR_130</b>	615466		0,002
<b>CR_64</b>	661831		0,001	<b>CR_145</b>	605785		0,002
<b>CR_82</b>	661219	Femmina	0,001	<b>CR_160</b>	617339		0,002
<b>CR_129</b>	613668	Maschio	0,001	<b>CR_167</b>	605064	Maschio	0,002
<b>CR_16</b>	659844	Femmina	0,002	<b>CR_179</b>	615020	Femmina	0,002
<b>CR_21</b>	662760	Femmina	0,002	<b>CR_190</b>	604523		0,002
<b>CR_48</b>	658197		0,002	<b>CR_33</b>	651294	Maschio	0,002
<b>CR_72</b>	656848	Femmina	0,002	<b>CR_51</b>	654768	Femmina	0,002
<b>CR_90</b>	657217	Femmina	0,002	<b>CR_83</b>	656504		0,002

CR_118	607934	Femmina	0,002	CR_181	603323	Femmina	0,002
CR_121	612290	Femmina	0,002	CR_107	661242	Maschio	0,002
CR_122	604861	Femmina	0,002	CR_112	604556	Femmina	0,002
CR_128	617470		0,002	CR_137	615040	Femmina	0,002
CR_161	605653	Maschio	0,002	CR_103	662754	Femmina	0,002
CR_180	603855		0,002	CR_111	605733	Femmina	0,002
CR_184	603913	Femmina	0,002	CR_158	605628	Femmina	0,002
CR_192	608121		0,002	CR_197	604652	Femmina	0,002
CR_141	604887	Femmina	0,002	CR_135	605786	Femmina	0,002
CR_174	603865	Femmina	0,002	CR_149	605620	Femmina	0,002
CR_194	605358	Femmina	0,002	CR_171	618640	Femmina	0,002
CR_113	604682		0,002	CR_144	603347	Maschio	0,003
CR_146	606496	Maschio	0,002	CR_186	605156		0,003
CR_151	605213		0,002	CR_114	604232	Femmina	0,003
CR_5	660125	Femmina	0,002	CR_115	612870	Femmina	0,003
CR_143	617134	Femmina	0,002	CR_124	605726	Maschio	0,003
CR_162	605405		0,002	CR_131	605633	Femmina	0,003
CR_46	654047		0,002	CR_142	605873		0,003
CR_105	654215	Femmina	0,002	CR_196	615976		0,003
CR_187	607948	Femmina	0,002	CR_136	603749	Femmina	0,003
CR_147	604240	Femmina	0,002	CR_172	605085	Maschio	0,003

Quegli individui aventi relatedness molto bassa sia tra di loro che contro il resto del parco riproduttori, costituiscono una buona riserva per eventuali rinsanguamenti o rimescolamenti delle vasche; sono indicati come candidati riproduttori “di riserva”, non ancora immessi nelle vasche di produzione.

**Tabella 8:**

<u>ID</u>	<u>CHIP</u>		
CR_3	660598	CR_35	658995
CR_6	654581	CR_41	664276
CR_8	652640	CR_45	659327
CR_9	655053	CR_47	657176
CR_20	653916	CR_52	663253
CR_22	662021	CR_54	656307
CR_25	653110	CR_56	664199
CR_26	653358	CR_62	660464
CR_27	661977	CR_64	661831
CR_30	656627	CR_76	659198
		CR_78	653617
		CR_93	661068
		CR_94	661227
		CR_96	660614
		CR_102	660370
		CR_104	651784

**CR\_140** 606677  
**CR\_154** 611329  
**CR\_155** 615078  
**CR\_168** 604422  
**CR\_180** 603855

**CR\_183** 605625  
**CR\_186** 605156  
**CR\_188** 604163  
**CR\_192** 608121

## **DISCUSSIONE**

L'analisi dei dati ha reso possibile l'individuazione di quei candidati riproduttori, presenti nell'allevamento di Cà Zuliani sede di Monfalcone, più lontani geneticamente alla popolazione già presente nel parco riproduttori di Cà Zuliani di Pila.

Poiché non si conosceva la provenienza di tali individui, e poiché è importante escludere quegli animali avente valori di relatedness troppo elevati per non incombere nella riproduzione tra animali imparentati, si è proceduti all'estrazione di DNA, quindi all'individuazione di 9 loci microsatelliti, all'amplificazione di questi e all'analisi del profilo allelico di ogni individuo.

In conclusione, verificati i valori di relatedness tra tutti gli individui, grazie all'utilizzo di particolari software, è stato possibile indicare quei soggetti da introdurre nel parco riproduttori, poiché minore era la probabilità che questi fossero imparentati con gli individui già presenti.



## BIBLIOGRAFIA

[1]. **Chistiakov D.A, B. Hellemans, Chris S.Haley, Andy S. Law, Costas S. Tsigenopoulos, Georgios Kotoulas, Daniela Bertotto, Angelo Libertini and Filip A.M. Volckaert**, 2005. A microsatellite Linkage Map of the European Seabass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics* (170:1821-1826)

[2]. **D'Agaro E.**, Aspetti genetici collegati all'acquacoltura.  
(Consultato in <http://web.uniud.it/aipsac/index.htm>)

[3]. **E.Borgioli**, Genetica e miglioramento genetico degli animali agricoli. (17, 18:8, 20: 225-229)

[4]. **Esav**, Ricerca e Sperimentazione in Acquacoltura.

[5]. **Facoltà di Medicina di Veterinaria di Pisa**, 2008.  
Seminario filiera ittica

[6]. **FAO**, 2007. L'acquacoltura unica strada per colmare il deficit di pesci.

[7]. **Gen Y., Orban L.** (2005). A simple and affordable method for high-throughput DNA extraction from animal tissues for vpolymerase chain reaction.

[8]. **Ismea**, 2007. Il settore ittico in Italia e nel mondo: le tendenze recenti. (1:9-23, 2: 49-66, 3)

(Consultato in: <http://www.pesca.ismea.it/documenti.htm>)

[9]. **L.David, Michall Cox**, Zanichelli III° edizione.  
Introduzione alla biochimica di Lehninger (25: 331-332, 29: 382-389)

[10]. **Libri V.**,2004. Analisi automatica di marcatori genetici polimorfici del DNA e sue applicazioni in campo biomedico (Laboratorio di Oncoematologia Pediatrica, Bologna)

[11]. **Ministero delle Politiche Agricole e Forestali**, 2004(b). L'acquacoltura. Consultato in:  
<http://www.politicheagricole.it/PESCA/PRODOTTI/Acquacoltura/Approfondimenti.htm>)

[12]. **Pagnacco G.**, Genetica applicata alle produzioni animali, (9)

[13]. **Reg (CE) n. 104/2004** del consiglio del 17 dicembre 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. Gazzetta ufficiale della Comunità europea 21/1/2000

[14]. **Saroglia M., Ingle E.** 1992 Edagricole. Tecniche di Acquacoltura. (3:71-78, 82-89, 111-117)

[15]. **Sezione di controllo per gli affari comunitari e internazionali**, 2003(1). L'acquacoltura in Italia.

[16]. **SFOP-DOCUP 2000-2006**, Sviluppo di metodiche innovative per la tracciabilità genetica del branzino selvatico o prodotto nelle valli da pesca dell'Alto Adriatico.

[17]. **Soattin M.**, Elementi di genetica di base e marcatori molecolari .

[18]. **Wikipedia.** Dicentrarchus labrax. Consultato in  
[www.Wikipedia.it/Dicentrarchus](http://www.Wikipedia.it/Dicentrarchus)

# APPENDICE

**Tabella 6:** genotipi della popolazione di riproduttori di Valle Cà Zuliani.

	DLA008	DLA020	DLA248	DLA105	DLA119	DLA228	DLA145	DLA16	DLA244
<b>R1</b>	229237	160162	124126	147147	221223	8496	172174	248254	102104
<b>R10</b>	237273	160164	122122	159167	227261	8896	170172	242248	102104
<b>R101</b>	267273	158160	126126	145155	221221	8896	172180	242242	104110
<b>R102</b>	263293	160164	122126	145163	221261	8488	170172	262270	104104
<b>R103</b>	235267	160160	122126	147159	255263	9696	170172	242248	104104
<b>R104</b>	275277	160174	126126	145157	237241	8888	172172	224248	104108
<b>R105</b>	235237	160160	122124	147169	237261	8896	160172	242242	104110
<b>R106</b>	229231	162172	122122	145147	221221	8488	170172	246246	110110
<b>R107</b>	229269	160164	122124	145147	221263	8896	170174	248250	102104
<b>R108</b>	247261	164176	122124	145147	237255	8896	156164	234254	106110
<b>R109</b>	241255	160172	122126	159159	221235	8488	172180	248248	104104
<b>R10A</b>	237267	160174	122126	149167	229259	8488	174178	244246	104104
<b>R11</b>	225235	160160	122126	159159	221255	8888	172174	232242	104104
<b>R110</b>	259259	164166	122122	159167	237245	8896	172172	246248	104104
<b>R111</b>	295297	160164	122126	145153	227253	8896	160172	246250	104104
<b>R112</b>	225265	160172	122124	145145	221227	8896	170170	240246	104104
<b>R113</b>	273311	160164	122126	147155	221261	8896	170186	242242	102104
<b>R114</b>	243261	146160	122126	145167	241261	8888	162176	224244	102104
<b>R115</b>	269287	160170	122122	145147	221255	8896	172174	242246	102104
<b>R116</b>	229239	164178	122126	151159	223257	8892	170174	250256	102104
<b>R117</b>	237255	160168	126126	145167	235261	8896	172174	244248	102104
<b>R118</b>	229269	160160	122126	145145	237237	8488	160178	230244	102104
<b>R119</b>	291295	160160	122124	145145	221261	8496	172180	246252	104104
<b>R11A</b>	247249	160160	122122	163167	227229	8488	168178	242242	102102
<b>R12</b>	237293	160172	124124	145159	221265	9696	172172	224254	102104
<b>R120</b>	229299	162164	122126	145167	229261	8888	172174	246246	102104
<b>R121</b>	221237	162164	122122	145147	237261	8896	168172	242246	104104
<b>R122</b>	237293	160160	122126	145167	235259	9296	164188	228242	104104
<b>R123</b>	229255	160172	122126	147147	221221	8896	168174	246250	104104
<b>R124</b>	241245	160160	122126	145167	221221	8496	168170	246256	102102
<b>R125</b>	223283	164164	122126	145149	221237	8896	168188	242242	104104
<b>R126</b>	237237	160164	122122	145159	241261	8488	168174	230242	102104
<b>R12A</b>	249253	160160	122122	147167	221229	8488	168172	242248	104108
<b>R13</b>	225235	160160	122126	145159	227227	8888	162168	242250	102104
<b>R13A</b>	249267	158160	122124	149167	229259	8488	164178	242246	102102
<b>R14</b>	237237	160170	122122	147167	221263	8496	172172	228242	104104
<b>R14A</b>	249273	160160	122126	143167	227261	8888	172172	242244	104104
<b>R15</b>	235247	160164	124126	147159	221235	8896	172172	244248	102104
<b>R15A</b>	229249	160160	126126	159167	227227	8496	168172	246248	104104

<b>R16</b>	237239	160164	122122	145167	227237	8896	172178	242248	102104
<b>R16A</b>	237237	160174	122122	163167	229229	8484	168172	242244	104110
<b>R17</b>	237279	160172	122126	145149	255263	8888	172172	234258	102110
<b>R17A</b>	249253	160160	122126	145147	221261	8888	168172	246264	102108
<b>R18</b>	257311	160174	122122	159167	227257	8496	172172	242248	94104
<b>R18A</b>	237273	160174	122124	143163	255261	8896	168170	242242	104110
<b>R19</b>	283295	160160	122126	145147	241261	8488	170170	242244	102104
<b>R19A</b>	237237	160160	122126	145145	227229	8888	172174	242242	102110
<b>R1A</b>	247267	160160	122126	145147	221229	8892	172174	242246	94102
<b>R2</b>	271271	160164	122126	145145	221227	8888	162172	222250	104110
<b>R20</b>	253261	160168	122126	145167	221235	9696	170170	224248	104104
<b>R201</b>	271297	160160	122126	145169	227241	8888	156184	224256	102102
<b>R202</b>	231237	164172	126126	145171	237261	8896	160172	242250	104104
<b>R203</b>	215243	160176	122126	167167	221241	8888	168172	240244	102102
<b>R204</b>	277277	160160	122126	147173	227241	8488	172172	242246	102102
<b>R205</b>	237243	160162	124126	145145	221241	8488	172172	248248	102104
<b>R206</b>	235271	160172	122124	139145	221261	8488	170172	224240	104106
<b>R207</b>	239243	160162	120122	145147	235241	8484	166178	244258	102104
<b>R208</b>	277277	160160	122122	167167	221227	8896	170174	240242	104104
<b>R209</b>	225259	160160	124124	145167	221255	8896	172172	244252	104110
<b>R20A</b>	247253	160160	122126	147167	221261	8488	168168	242248	104108
<b>R21</b>	237277	172172	122126	139173	227229	8496	168172	230242	102104
<b>R210</b>	235317	162172	122124	145145	221255	8896	156170	240256	102104
<b>R211</b>	285285	160160	122122	145145	221261	8888	172172	242242	102110
<b>R212</b>	237251	160172	122122	155159	237237	8496	172174	230230	102104
<b>R213</b>	251269	160172	122122	167175	261261	8896	172174	242242	104104
<b>R214</b>	221297	160160	122122	147155	221255	8488	172174	242242	104104
<b>R215</b>	255267	160160	122122	161167	227241	9696	172176	242246	104104
<b>R216</b>	237239	160160	126126	159167	241261	8488	172174	254254	102104
<b>R217</b>	235273	160160	122126	139147	255261	8896	170170	242256	104104
<b>R218</b>	229269	164166	122122	145165	235241	8496	172174	242248	104104
<b>R219</b>	239243	160160	122122	147167	221221	8896	172172	224224	104108
<b>R21A</b>	237269	158160	122126	147167	221223	9296	172178	242268	94104
<b>R22</b>	253277	160160	122126	161167	221235	8488	174174	230246	104104
<b>R220</b>	221221	160178	122124	145167	227227	8892	174178	228246	102104
<b>R221</b>	237311	160160	122126	145159	261261	8888	174174	242244	104104
<b>R222</b>	239291	160172	122126	145147	227243	8496	170172	224256	102104
<b>R223</b>	223239	160170	124126	159161	227239	8888	172174	242248	102104
<b>R224</b>	237291	158160	122126	145173	233243	8896	162166	246256	102104
<b>R225</b>	237239	160164	122126	139145	243257	8488	172174	224248	104104
<b>R226</b>	239293	160166	122124	145167	221237	8496	170174	248248	104104
<b>R227</b>	253309	160162	122126	145153	227235	8888	160172	238246	104104
<b>R228</b>	237241	164174	122124	159167	235255	8492	162180	240242	102102
<b>R229</b>	237263	160176	122122	157167	221243	8496	166168	244246	102104
<b>R22A</b>	225267	160174	124124	143147	237259	9296	170174	240248	94102
<b>R23</b>	237239	164172	122126	145147	225225	8488	158172	230242	102104

R230	263291	164164	122126	159167	221225	8496	172172	254268	102104
R231	235277	160172	122126	143169	221261	8896	172174	224246	102102
R232	233277	160164	122124	147169	221225	8896	172174	224246	104104
R233	225245	170172	122126	157171	221227	8496	172174	256262	104104
R234	221237	160160	122124	145149	227243	8496	162172	228250	94104
R235	241277	160160	122126	147147	221235	8496	174198	234242	104104
R236	247285	160160	124126	145159	255261	8896	162168	248248	104110
R237	275283	164164	122122	145147	221241	8896	154174	230248	104110
R238	233269	160172	122122	153159	221227	8488	172172	242242	104110
R239	271291	160160	122122	145161	227241	8488	172174	242264	104106
R23A	247253	160160	122122	147159	221237	8888	168172	242264	108110
R24	235245	160160	122124	147167	223235	8896	172174	242242	102106
R240	239251	160164	122126	145147	227227	8488	172172	246254	102102
R241	223235	172176	122126	145145	221223	8888	172174	242248	102104
R242	225283	160164	122126	147167	229263	8488	172178	230242	102104
R243	241279	160170	122126	147169	227241	8888	172172	242246	102110
R244	255293	164166	122124	147171	227227	8484	168170	242260	102104
R245	215229	160160	122122	167169	255261	8488	172196	228242	102104
R246	247271	160164	124126	139167	221221	8896	170172	240254	102104
R24A	249267	160176	124124	143163	247255	8888	170172	242244	104110
R25	237261	160176	124126	145145	221221	8496	170172	224246	94104
R25A	225249	158174	124124	143147	237259	8892	164170	242248	94102
R26	229235	160160	122126	147157	241241	8488	172172	248248	102104
R26A	249253	160160	122122	145147	229261	8492	172172	246248	104104
R27	257257	158164	122126	167171	221237	8896	168172	244262	102104
R27A	241263	162172	122126	147159	241263	8896	170172	246248	104104
R28	237267	172174	122126	145147	221241	8888	170172	234246	104104
R28A	249267	160160	126126	159167	227237	8496	170178	242244	104104
R29	229249	160166	122122	145159	221261	9696	172172	246246	104104
R29A	253267	160170	122124	145165	237241	7288	168174	244264	104108
R2A	247253	160160	122122	145147	221229	8492	168172	242264	104104
R3	249261	160164	122124	139165	237241	8488	172174	246248	102104
R30	265281	160170	122122	149159	227261	8492	172174	242242	102104
R30A	237273	160160	122124	159163	229237	8888	170174	240242	94104
R31	229279	160160	122126	153167	235241	8484	170170	242248	104104
R31A	229237	160162	122126	163165	237263	8496	168172	242248	104104
R32	249255	164174	122126	147159	221221	8496	172172	224248	104104
R32A	237275	160162	122126	159167	227237	8896	172178	242248	104110
R33	225283	164166	122122	145145	239261	8496	172172	248250	102102
R33A	229237	160162	122126	163165	227227	8896	168172	242246	104110
R34	221271	164170	124126	145149	233255	8888	168176	242242	104104
R34A	225249	160174	124126	147159	237259	9296	170174	240248	102104
R35	237243	160160	122124	147153	261267	8896	172174	242242	104104
R35A	249253	160160	122126	145147	229261	8892	168172	246264	102104
R36	229253	164174	122126	145145	237261	8484	170174	246250	104110
R36A	249275	160160	122126	163165	227227	8896	172174	246248	104104

<b>R37</b>	275279	160172	124126	145145	221235	8488	160166	242244	104104
<b>R37A</b>	237247	160160	122122	159167	229261	8484	172174	242246	104110
<b>R38</b>	233283	160164	126126	145165	221227	8896	172194	240246	102104
<b>R38A</b>	257275	158172	122122	145147	221241	8488	168178	242248	104104
<b>R39</b>	279283	160164	122126	147159	221223	9696	172174	244250	104110
<b>R39A</b>	267275	158160	124126	149159	227241	8896	164170	246248	104104
<b>R3A</b>	267299	160160	122122	157159	227261	8888	172178	242264	104104
<b>R4</b>	263263	160160	122122	147147	261261	8888	166168	242246	104104
<b>R40</b>	239257	160164	122122	145151	261261	8896	170178	224248	104110
<b>R40A</b>	229249	160162	126126	165167	227227	8896	172174	242248	104110
<b>R41A</b>	229237	160162	126126	159167	227263	8896	172174	246248	104110
<b>R42</b>	225241	160162	126126	145147	227261	8496	172174	248248	102104
<b>R42A</b>	229249	160160	122122	163167	227261	8488	168172	242242	104110
<b>R43</b>	225267	160164	122126	145153	221245	8488	168170	230242	104104
<b>R43A</b>	237267	160176	122126	145163	227261	8888	172178	242246	104104
<b>R44</b>	241273	160172	122126	153155	227263	8496	172174	248258	102104
<b>R45</b>	231251	160160	122126	145145	247261	8892	172174	242242	102102
<b>R46</b>	237239	170174	122122	149159	221221	8896	172172	244246	94110
<b>R47</b>	237263	160164	122124	145167	261261	8496	172174	246254	104104
<b>R48</b>	229283	160160	122124	147167	239261	8896	172174	224244	104104
<b>R49</b>	243265	160160	122122	145155	221261	8888	172174	242242	102104
<b>R4A</b>	237253	160160	122122	147159	221229	8892	168172	242264	104104
<b>R5</b>	275277	160164	122122	145173	241243	8488	170174	242254	102104
<b>R50</b>	275275	160170	122126	145147	221227	8488	178178	244246	104110
<b>R51</b>	251297	160164	122124	147171	255261	8488	172174	242248	104104
<b>R52</b>	229313	146160	122122	145169	261261	8896	168172	248252	102104
<b>R53</b>	235261	160164	124126	159167	227237	8492	172174	244250	102104
<b>R54</b>	239245	160160	126126	159165	221241	8896	172174	230242	104104
<b>R55</b>	239241	160162	124126	145167	221227	8896	172174	242242	104104
<b>R56</b>	267285	160164	124126	159167	221221	8892	166174	242248	104104
<b>R57</b>	237241	160172	124126	147167	261261	8496	160172	224246	104104
<b>R58</b>	235237	160160	124126	145169	221241	8892	168174	246252	104110
<b>R59</b>	255263	160160	122126	147167	227263	9696	172174	224244	102104
<b>R5A</b>	229267	160160	124126	143165	237263	9696	168172	244246	104104
<b>R6</b>	225239	160164	122122	165167	221221	8896	172178	224242	102110
<b>R60</b>	235275	164164	122122	159165	241261	8888	172172	232250	104104
<b>R61</b>	273275	160160	122126	153159	257263	8896	160172	242258	102104
<b>R62</b>	233269	160174	122126	149159	235259	8488	174174	242248	102104
<b>R63</b>	225235	164168	122122	145145	241241	8896	162172	242258	102110
<b>R64</b>	279281	160164	122122	147159	235241	8488	172174	242248	102104
<b>R65</b>	257301	164166	124126	145145	241261	8896	168170	246246	104104
<b>R66</b>	251275	160160	122122	145151	227227	9296	172172	242242	102104
<b>R67</b>	225257	160164	126126	147157	241261	8484	172172	224246	102104
<b>R68</b>	231281	160164	122122	145159	221221	8896	172174	242248	104104
<b>R69</b>	229237	160162	122124	145145	221261	8496	174178	242246	102104
<b>R6A</b>	237267	164174	122126	145147	221229	8492	168178	242242	94104

<b>R7</b>	237281	160164	122126	167173	261261	8896	172172	242242	102104
<b>R70</b>	241285	160172	126126	147159	221221	8888	172196	242254	104104
<b>R71</b>	237237	166172	122122	145147	227235	8888	168172	258262	104104
<b>R72</b>	245283	160160	122124	145167	221227	8496	170174	240248	104104
<b>R73</b>	243253	160164	124126	155167	227241	8888	162174	242254	102104
<b>R74</b>	229267	160170	122124	145147	237239	8496	176176	224244	104104
<b>R75</b>	227243	162170	122122	147167	225227	8496	160174	242248	104104
<b>R76</b>	239295	158164	122126	159159	227263	8488	170170	230230	104104
<b>R77</b>	241279	160160	126126	147147	227241	8488	172172	242242	104106
<b>R7A</b>	249275	160160	122126	163165	227237	8496	168170	242246	104104
<b>R8</b>	235279	160160	122122	153157	235261	8496	166172	230258	102104
<b>R8A</b>	273299	160160	122122	147181	245261	8488	172172	254264	104108
<b>R9</b>	215237	160178	124126	147167	227259	8496	174176	246248	102104
<b>R9A</b>	237247	160160	122126	163163	227229	8488	172172	242246	102104
<b>R44a</b>	237275	160162	126126	159167	237263	8896	168172	246248	104104
<b>R45a</b>	249249	160174	122126	149163	237259	8892	168174	242246	94104
<b>R46a</b>	229253	160160	122126	145159	243263	8896	170172	248264	104104
<b>R47a</b>	225267	160160	124126	145159	227237	8896	168170	240246	94102
<b>R48a</b>	249253	160160	122122	147167	261261	8892	168172	246264	102108
<b>R49a</b>	237249	160160	126126	147167	259261	8492	164172	242248	102104
<b>R50a</b>	237249	160174	122122	145167	225261	8496	176178	244246	104104
<b>R51a</b>	267267	160174	122126	145149	221229	8892	168174	242246	102104
<b>R52a</b>	247267	160160	122126	159163	227261	8488	172172	242242	104104
<b>R53a</b>	273275	162172	126126	145159	253263	8896	168170	246264	104104
<b>R54a</b>	273275	160162	124126	159165	227227	8896	168170	246248	104104
<b>R55a</b>	253257	160160	122126	145147	221253	8888	168178	242248	104108
<b>R56a</b>	229247	160160	122122	163167	229261	8484	174178	242242	104104
<b>R57a</b>	237267	160160	122126	145145	237243	8892	168174	242248	94104
<b>R58a</b>	249275	160160	122126	159163	227263	8496	172174	242246	104104
<b>R59a</b>	249299	160160	122122	157163	221227	8888	172174	246264	104104
<b>R60a</b>	237249	158174	122126	149167	229259	9296	164178	242246	102104
<b>R61a</b>	247257	158160	122124	145163	225261	8888	168174	242246	104110
<b>R62a</b>	253267	160160	122122	145157	221225	8892	168174	246248	104108
<b>R63a</b>	249267	160160	122122	163163	227229	8488	172172	242246	104110
<b>R64a</b>	237253	160172	122126	145159	229241	8888	168174	242248	104104
<b>R65a</b>	247249	160160	122126	145149	221227	8892	172174	242248	94102
<b>R66a</b>	249267	160176	126126	145149	237241	8892	172174	242246	102102
<b>R67a</b>	225237	160174	122124	143159	229255	8888	168170	240242	94104
<b>R41</b>	235271	160160	122122	145167	221221	8488	168170	242246	102104

**Tabella 7: genotipi dei 188 candidati riproduttori.**

	<b>DLA008</b>	<b>DLA020</b>	<b>DLA248</b>	<b>DLA105</b>	<b>DLA119</b>	<b>DLA228</b>	<b>DLA145</b>	<b>DLA16</b>	<b>DLA244</b>
<b>CR_1</b>	217275	160166	122122	145171	259259	7292	172176	240240	102104
<b>CR_2</b>	271279	160160	122122	171173	221253	7296	174174	238240	94104
<b>CR_3</b>	237293	160164	122124	145145	253259	8484	164182	240244	104106
<b>CR_4</b>	235293	160160	122126	159173	235253	7284	164172	240268	102104
<b>CR_5</b>	223235	160160	122124	145145	235253	8496	164172	240240	102102
<b>CR_6</b>	235251	160174	122126	163171	227251	9696	174182	246268	102106
<b>CR_7</b>	217245	160172	124126	145147	221223	7292	168172	240240	102102
<b>CR_8</b>	237257	160172	122126	147171	229259	9296	162190	238246	102104
<b>CR_9</b>	277279	160176	122124	147163	227257	8892	172174	240240	102104
<b>CR_10</b>	233257	160174	124126	163171	227251	8496	174174	240246	102106
<b>CR_11</b>	251279	166172	124126	159159	251259	8496	174174	268270	104106
<b>CR_12</b>	273275	160164	122126	147167	253257	8888	164174	230268	102104
<b>CR_13</b>	271277	160160	122124	145171	235253	8484	172190	240270	102104
<b>CR_14</b>	217235	160160	122122	145145	253259	9296	172174	240252	104104
<b>CR_15</b>	257257	160172	124126	145153	227259	8496	170190	238246	104106
<b>CR_16</b>	271279	160160	122126	159173	235253	8484	174174	240270	104104
<b>CR_17</b>	235293	160160	122126	145145	221259	8496	158164	240268	94102
<b>CR_18</b>	257259	160160	124126	145159	251253	8892	172190	238242	102104
<b>CR_19</b>	237293	160160	124124	145171	259259	7296	164182	238240	102104
<b>CR_20</b>	251275	160172	122124	159171	221227	8492	174174	252270	102104
<b>CR_21</b>	237293	160160	122124	145171	259259	8496	170182	238240	104106
<b>CR_22</b>	275293	160160	122126	145171	253259	0	164190	238242	102104
<b>CR_23</b>	279293	160160	122124	145159	221221	8496	172172	240270	102104
<b>CR_24</b>	223279	160160	124126	145159	221259	9296	172172	244270	94104
<b>CR_25</b>	233235	166172	122122	159163	253259	8496	174174	268270	104104
<b>CR_26</b>	259275	158160	126126	145147	221235	8896	164190	244252	104104
<b>CR_27</b>	233235	160172	122126	145153	251259	8484	164170	246268	104106
<b>CR_28</b>	247293	164176	122124	145173	253259	8484	172172	240272	94104
<b>CR_29</b>	237293	160164	124124	145145	259259	7284	170182	238240	102102
<b>CR_30</b>	235275	158160	122126	159173	241251	9296	174196	238242	104104
<b>CR_31</b>	237293	160160	122124	145145	259259	8496	170182	240244	104106
<b>CR_32</b>	251275	160174	122126	159171	221227	8492	174182	246254	102104
<b>CR_33</b>	237257	160160	122124	145171	235259	8484	172182	240270	102104
<b>CR_34</b>	247251	160172	122124	159163	253259	7284	168182	240270	102106
<b>CR_35</b>	217277	158160	122126	145159	241259	9296	174196	240270	104104
<b>CR_36</b>	251279	160160	122124	147147	253257	8888	168174	240246	102104
<b>CR_37</b>	235271	160160	122126	143159	235259	7296	174174	240240	96104
<b>CR_38</b>	217257	160160	122122	145159	253259	8492	172174	240252	102104
<b>CR_39</b>	227233	160172	122122	159171	221259	8492	174174	246254	102104
<b>CR_40</b>	263279	160160	122124	145147	227245	8896	168176	228240	104104
<b>CR_41</b>	235275	160160	122124	145159	235253	8488	164190	230238	102104
<b>CR_42</b>	273275	160176	124126	147167	253257	8888	164164	228268	102104

CR_44	233275	160172	122124	147163	227257	8492	174174	252270	102104
CR_45	257257	160160	122124	145153	259259	8484	166190	238246	104106
CR_46	277293	160160	122124	145159	235253	8496	174174	238240	102104
CR_47	233257	160172	122122	153171	227251	9696	170174	240246	102104
CR_48	0	160160	122126	171173	241259	8496	172174	240258	104104
CR_49	233235	166172	122122	159171	253259	8496	174174	246268	104106
CR_50	233235	160172	122126	159163	251259	8496	172182	240270	104106
CR_51	237293	160160	122124	145171	235253	7296	170174	238240	104106
CR_52	271279	160172	122126	143171	235253	7296	172172	238240	94104
CR_54	275293	160172	124126	145147	221235	9696	164172	240252	104106
CR_56	259293	160160	122126	145145	227253	8896	172172	238242	94102
CR_57	247251	160172	122122	153159	253259	8488	174176	238270	94106
CR_58	223279	160160	122126	145171	221253	9696	158174	240270	94102
CR_61	257293	160172	122122	145145	221251	8492	164174	240268	104106
CR_62	257257	160172	126126	145153	227259	8492	164166	246268	94106
CR_63	223257	160172	122124	145171	235251	8496	164172	238240	102102
CR_64	233279	160174	124126	159171	227253	8496	172182	238246	94106
CR_65	235251	160172	122124	159159	251259	8492	182190	238246	104106
CR_66	233235	160172	122126	145153	259259	9296	166174	246270	94106
CR_67	277293	160172	122124	145171	221253	9696	174174	238240	94106
CR_70	263283	160164	110124	145155	221225	9696	168182	228254	102102
CR_71	251257	160174	122122	159159	227251	8496	172182	240246	104106
CR_72	233235	160174	124126	159159	227251	8496	174174	240246	104106
CR_73	271277	160160	122124	145145	221253	8496	172172	240270	102104
CR_74	233235	160174	124126	159163	227253	8496	164182	240270	104104
CR_75	251279	160174	122122	163171	227253	8492	174174	246268	104106
CR_76	269273	160164	122124	147167	253257	8488	164164	228268	102104
CR_78	235293	160160	122122	145145	227259	8496	170196	240240	104104
CR_79	251275	160174	122124	147159	221259	8492	174174	246254	102106
CR_80	237247	160164	122124	145153	227235	7272	168180	240240	102106
CR_81	237275	158160	126126	145145	253259	8892	148172	240244	102104
CR_82	223277	160160	122126	145159	235259	9696	174174	238240	102104
CR_83	223237	0	0	0	253259		164182	0	102106
CR_84	223277	160160	124126	145171	229253	9696	174174	244270	94104
CR_85	215279	160160	122122	147147	253257	8492	172174	240246	94104
CR_86	257293	160172	122126	143145	235253	8496	172174	240240	104106
CR_87	223277	160160	124124	145171	253259	8496	172174	240270	104106
CR_88	237257	160172	124126	145171	253259	8492	172190	238240	104104
CR_89	257277	160160	126126	159159	227253	8492	170174	246268	94106
CR_90	233235	166174	124126	159171	253259	8496	174182	268270	104106
CR_91	237237	160160	122122	159163	227253	8888	168174	228238	102104
CR_92	251275	166174	124124	163171	221227	7284	164182	244270	102104
CR_93	235293	160160	122126	159173	235259	8496	172174	240268	102104
CR_94	0	160160	124126	145145	229253	9296	0	228240	104104
CR_95	235251	160172	122122	163171	227251	8492	164182	240270	104104
CR_96	251279	160176	122124	147163	253257	8892	168174	240246	94094

CR_97	223235	160164	122124	145171	235253	7296	170182	238240	102106
CR_98	257293	160160	122122	159173	235251	7292	164174	238240	94104
CR_99	235237	160172	124126	147159	229251	8496	164172	238246	102104
CR_100	235237	160172	124126	147159	229251	9292	164172	238240	94104
CR_101	247251	164174	122122	153159	227259	8488	168174	240270	102106
CR_102	235239	160160	122124	145167	227235	8896	166172	228240	94104
CR_103	251279	160174	124126	159163	253259	8496	172174	238270	94106
CR_104	251263	160160	122126	157167	227235	8888	174176	230240	104104
CR_105	223277	160172	124126	145159	235253	8496	172174	240270	94106
CR_106	235237	160160	122124	145159	229259	9296	164172	240246	104104
CR_107	235293	160172	122126	143145	221253	8496	172174	240240	104106
CR_108	251279	160172	122122	159171	227253	8492	164182	246270	104104
CR_109	235271	160160	122126	145173	235253	8484	174174	240240	102104
CR_110	237257	160160	122122	159173	251253	9296	164172	238240	94102
CR_111	277293	160164	122126	145171	221253	8496	172172	240270	102104
CR_112	237277	160160	122124	145171	259259	8496	174174	240270	94106
CR_113	251257	160174	122122	159159	227251	8496	174182	240270	102104
CR_114	0	160172	122122	145145	0	9696	174190	0	104106
CR_115	0	160164	124124	145171	0	8496	170174	238240	102104
CR_116	227269	160160	124126	145167	241259	8888	164164	230268	102104
CR_117	223237	160160	120120	145159	241259	7284	158164	0	102102
CR_118	251257	160174	124124	159171	227251	8484	164182	238270	102104
CR_119	223293	160160	122124	145145	235259	8484	170182	240244	102102
CR_120	215279	160160	122122	145147	227257	8888	148172	240240	102104
CR_121	237279	160160	124126	145159	253259	9296	172172	240246	102102
CR_122	257293	160172	122122	145171	221253	9696	172190	240270	102104
CR_123	233277	160174	122124	159159	259259	8484	172174	238246	104104
CR_124	223257	160172	124126	145145	221253	8496	172174	240240	102106
CR_125	233237	164172	122124	163163	227227	8488	176182	238246	94104
CR_126	233247	164174	122124	153163	227227	7284	174176	238246	102104
CR_127	223293	160160	122124	145145	235259	8484	170182	240244	102102
CR_128	233235	160172	122126	163171	251259	8496	174174	240270	102106
CR_129	257275	158160	122126	159173	251259	9296	172174	240270	104104
CR_130	223279	160164	122122	145159	241253	9696	158172	238240	94102
CR_131	0	0	122126	0	0	8492	166174	0	94106
CR_132	263279	160160	122126	157167	253253	8896	164168	240240	94102
CR_133	263279	160160	122126	157163	253253	8896	164168	230240	94104
CR_134	217237	160160	122124	153173	241253	8896	172176	240242	94104
CR_135	251279	160172	122124	159171	251259	8492	174182	268270	104106
CR_136	223277	160160	122124	145145	235253	9696	172172	238240	102104
CR_137	233277	160172	122124	159163	227259	8484	172174	268270	102106
CR_138	235275	164166	124124	147171	227235	8488	170174	268272	102104
CR_139	237257	160160	124126	145145	229259	8492	172190	238240	102104
CR_140	249263	160164	124124	145155	221239	9696	168182	228240	102104
CR_141	237239	160164	124124	145171	259259	7296	164174	240240	102104
CR_142	237257	160164	122126	145159	251259	8496	172174	240240	102104

CR_143	223277	160160	122124	145171	235253	9696	172174	240270	94102
CR_144	257293	160160	122126	145159	221259	9696	172172	240240	102104
CR_145	233235	160174	122124	163171	227251	8496	172182	268270	102106
CR_146	235259	160160	122126	145159	235253	8896	172174	240242	104104
CR_147	233257	160172	122122	159159	251259	8484	164182	238270	102104
CR_148	235259	158160	122124	145145	253259	8488	172190	240244	102102
CR_149	223277	160160	124126	145171	235253	8496	172174	238240	94106
CR_150	235257	160160	122126	153171	227259	8496	166172	240246	104106
CR_151	223235	160164	122124	145145	253259	7284	170174	238240	102102
CR_152	247277	160160	124126	145171	229259	8492	172190	246270	104104
CR_153	237275	160172	124124	145171	221253	7296	162164	240240	102104
CR_154	235275	158160	122126	145171	241253	8496	164196	238240	104104
CR_155	235263	160160	122124	145167	235259	8488	168172	228240	104104
CR_156	223235	160160	124124	145171	253259	8484	170182	240244	102106
CR_157	217247	158160	124124	147147	229253	8896	168172	230268	102102
CR_158	223279	160172	122126	145159	235253	9696	172174	238240	94106
CR_159	223247	160160	122124	167171	221257	9296	172176	240244	102104
CR_160	277293	160164	122122	145159	221253	8496	158174	238240	102104
CR_161	223235	160160	122124	145145	253259	7284	170174	240244	102102
CR_162	277293	160172	122122	145159	221253	9696	172174	238240	94106
CR_163	237279	160164	124126	145159	235259	7296	174174	240270	94106
CR_164	251257	160172	124124	159159	227251	8484	164182	240246	102104
CR_165	227251	160172	122122	147163	227257	8492	174174	246252	102106
CR_166	227233	160172	122126	147163	257259	8496	164174	252270	102106
CR_167	251257	160172	122124	145159	253259	8496	164182	246268	104104
CR_168	223293	160164	120120	145145	259259	7284	170182	238240	102102
CR_169	223237	160164	122124	145163	253259	7288	174176	238240	94102
CR_170	233279	160174	124126	159163	227253	8484	172182	240246	102106
CR_171	223279	160160	122124	145159	241253	8496	174174	240240	102104
CR_172	0	0	0	0	0	0	0	240246	0
CR_173	265279	160160	122122	147157	227253	8896	164172	228240	94104
CR_174	233257	160160	122122	145159	227259	8484	166174	246268	104106
CR_175	279293	160164	122122	145171	221259	9696	172174	240270	94102
CR_176	235293	160160	122122	145159	221259	9696	158172	240240	102102
CR_177	275293	160160	122124	145171	253259	8896	162170	244252	104104
CR_178	247257	160160	122126	145159	253259	8492	172190	238240	102102
CR_179	223277	160164	122126	145171	241253	7284	158172	238240	102104
CR_180	223277	160164	122126	145171	241253	8496	158172	238240	102104
CR_181	257293	160160	122126	145159	221253	7296	158174	240240	102104
CR_182	217235	160160	124126	145171	229253	8892	174174	240240	94104
CR_183	217259	160164	124124	167167	221253	8896	172174	244268	102104
CR_184	233237	164172	122124	159163	253259	7284	168182	240270	102106
CR_185	235237	160160	122124	145145	235253	7284	170174	240244	102106
CR_186	233257	160172	122122	159159	227251	8492	164182	238246	104106
CR_187	251279	166172	122122	159163	227251	8496	164182	246268	104106
CR_188	257275	158160	122122	145171	241251	9696	172172	240242	104104

<b>CR_189</b>	233257	160160	122126	159171	227251	9696	166174	240246	102106
<b>CR_190</b>	251257	160172	122122	159159	227259	8484	182190	238270	102106
<b>CR_192</b>	257277	160160	122122	145159	253259	8484	166172	238246	104106
<b>CR_193</b>	235275	160160	122122	145171	241253	8496	164172	238242	102104
<b>CR_194</b>	251257	160172	122124	159159	227259	8492	164182	238270	102106
<b>CR_195</b>	235247	160172	122126	145171	229259	9292	164166	240246	104104
<b>CR_196</b>	217293	160160	122124	145145	253259	9696	170172	238240	104104
<b>CR_197</b>	235237	160160	122124	145171	235253	8496	170182	238240	102104

---

## *Ringraziamenti*

Ai miei genitori per avermi sostenuto nei momenti di difficoltà e appoggiato nelle scelte.

A Tiziana e Giulia per avermi sopportato e so quanto è stato difficile.

Ai nonni per essere stati sempre presenti e partecipi alle mie attività.

A zii, cugini e parenti tutti.

Agli amici e compagni di corso per i bei momenti passati assieme e per le risate.

Al professore Luca Bargelloni per avermi dato questa possibilità.

A Massimiliano e Raffaella per l'aiuto, la disponibilità e la pazienza nei giorni passati in laboratorio.

Al personale di Cà Zuliani: Roberto e Silvia per l'opportunità lavorativa datami e per la simpatia dimostrata, e ai dipendenti tutti per le risate all'interno dell'impianto.

A Shilla e Oscar per il loro incondizionato affetto.