

I GEORGOFILI

Quaderni
2015-V



INNOVAGEN

I RISULTATI DEL PROGETTO INNOVAGEN

Ricerca e INNOVAzione nelle attività di miglioramento
GENetico animale mediante tecniche di genetica molecolare
per la competitività del sistema zootecnico nazionale

Firenze, 15-16 giugno 2015

ℙ

EDIZIONI POLISTAMPA

Finanziato dal MiPAAF (DM 7303/2011)

Copyright © 2017
Accademia dei Georgofili
Firenze
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti della Accademia dei Georgofili»
Anno 2015 - Serie VIII - Vol. 12 (191° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Edizioni Polistampa
Via Livorno, 8/32 - 50142 Firenze
Tel. 055 737871 (15 linee)
info@polistampa.com - www.polistampa.com
Sede legale: Via Santa Maria, 27/r - 50125 Firenze

ISBN 978-88-596-1710-5

Servizi redazionali, grafica e impaginazione
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

Indice

Introduzione	5
Utilizzazione della genomica per il miglioramento della selezione nei suini pesanti italiani	11
Unità Carne Bovina e Altre Specie	25
Latte Bovino	39
Variabilità di geni candidati per il miglioramento quali-quantitativo del latte bufalino e individuazione di marcatori associati a differenze nella loro espressione	61
Ricerca e impiego di associazioni tra loci SNP e caratteri quantitativi e qualitativi della produzione di latte negli ovini e nei caprini	85
Applicazione di tecniche di genomica strutturale e funzionale per la tipizzazione e selezione del cavallo	95
Studio sulla biodisponibilità di peptidi con effetti sulla salute umana	131
Aspetti genetici della suscettibilità ad alcune malattie nei bovini	143
La rintracciabilità quale strumento per la salvaguardia delle produzioni animali di qualità e per la sostenibilità del sistema zootecnico italiano	161
Studio e implementazione di sistemi su base bio-molecolare per il controllo delle dinamiche di diffusione di agenti patogeni potenzialmente presenti nelle popolazioni animali a tutela della salute umana, della sicurezza alimentare e a difesa del patrimonio zootecnico	179

Genomica e cromatina nel determinismo del livello di fertilità dei tori	185
Sviluppo e validazione di modelli per l'applicazione di schemi di selezione assistita da marcatori e selezione genomica alle specie di interesse zootecnico	197
Formazione e aggiornamento dell'organizzazione degli allevatori in relazione agli strumenti di genetica molecolare nella selezione zootecnica	213
Gestione rapporti con le ANA	219
Pubblicazioni su riviste internazionali	225
Congressi	231

Introduzione

Il progetto Innovagen, finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali con DM 7303/2011, è composto da 14 Unità operative facenti capo a Università, Enti di Ricerca e Associazioni allevatori. In molti casi una UO include ulteriori Università e Centri di ricerca per specifici aspetti scientifici.

Nello schema seguente è riportato il dettaglio delle UO e dei loro compiti:

UNIBO – Utilizzazione della genomica per il miglioramento della selezione nei suini pesanti italiani

UNITUS – Carne bovina e altre specie

UNICATT – Latte Bovino

UNINA – Variabilità di geni candidati per il miglioramento quali-quantitativo del latte bufalino e individuazione di marcatori associati a differenze nella loro espressione

UNIMOL – Ricerca e impiego di associazioni tra loci SNP e caratteri quantitativi e qualitativi della produzione di latte negli ovini e nei caprini

UNIPG – Applicazione di tecniche di genomica strutturale e funzionale per la tipizzazione e selezione del cavallo

UNITUS – Studio sulla biodisponibilità di peptidi con effetti sulla salute umana

PTP – Aspetti genetici della suscettibilità ad alcune malattie nei bovini

CONSDABI – La rintracciabilità quale strumento per la salvaguardia delle produzioni animali di qualità e per la sostenibilità del sistema zootecnico italiano

IZS VEN – Studio e implementazione di sistemi su base bio-molecolare per il controllo delle dinamiche di diffusione di agenti patogeni potenzial-

mente presenti nelle popolazioni animali a tutela della salute umana, della sicurezza alimentare e a difesa del patrimonio zootecnico

ISILS – Genomica e cromatina nel determinismo del livello di fertilità dei tori

UNISS – Sviluppo e validazione di modelli per l'applicazione di schemi di selezione assistita da marcatori e selezione genomica alle specie di interesse zootecnico

UNIMI – Formazione e aggiornamento dell'organizzazione degli allevatori in relazione agli strumenti di genetica molecolare nella selezione zootecnica

CRSA – Gestione rapporti con le ANA

Innovagen nasce allo scopo di cogliere gli aspetti più avanzati della “rivoluzione molecolare” a cui stiamo assistendo da circa 15 anni, svilupparli nello specifico del sistema zootecnico italiano, e portarli al trasferimento negli schemi di selezione delle Associazioni di Allevatori.

La filosofia di lavoro delle UO è stata quella di formare un consistente gruppo di giovani ricercatori, recepire le tecnologie più avanzate al momento, migliorarle e adattarle alle popolazioni zootecniche e ai tipi di prodotti italiani, mettere a disposizione delle ANA genotipi, metodiche, banche dati in modo semplice ed efficace per competere a livello internazionale.

Più di cento giovani ricercatori sono stati assunti nel progetto, formandosi e contribuendo fattivamente con le loro idee e competenze.

Innovagen ha assimilato tutti gli sviluppi della corrente tecnologia genomica:

- Diagnostica SNP
- SNP chip
- Sequenziamento esomi
- Sequenziamento intero genoma
- Proteomica
- Metabolomica
- Metagenomica

Innovagen ha anche sviluppato metodi statistici innovativi per la selezione genomica e per lo scan dei genomi al fine di evidenziare regioni influenzanti il fenotipo. Sono stati ideati nuovi metodi di tracciabilità dei prodotti e dei processi, tecnologie di diagnostica batterica per la sicurezza alimentare, metodologie per il test del seme ecc.

Numerosi ricercatori stranieri sono stati ospitati e hanno beneficiato

dell'ambiente di lavoro creato nell'ambito del progetto, accrescendo il prestigio scientifico nazionale e creando legami per future collaborazioni. Di contro, numerosi ricercatori impiegati in Innovagen hanno potuto usufruire di ospitalità presso prestigiosi Centri di Ricerca all'estero per imparare tecniche poi utilizzate nel nostro progetto.

Innovagen, oltre la specifica formazione coordinata in una delle UO e specificatamente rivolta ai tecnici delle ANA, ha curato la formazione dei giovani ricercatori con stage all'estero e presso altre Università italiane e ha anche organizzato due "winter school" della durata di una settimana ciascuna che prevedevano una full immersion nelle tematiche genomiche, con lezioni teoriche e pratiche. I docenti sono stati i maggiori scienziati a livello mondiale del settore.

Sono state prodotte a oggi più di 100 pubblicazioni su riviste internazionali con impatto. Numerose altre pubblicazioni sono in fase di accettazione e altre ancora in fase di elaborazione e/o scrittura. I risultati e le metodologie sviluppati in Innovagen sono stati presentati a numerosi Congressi internazionali e nazionali. In questi ultimi i contributi legati a Innovagen hanno rappresentato spesso la maggior parte delle comunicazioni della sezione "Genetica". Sono infine stati depositati brevetti su aspetti tecnologicamente innovativi.

Particolare cura è stata posta nella disseminazione dei risultati a un pubblico più vasto rispetto a quello della ricerca. Sono state prodotte 12 schede tecniche di otto facciate l'una pubblicate sulla rivista L'Allevatore Magazine. Si tratta di una rivista quindicinale che trova un'ampia diffusione presso gli allevatori di tutte le specie e razze e che ha avuto nel periodo considerato una tiratura media di circa 39.000 copie. I ricercatori dell'UO "Formazione" hanno realizzato una *docufiction* dal titolo "Identità nascoste" per parlare di genetica molecolare sotto forma di film giallo e quindi in forma accessibile al grande pubblico. Attenzione è stata anche data al pubblico partecipante alle fiere zootecniche a livello nazionale, in particolare nel 2012 è stata messa in opera una attività di illustrazione pratica e quasi ludica del concreto significato di indice genomico.

Numerosi sono i consorzi internazionali di prestigio ai quali i ricercatori Innovagen hanno contribuito:

- International Goat Genome Consortium - per lo sviluppo di uno SNP chip sui caprini
- International Sheep Consortium - per lo sviluppo di uno SNP chip sugli ovini
- International Buffalo Consortium - per il sequenziamento dell'intero genoma del bufalo

Nell'ambito di Innovagen è anche stato costituito l'Italian Goat Consortium (www.goatit.eu)

I lavori conclusivi del progetto Innovagen sono stati presentati infine in un convegno organizzato presso l'Accademia dei Georgofili, che ha anche curato la pubblicazione nella sua collana.

Il responsabile scientifico
prof. Alessio Valentini

Utilizzazione della genomica per il miglioramento della selezione nei suini pesanti italiani

Responsabile Scientifico:

Luca Fontanesi, *Università di Bologna*

OBIETTIVI DEL PROGETTO

In breve, gli obiettivi del progetto sono stati i seguenti: i) definire nuovi fenotipi e parametri utilizzabili per il miglioramento genetico nel suino pesante; ii) confermare regioni cromosomiche/geni già identificati nel progetto Selmol come associati a caratteri riproduttivi, produttivi e di qualità della carne nel suino pesante; iii) identificare altre regioni cromosomiche associate ai nuovi fenotipi analizzati oltre che ai comuni caratteri utilizzati nei piani di selezione attuali; iv) verificare le possibilità di integrare i piani di selezione attualmente utilizzati nel suino pesante con nuovi approcci di selezione genomica.

ATTIVITÀ SVOLTA

WP1: Campionamento e fenomica

Task 1.1 – Campionamento

L'attività di campionamento prevista nel WP1 è stata completata con la raccolta di materiale biologico da un totale di 934 suini di razza Large White Italiana. I campioni, rappresentati da sangue e muscolo *semimembranosus*, sono stati raccolti al macello durante 26 diversi giorni di macellazione da animali sottoposti a performance test dall'ANAS. I campioni di sangue sono stati processati per ottenere aliquote di plasma e siero, successivamente congelate a -80° C. Aliquote di sangue intero utilizzabili per l'estrazione del DNA sono state stoccate a -20°C.

Task 1.2 – Analisi di fenotipi

a) *Metabolomica*. Campioni di siero e plasma sono stati utilizzati per la messa a punto del sistema di analisi di metaboliti. L'analisi è stata effettuata utilizzando uno spettrometro di massa Api Q-Trap 4000 e un kit sviluppato per la determinazione di metaboliti nell'uomo. L'ottimizzazione è stata condotta valutando i valori di diversi metaboliti sia su siero che su plasma di suino. Successivamente, sulla base della maggiore sensibilità su plasma e possibilità di standardizzare meglio la preparazione dei campioni, si è optato per condurre le analisi di routine utilizzando questa matrice sulla quale sono stati analizzati 186 metaboliti, tra cui 40 acilcarnitine, 90 glicerofosfolipidi, 21 aminoacidi, 19 amine, 15 sfingolipidi e 1 zucchero. L'analisi è stata effettuata su tutti i campioni raccolti da suini di razza Large White Italiana.

Oltre a queste analisi è stato condotto uno studio pilota per valutare eventuali differenze di metaboliti in plasma e siero (con la stessa piattaforma di analisi) di suini di due razze diverse (Large White Italiana e Duroc Italiana) valutate nei due sessi (maschi castrati e femmine intere) e campionati nella stessa macellazione (6 campioni di plasma per sesso e razza e 6 campioni di siero per sesso e per razza per un totale di 48 campioni). I dati sono stati analizzati utilizzando Partial Least Square Regression (PLS-R) e Sparse-PLS-discriminant analysis (sPLS-DA). Con questi approcci è stato possibile separare i campioni dei diversi sessi e delle diverse razze soprattutto su plasma. Pochi metaboliti sembrerebbero i maggiori responsabili delle differenze ottenute nell'analisi sPLS-DA tra le due razze. Tra questi possiamo indicare kynurenina e alcune phosphatidilcholine. Sono state effettuate altre analisi per validare ulteriormente i dati ottenuti, sia su siero che su plasma, utilizzando la piattaforma NMR (Abstract 1). Il confronto dei risultati ottenuti nelle due razze è stato oggetto di una pubblicazione appena inviata a una rivista scientifica (Pubblicazione in corso di valutazione n. 1).

Inoltre, utilizzando solo dati metabolomici è stato effettuato il confronto del profilo nei due sessi dei suini di razza Large White Italiana. Circa 80 metaboliti sono risultati quelli contribuire in modo rilevante alla differenziazione tra i due sessi (maschi castrati e femmine intere) (Pubblicazione in corso di valutazione n. 2).

Oltre a parametri metabolomici sono stati ottenuti anche altri 30 parametri ematologici sugli stessi suini.

b) *Attività di enzimi muscolari coinvolti nel metabolismo lipidico*. Dal campione di circa 950 suini di razza Large White Italiana sono stati identificati i soggetti con valori estremi di grasso intramuscolare (GIM) nel muscolo *Semimembranosus* (analisi con metodo Soxhlet su 50 g di muscolo): 78 con

elevato valore ($>3.5\%$) e 77 con basso valore ($<1.0\%$). Su questi soggetti è stata valutata la quantità delle proteine di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo lipolitico del muscolo (FASN, LIPE, LPL e SCD) mediante test ELISA. LIPE è stato l'unico enzima a presentare una differenza significativa tra i due gruppi ($P<0.05$). SCD ha presentato una tendenza ($P<0.10$). Inoltre, su un sottocampione di 47 animali (suddivisa per circa una metà nei due gruppi estremi precedenti, rispettivamente 22 e 25 animali) è stata valutata l'espressione genica muscolare degli stessi geni. I geni *FASN* e *LPL* hanno presentato una differenza significativa dell'espressione genica tra i due gruppi ($P<0.05$) con un livello di espressione più elevato nei soggetti ad alto GIM. L'espressione genica non è risultata correlata con la quantità del rispettivo enzima. L'espressione del gene LIPE è risultata correlata positivamente con le proteine SCD e LPL.

Per tutti gli animali campionati sono stati ottenuti, grazie alla collaborazione con l'ANAS, gli indici genetici (EBV) per lo spessore del lardo dorsale, l'incremento ponderale giornaliero, il peso dei tagli magri, il peso delle cosce e l'indice di conversione degli alimenti. Alla macellazione è stato inoltre registrato il numero di mammelle e il peso di diversi tagli e parti (pancetta, guancia, lardo e testa).

Task 1.3 – Analisi statistiche

I dati ottenuti sui metaboliti analizzati nei suini di razza Large White Italiana sono stati utilizzati per calcolare le correlazioni tra i vari metaboliti e tra i metaboliti e i caratteri produttivi (indici genetici e peso di diversi tagli) e l'ereditabilità di tutti i parametri metabolomici ed ematologici dopo normalizzazione (Abstract 2; Abstract 11; Abstract 14). I dati metabolomici sono stati utilizzati in un approccio di Systems Biology mediante la costruzione di Gaussian Graphical Models (GGM) che permettono di identificare correlazioni tra coppie di metaboliti utili per ricostruire pathway metaboliche. L'analisi di GGM ha permesso di identificare relazioni tra metaboliti inaspettate, suggerendo che pathway o interazioni nuove (Abstract n. 11 e Abstract n. 12).

WP2: Analisi di associazione

Task 2.1 – Analisi di marcatori in geni candidati

Diversi SNP in geni candidati sono stati analizzati in questo progetto. Alcuni di questi sono già stati analizzati nell'ambito del progetto Selmol e qui sono

stati studiati per confermare i risultati precedentemente ottenuti o sono stati studiati ex novo. Gli animali utilizzati nell'analisi di associazione sono stati suini di razza Large White Italiana estremi per gli EBV di diversi caratteri (spessore del lardo dorsale, $n = 560$; incremento ponderale giornaliero, $n = 380$; peso dei tagli magri, $n = 100$), 1536 scrofe di razza Large White Italiana con dati riproduttivi, suini di razza Duroc Italiana estremi per gli EBV del grasso intermuscolare visibile ($n = 100$) e suini di razza Landrace Italiana estremi per l'incremento ponderale giornaliero ($n = 200$), una popolazione random di suini di razza Large White Italiana ($n = 270$) per la quale erano disponibili diversi parametri di qualità della carne oltre che ai caratteri misurate nel performance test ANAS. Oltre che a questi animali i cui dati e campioni erano già a disposizione lo studio di associazione è stato effettuato anche sui suini di razza Large White Italiana collezionati come descritto nel Task 1.1. L'utilizzo di suini già a disposizione ha permesso di anticipare alcune attività e ottenere risultati anche nel primo anno in cui la fase di campionamento di nuovi animali non era stata ancora completata.

a) Circa 700 SNP in geni candidati: più di 700 SNP in geni candidati sono stati analizzati mediante il sistema Golden Gate sui 560 suino estremi per l'EBV spessore del lardo dorsale. Gli SNP sono stati selezionati dalla letteratura, mediante risequenziamento di geni candidati, mediante identificazione in silico. Dopo correzione per multiple testing, circa 30 SNP in diversi geni, tra cui IGF2, MC4R, TBC1D1 sono risultati associati con il carattere spessore del lardo dorsale (Pubblicazione 1).

b) *LDHA*: L'analisi di un SNP nel gene *LDHA*, già analizzato precedentemente nel progetto Selmol, ha permesso di confermare l'associazione di questo marcatore con l'incremento ponderale giornaliero in suini di razza Large White Italiana (Pubblicazione n. 1). Alcune centinaia di SNP in geni candidati, identificati precedentemente, sono stati genotipizzati utilizzando la piattaforma GoldenGate (Illumina) su circa 560 suini estremi per l'EBV spessore del lardo dorsale. Circa 50 SNP sono risultati significativamente associati con il carattere studiato. Pathway analysis ha permesso di identificare possibili interconnessioni/relazioni tra i geni con SNP significativamente associati (Pubblicazione n. 2).

c) *MUC4*: Il polimorfismo g.8227C>G nel gene *MUC4*, associato con la resistenza alla diarrea determinata dall'*E. coli* K88, è stato genotipizzato su suini di razza Large White Italiana estremi per gli EBV per l'incremento ponderale giornaliero e per lo spessore del lardo dorsale, in suini di razza Duroc Italiana estremi per l'EBV per il grasso intermuscolare visibile e in suini di razza Landrace Italiana estremi per l'EBV incremento ponderale giornaliero.

ro. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'allele sensibile al ceppo di *E. coli* K88 è anche l'allele che è associato a un maggior accrescimento post-svezzamento sia nei suini di razza Large White Italiana che nei suini di razza Landrace Italiana (Pubblicazione n. 3).

d) *FTO*: In questo progetto, il gene *FTO*, per il quale un SNP studiato precedentemente è risultato associato al deposito di grasso in suini di razza Duroc Italiana e in ibridi commerciali, è stato sequenziato in diversi suini di varie razze per identificare ulteriori SNP e valutare i pattern di variabilità entro e tra razze suine. L'analisi degli aplotipi dedotti sulla base dei dati di sequenziamento ha confermato l'effetto del gene *FTO* sul deposito di grasso in diverse razze (Pubblicazione n. 4).

e) *PCSK1*: Il gene *PCSK1* è stato sequenziato in diversi suini di diverse razze. Tre SNP sono stati genotipizzati sugli stessi animali descritti per le analisi di associazione per il gene *MUC4*, oltre che su 270 suini di razza Large White Italiana e 220 suini di razza Duroc Italiana considerati come campioni random, e su 90 ibridi commerciali. Le elaborazioni statistiche hanno indicato che marcatori in questo gene sono associati a diversi caratteri produttivi (spessore del lardo dorsale, incremento ponderale giornaliero, peso dei tagli magri, indice di conversione degli alimenti, peso delle cosce) sia utilizzando gli EBV che utilizzando i random residuals, ma con effetti opposti per quanto riguarda le due razze considerate. Il gene è stato mappato sul cromosoma 2 utilizzando il radiation hybrid panel dell'INRA, in quanto non incluso nella versione Sscrofa10.2 del genoma di suino (Pubblicazione n. 5).

f) *MC4R*: Il gene *MC4R* è stato studiato analizzando 6 SNP che hanno permesso di identificare 4 aplotipi. Uno di questi è stato identificato per la prima volta nei suini di razza Large White Italiana. Lo studio di associazione è stato effettuato con gli SNP singoli e con gli aplotipi su i 560 suini con valori estremi per l'EBV spessore del lardo dorsale. I risultati ottenuti hanno permesso di confermare l'associazione di marcatori in questo gene con lo spessore del lardo dorsale, l'accrescimento medio giornaliero e l'indice di conversione degli alimenti (Pubblicazione n. 6).

g) *TBC1D1*: Tra i diversi geni candidati in corso di analisi, il gene *TBC1D1* è risultato uno dei più interessanti (vedi pubblicazione 1) perché associato con lo spessore del lardo dorsale e altre caratteristiche produttive. Questo gene è stato oggetto di una review (Pubblicazione n. 7).

h) Altri geni risequenziati con Ion Torrent: Diversi altri geni candidati sono stati studiati. La ricerca di SNP è stata effettuata mediante risequenziamento con la piattaforma Ion Torrent PGM di prodotti amplificati ottenuti da diversi pool di DNA contenenti più animali ciascuno per diverse razze

(Large White Italiana, Landrace Italiana, Duroc Italiana, Pietrain, Hampshire, Casertana, Meishan, Cinghiale). In particolare, 2 SNP sono stati identificati nel gene GPR120. Uno di questi è stato genotipizzato nei 560 suini di razza Large White estremi per lo spesso del lardo dorsale e nei 380 suini della stessa razza estremi per l'accrescimento medio giornaliero. L'SNP genotipizzato è risultato associato ($P < 0.0001$) con l'incremento medio giornaliero (Abstract 3; Pubblicazione 8). Con lo stesso approccio di risequenziamento, sono stati identificati altri 30 SNP in geni che codificano per recettori del gusto dell'amaro (TAS2R). Alcuni di questi SNP sono poi stati validati mediante PCR-RFLP. Lo studio ha permesso di identificare agli SNP in questi geni associati (Abstract 4 e Abstract 10).

i) VRTN: Il gene VRTN è stato identificato da altri come associato alla variabilità del numero di vertebre nel suino. Il polimorfismo relativo a una inserzione in una regione regolativa del gene è stato analizzato in suini di razza Large White Italiana estremi per caratteri produttivi (EBV per lo spessore del lardo dorsale e accrescimento e in una popolazione random di suini Large White Italiana (270 suini). Il polimorfismo è risultato associato con il peso delle cosce ($P < 0.05$) (Pubblicazione n. 9).

j) IGF1: Un microsatellite nella regione del promotore del gene IGF1 (precedentemente segnalato da altri come associato a caratteristiche produttive in diverse popolazioni suine) è stato genotipizzato in suini di razza Large White Italiana e Duroc Italiana (estremi e suini random). I risultati dello studio di associazione hanno permesso di evidenziare alcuni alleli associati con l'accrescimento medio giornaliero e lo spessore del lardo dorsale nelle popolazioni analizzate (Pubblicazione n. 10).

l) 20 SNP in 21 geni candidati per caratteristiche riproduttive sono stati genotipizzati su un campione di circa 1500 scrofe di razza Large White Italiana per le quali sono stati ottenuti i dati sul numero di suinetti nati vivi, il numero di suinetti nati morti e il numero totale di suinetti nati (valori fenotipici, indici genetici e random residuals). I campioni erano stati collezionati nel precedente progetto Selmol. Lo studio di associazione ha messo in evidenza che SNPs nei geni BMP1B, FUT1, GPX5, RBP4 e TGFBR1 erano associati con il numero di suinetti nati vivi ($P < 0.003$). (Pubblicazione 11).

Task 2.2 – Analisi di associazione “genome wide”

a) Utilizzo del pannello PorcineSNP60 BeadChip.

Preliminarmente si è proceduto a rimappare gli SNP del Illumina PorcineSNP60 BeadChip (62163 SNP) su tre versioni del genoma suino: Sscrofa9.2, Sscrofa10 e Sscrofa10.2. Sull'ultima versione del genoma, sono stati mappati

51581 SNP con posizione di mappa unica (BLASTN > 94% identity), 3650 avevano posizioni multiple sul genoma, 6932 sono risultati non mappati. Successivamente è stata impostata una prima analisi di GWAS utilizzando suini di razza Large White Italiana estremi per l'EBV per lo spessore del lardo dorsale già a disposizione, in modo da valutare le problematiche relative a questo tipo di analisi e per anticipare risultati anche nel primo anno. In totale sono stati genotipizzati 300 suini (150 con EBV negativo e 150 con EBV positivo per lo spessore del lardo dorsale) con il PorcineSNP60 BeadChip. L'aggiustamento per la stratificazione è stato effettuato utilizzando i dati di pedigree. L'analisi di associazione è stata effettuata utilizzando EIGENSTRAT e GenABEL. Considerando una soglia di significatività di $P \leq 5.0E-07$ 4 SNP sono risultati significativi. Con la soglia di $P \leq 5.0E-05$ altri 119 SNP sono risultati significativi. Con un FDR di 0.05 410 SNP sono risultati significativi. Gli SNP significativi con soglia $P \leq 5.0E-05$ sono risultati localizzati in regioni genomiche vicino o in geni coinvolti nello sviluppo e/o nella funzione del sistema nervoso (Pubblicazione n. 12).

Gli stessi dati di genotipizzazione con il PorcineSNP60 BeadChip sono stati utilizzati per l'identificazione di Copy Number Variation. L'analisi è stata effettuata utilizzando il software PennCNV. Alcune centinaia di CNV sono stati identificati con una copertura del genoma di circa lo 0.6%. Alcuni CNV sono risultati differenzialmente distribuiti nelle due code estreme di suini di razza Large White Italiana. È in corso la validazione di alcune di queste regioni mediante PCR-semiquantitativa (Abstract 5 e 6). L'Abstract 6 è stato premiato con una borsa di studio per la presentazione del relativo poster al congresso ISAG2012. I dati riportati negli abstract sono stati successivamente oggetto di una pubblicazione che ha permesso di descrivere l'associazione tra alcuni CNV e lo spessore del lardo dorsale nei suini di razza Large White Italiana (Pubblicazione 13).

Anche i suini di razza Large White Italiana estremi per l'EBV per l'accrescimento medio giornaliero sono stati genotipizzati con il PorcineSNP60 BeadChip. I dati ottenuti hanno permesso di effettuare uno studio di associazione genome wide per questo carattere identificando alcune centinaia di SNP associati con questo carattere, in regioni con geni potenzialmente collegati, per le funzioni, a meccanismi biologici rilevanti per l'accrescimento (Pubblicazione n. 14).

I circa 900 suini di razza Large White Italiana campionati nell'ambito del WP1 sono stati genotipizzati con il pannello PorcineSNP60 BeadChip nell'ambito di un progetto collegato. Al momento, i dati dei metaboliti analizzati su questo gruppo di animali (opportunamente trasformati per avvicina-

narne la distribuzione alla normalità) sono stati utilizzati per GWAS che ha permesso di identificare una decina di picchi di SNP significati nei Manhattan plot in corrispondenza di geni direttamente coinvolti nelle pathway in cui una ventina di metaboliti sono coinvolti. Oltre all'analisi GWAS con il valore dei metaboliti sono state condotte analisi GWAS con il rapporto tra tutti i metaboliti. In totale, circa 40.000 corse di GWAS sono state effettuate. I risultati hanno permesso di identificare picchi di significatività nei Manhattan plot per diverse altre regioni genomiche (Abstract n. 12).

b) Next Generation Sequencing.

Per l'identificazione di altri SNP associati con lo spessore del lardo dorsale è stato utilizzato un approccio di Next Generation Sequencing basato sulla costruzione di pool equimolari di DNA per due gruppi di suini di razza Large White Italiana estremi per il carattere oggetto di studio (50 suini con alto EBV e 50 suino con basso EBV). Dai due pool di DNA sono state costruite Reduced Representation Libraries che sono state sequenziate con un chip 318 della piattaforma di Next Generation Sequencing Ion Torrent. L'analisi delle sequenze ha permesso di identificare alcune migliaia di nuovi SNP. Per diversi di questi è stato possibile calcolare una frequenza sulla base della conta delle reads sovrapposte con alleli alternativi. La frequenza è stata correlata con i dati del pannello PorcineSNP60 BeadChip analizzato sugli stessi animali. Lo studio ha permesso di identificare alcune decine di SNP associati allo spessore del lardo dorsale (Pubblicazione n. 15).

WP3: Selezione genomica e utilizzo di nuovi fenotipi

Task 3.1 – Simulazioni

Le simulazioni di genomic selection effettuate hanno riguardato la popolazione di partenza, la dimensione della popolazione finale, il numero di marcatori, la loro distribuzione sul genoma, l'effetto di QTL e l'ereditabilità dei caratteri considerati. Inoltre sono stati considerati diversi scenari relativi alla disponibilità di dati genomici sugli animali (quanti e quali). Utilizzando i dati della popolazione simulata sono stati calcolati i valori genomici dei riproduttori a partire dalle stime degli effetti dei marcatori eseguite nella popolazione di training con informazioni sia genomiche che produttive. A partire dalle stime dei marcatori è stato predetto il valore genomico dei soggetti senza informazioni fenotipiche. Diversi sono stati i modelli di valutazione genomica considerati (GBLUP, BAYES B e analisi di tipo Single Step) e diversi i caratteri fenotipici (informazione produttiva o valutazione genetica tradizionale)

al fine di valutare gli eventuali vantaggi legati all'applicazione della selezione genomica nel suino pesante italiano relativamente all'attuale sistema di selezione e valutazione dei riproduttori (Abstract 7 e 8; Pubblicazione 16).

Task 3.2 – Utilizzo di dati reali

a) Verifica dell'effetto della selezione classica sul cambiamento delle frequenze alleliche nel tempo.

Il primo passo per poi pensare a implementare ulteriori approcci nella selezione è stato quello di verificare se la selezione implementata nella razza Italiana Large White nel corso degli anni ha modificato le frequenze alleliche nella popolazione. A questo proposito sono stati scelti 200 verri nati dal 1992 al 2012 la cui attendibilità degli indici era superiore all'80%. I verri sono stati genotipizzati per marcatori in 5 geni candidati (MC4R, IGF2, FTO, VRTN e PRKAG3). La modellizzazione effettuata con logistic regression ha permesso di identificare che per i primi quattro marcatori la selezione nel tempo ha cambiato in modo significativo le frequenze alleliche (Pubblicazione n. 17; Abstract 13). Lo stesso approccio è stato utilizzato dopo genotipizzazione con il pannello PorcineSNP60 BeadChip degli stessi verri. Lo studio ha messo in evidenza che il genoma della razza Large White Italiana è stato modificato sostanzialmente dalla selezione effettuata negli ultimi 20 anni (Abstract 13, Pubblicazione in corso di valutazione n. 3). Per avere ulteriori informazioni utili all'implementazione di un eventuale programma di genomic selection nella razza Large White Italiana, è stato effettuato anche il sequenziamento del genoma del verro Olimpo che è considerato il capostipite dell'attuale programma di selezione della razza (Abstract 15).

Successivamente sono stati identificati i verri candidati fratelli dei suini delle triplette sottoposte a performance test e macellate (rispetto al campione di circa 950 suini di razza Large White Italiana descritti nel Task 1.1). Di questi animali è stato recuperato un campione di sangue liofilizzato da cui è stato estratto il DNA sottoposto alla genotipizzazione con il pannello PorcineSNP60 BeadChip. Tutti i dati di genotipizzazione ottenuti in questo progetto sono stati uniti a quelli precedentemente ottenuti. In totale sono disponibili 1980 suini genotipizzati con il pannello PorcineSNP60 BeadChip. I dati sono stati utilizzati per disegnare un primo possibile approccio di genomic selection su dati reali.

Task 3.3 – Valutazione delle correlazioni tra i vari fenotipi analizzati sui suini e loro possibile impatto sull'utilizzo di nuove informazioni nel miglioramento genetico del suino pesante italiano

I nuovi fenotipi ottenuti dall'analisi metabolomica sono stati modellizzati per valutare la possibilità di un loro utilizzo nei piani di selezione. In particolare, sono stati identificati diversi metaboliti con correlazioni molto elevate (>70%) con gli indici genetici incremento ponderale giornaliero e spessore del lardo dorsale (Abstract 9). L'analisi sPLS-DA ha permesso di identificare un gruppo di metaboliti (n. 30) correlati in modo significativo ai caratteri spessore del lardo dorsale e tagli magri. Sulla base di questi metaboliti sono stati costruiti dei predittori per definire con quale accuratezza il fenotipo finale potesse essere previsto. Questi modelli permettono di ottenere una accuratezza di circa il 70%.

- 1) FONTANESI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., FRONZA R., MARTELLI P.L., SCOTTI E., COLOMBO M., SCHIAVO G., CASADIO R., BUTTAZZONI L., RUSSO V. (2012): *Identification and association analysis of several hundred single nucleotide polymorphisms within candidate genes for backfat thickness in Italian Large White pigs using a selective genotyping approach*, «Journal of Animal Science», 90, pp. 2450-2464.
- 2) FONTANESI L., BUTTAZZONI L., SCOTTI E., RUSSO V. (2012): *Confirmation of the association between a single nucleotide polymorphism in the porcine LDHA gene and average daily gain and correlated traits in Italian Large White pigs*, «Animal Genetics», 43, pp. 649-650.
- 3) FONTANESI L., BERTOLINI F., DALL'OLIO S., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V. (2012): *Analysis of association between the MUC4 g.8227C>G polymorphism and production traits in Italian heavy pigs using a selective genotyping approach*, «Animal Biotechnology», 23, pp. 147-155.
- 4) FONTANESI L., RUSSO V. (2013): *Nucleotide variability and haplotype heterogeneity at the porcine fat mass and obesity associated (FTO) gene*, «Animal Genetics», 44, pp. 96-100.
- 5) FONTANESI L., BERTOLINI F., SCOTTI E., TREVISI P., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., DAVOLI R., BOSI P., RUSSO V. (2012): *Polymorphisms in an obesity related gene (PCSK1) are associated with fat deposition and production traits in Italian heavy pigs*, «Animal», 6, pp. 1913-1924.
- 6) FONTANESI L., BUTTAZZONI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., RUSSO V. (2013): *Association between melanocortin 4 receptor (MC4R) gene haplotypes and carcass and production traits in Italian Large White pigs evaluated with a selective genotyping approach*, «Livestock Science», 157, pp. 48-56.
- 7) FONTANESI L., BERTOLINI F. (2013): *The TBC1D1 gene: structure, function, and association with obesity and related traits*, «Vitamins and Hormones», 91, pp. 77-95.
- 8) FONTANESI L., BERTOLINI F., SCOTTI E., SCHIAVO G., COLOMBO M., TREVISI P., RIBANI A., BUTTAZZONI L., RUSSO V., DALL'OLIO S. (2015): *Next generation semiconductor based-sequencing of a nutrigenetics target gene (GPR120) and association with growth rate in Italian Large White pigs*, «Animal Biotechnology», 26, pp. 92-97.
- 9) FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., RUSSO V. (2014): *Investigation of a short interspersed nuclear element polymorphic site in the porcine vertnin gene: Allele frequencies and association study with meat quality, carcass and production traits in Italian Large White pigs*, «Italian Journal of Animal Science», 13, pp. 61-65.

- 10) FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., RUSSO V. (2013): *Analysis of association between a microsatellite at intron 1 of the insulin-like growth factor 1 (IGF1) gene and fat deposition, meat production and quality traits in Italian Large White and Italian Duroc pigs*, «Italian Journal of Animal Science», 12, pp. 444-449.
- 11) DALL'OLIO S., FONTANESI L., BUTTAZZONI L., BAIOTTO C., GALLO M., RUSSO V. (2013): *Association study between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and reproduction traits in Italian Large White sows*, «Livestock Science», 155, pp. 172-179.
- 12) FONTANESI L., SCHIAVO G., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., MARTELLI P.L., BUTTAZZONI L., CASADIO R., RUSSO V. (2012): *A genome wide association study for backfat thickness in Italian Large White pigs highlights new regions affecting fat deposition including neuronal genes*. *BMC Genomics* **13**, 583.
- 13) SCHIAVO G., DOLEZAL M.A., SCOTTI E., BERTOLINI F., CALÒ D.G., GALIMBERTI G., RUSSO V., FONTANESI L. (2014): *Copy number variants in Italian Large White pigs detected using high-density single nucleotide polymorphisms and their association with back fat thickness*, «Animal Genetics», 45, pp. 745-749.
- 14) FONTANESI L., SCHIAVO G., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., RUSSO V. (2014): *A genomewide association study for average daily gain in Italian Large White pigs*, «Journal of Animal Science», 92, pp. 1385-1394.
- 15) BOVO S., BERTOLINI F., SCHIAVO G., MAZZONI G., DALL'OLIO S., FONTANESI L. (2015): *Reduced Representation Libraries from DNA Pools Analysed with Next Generation Semiconductor Based-Sequencing to Identify SNPs in Extreme and Divergent Pigs for Back Fat Thickness*, «International Journal of Genomics», 2015, 950737.
- 16) SAMORÈ A.B., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V., FONTANESI L. (2015): *Genomic selection in a pig population including information from slaughtered full sibs of boars within a sib-testing program*, «Animal», 9, pp. 750-759.
- 17) FONTANESI L., SCHIAVO G., SCOTTI E., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SAMORÈ A.B., GALLO M., RUSSO V., BUTTAZZONI L. (2015): *A retrospective analysis of allele frequency changes of major genes during 20 years of selection in the Italian Large White pig breed*, «Journal of Animal Breeding and Genetics», 132, pp. 239-246.

PUBBLICAZIONI INVIATE A RIVISTE REFERIZZATE

- 1) BOVO S., MAZZONI G., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., FANELLI F., MEZZULLO M., SCHIAVO G., MANISI A., TREVISI P., BOSI P., DALL'OLIO S., PAGOTTO U., FONTANESI L.: *Metabolomics evidences plasma and serum biomarkers differentiating two heavy pig breeds*, Submitted.
- 2) BOVO S., MAZZONI G., CALÒ D.G., GALIMBERTI G., FANELLI F., MEZZULLO M., SCHIAVO G., SCOTTI E., MANISI A., SAMORÈ A.B., BERTOLINI F., TREVISI P., BOSI P., DALL'OLIO S., PAGOTTO U., FONTANESI L.: *Deconstructing the pig sex metabolome: targeted metabolomics in heavy pigs revealed sexual dimorphisms in plasma biomarkers and metabolic pathways*, Submitted.
- 3) SCHIAVO G., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SAMORÈ A.B., BERTOLINI F., RUSSO V., GALLO M., BUTTAZZONI L., FONTANESI L.: *Twenty years of artificial directional selection have shaped the genome of the Italian Large White pig breed*, Submitted.

ABSTRACT E PRESENTAZIONI A CONVEGNI

- 1) FONTANESI L., VALENTINI M., STERI R., SCOTTI E., DALL'OLIO S., MOIOLO B., BUTTAZZONI L. (2013): *A comparative serum metabonomic analysis between Italian Duroc and Italian Large White pigs*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13 June 2013.
- 2) FONTANESI L., DALL'OLIO S., FANELLI F., SCOTTI E., SCHIAVO G., BERTOLINI F., TASSONE F., SAMORÈ A.B., BOVO S., MAZZONI G.L., GALLO M., BUTTAZZONI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., MARTELLI P.L., CASADIO R., PAGOTTO U., RUSSO V. (2013): *Combined genomics and metabolomics approaches to identify markers associated with production traits in pigs*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13 June 2013.
- 3) SCOTTI E., BERTOLINI F., SCHIAVO G., COLOMBO M., TREVISI P., DALL'OLIO S., BUTTAZZONI L., RUSSO V., FONTANESI L. (2013): *Identification of polymorphisms in the porcine GPR120 (FFAR4) gene and association with production traits in Italian Large White pigs*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13 June 2013.
- 4) FONTANESI L., BERTOLINI F., SCOTTI E., SCHIAVO G., TREVISI P., COLOMBO M., MARTELLI P.L., CASADIO R., BOSI P. (2013): *Bitter taste receptor genes in pigs: SNP identification using next-generation semiconductor sequencing*, Proceedings of the International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (ISEP), September 9-12, Sacramento, California.
- 5) SCHIAVO G., DOLEZAL M., MARTELLI P.L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., CASADIO R., BAGNATO A., RUSSO V., FONTANESI L. (2012): *Identification of copy number variants associated with back fat thickness in pigs using a selective genotyping approach*, Proceedings of the 4th International Conference on Quantitative Genetics: Understanding Variation in Complex Traits, Edinburgh, 17-22 June 2012, Abstract P-402.
- 6) SCHIAVO G., DOLEZAL M., MARTELLI P.L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., CASADIO R., BAGNATO A., RUSSO V., FONTANESI L. (2012): *A selective genotyping approach identifies copy number variants associated with backfat thickness in Italian Large White pigs*, Proceedings of the ISAG2012 Congress, Cairns, July 15-20 2012.
- 7) SAMORÈ A.B., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V., FONTANESI L. (2013): *Genomic selection in Italian heavy pigs: a simulation study*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13 June 2013.
- 8) SAMORÈ A.B., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V., FONTANESI L. (2013): *A simulation study to evaluate different strategies of genomic selection in Italian heavy pigs*, Proceedings of the 64th EAAP Annual Meeting, 26-30 August 2013, Nantes, France. Abstract 17546.
- 9) FONTANESI L., DALL'OLIO S., FANELLI F., SCOTTI E., SCHIAVO G., BERTOLINI F., TASSONE F., SAMORÈ A.B., MAZZONI G.L., BOVO S., GALLO M., BUTTAZZONI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., MARTELLI P.L., CASADIO R., PAGOTTO U., RUSSO V. (2013): *Genomics and metabolomics approaches to identify markers associated with economic traits in pigs*, Proceedings of the 64th EAAP Annual Meeting, 26-30 August 2013, Nantes, France. Abstract 17658.
- 10) RIBANI A., BERTOLINI F., SCHIAVO G., SCOTTI E., UTZERI V.J., DALL'OLIO S., TREVISI P., BOSI P., FONTANESI L. (2015): *Next generation semiconductor based sequencing of bitter taste receptor genes in different pig breeds and populations and association study*

- of identified polymorphisms using a DNA pooling strategy*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), abstract C0-70.
- 11) FONTANESI L., SAMUELE B., MAZZONI G.L., SAMORÈ A.B., SCHIAVO G., SCOTTI E., FANELLI F., BERTOLINI F., GALLO M., BUTTAZZONI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., MEZZULLO M., MARTELLI P.L., CASADIO R., PAGOTT, U., RUSSO V., & DALL'OLIO S. (2014a): *Genome wide perspective of genetic variation in pig metabolism and production traits*, Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Vancouver (CA), August 17-22, 2014.
 - 12) FONTANESI L., SCHIAVO G., BOVO S., MAZZONI G., FANELLI F., RIBANI A., UTZERI V.J., LUISE D., SAMORÈ A.B., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., MANISI A., BERTOLINI F., MEZZULLO M., PAGOTTO U., DALL'OLIO S., TREVISI P., & BOSI P. (2015): *Dissecting complex traits in pigs: metabotypes illuminate genomics for practical applications*, Proceedings of the 66th EAAP Annual Meeting 2015, Warsaw, Poland, 31 August-4 September 2015.
 - 13) SCHIAVO G., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., BERTOLINI F., SAMORÈ A.B., RUSSO V., GALLO M., BUTTAZZONI L., FONTANESI L. (2015): *Genome wide analysis of the effects of twenty years of artificial directional selection in the Italian Large White pig breed*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), abstract C-069.
 - 14) SAMORÈ A.B., DALL'OLIO S., MURATORI T., FONTANESI L. (2015): *Genetic aspects of haematological parameters in Italian Large White pigs*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), abstract P-067.
 - 15) FONTANESI L., BERTOLINI F., SCHIAVO G. (2015): *The founder signature: sequencing the genome of "Olimpo", the most important boar of the Italian Large White selection program*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), abstract C-047.

COLLABORATORI

Prof. Vincenzo Russo

Prof.ssa Roberta Davoli

Prof.ssa Stefania Dall'Olio

Dott. Paolo Zambonelli

Dott. Emilio Scotti – assegnista di ricerca nell'ambito del progetto Innovagen

Dott.ssa Giuseppina Schiavo – dottoranda di ricerca

Dott.ssa Antonia Bianca Samorè – assegnista di ricerca nell'ambito del progetto Innovagen

Prof. Bruno Stefanon

Dott.ssa Sandy Sgorlon

Gianluca Mazzoni – contrattista (cococo) nell'ambito del progetto Innovagen

Samuele Bovo – contrattista (cococo) nell'ambito del progetto Innovagen

Unità Carne Bovina e Altre Specie

Responsabile:

Alessio Valentini, *Università della Tuscia*

Partecipanti:

Francesco Panella, Francesca Maria Sarti, Emiliano Lasagna, *Dipartimento di Biologia Applicata, Università degli Studi di Perugia*

Liliana Di Stasio, *Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA), Università di Torino*

Riccardo Bozzi, *Dipartimento di Scienze Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze*

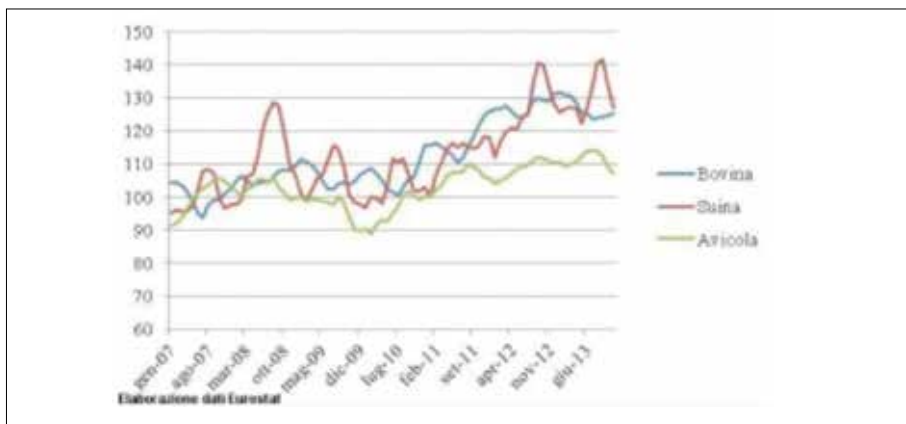
Maria Federica Trombetta, *Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

Nel corso degli ultimi cinque anni la produzione mondiale di carne è risultata in espansione (+13,7%); nel 2011 ha raggiunto 299 milioni di tonnellate [1]. La prima area in termini di importanza è quella asiatica (41,7%), seguita dall'America (31,5%) e dall'Europa (19,3%). Alcuni areali manifestano una crescita produttiva superiore alla media come nel caso dei continenti asiatico, africano e sudamericano, mentre quello europeo e nordamericano manifesta uno sviluppo più rallentato.

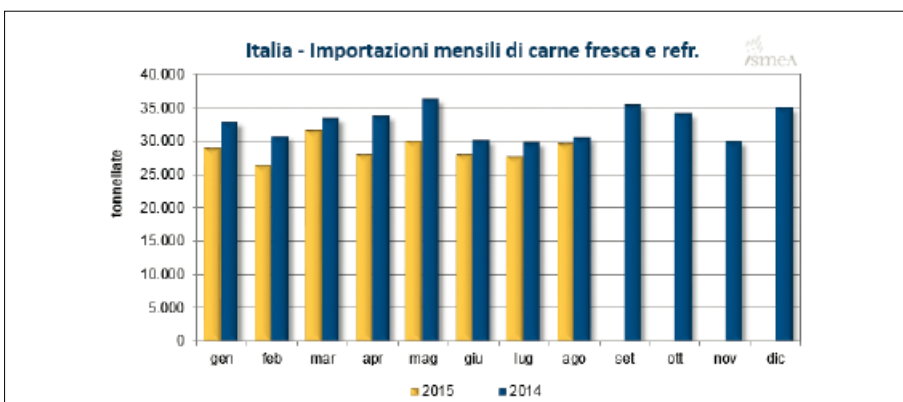
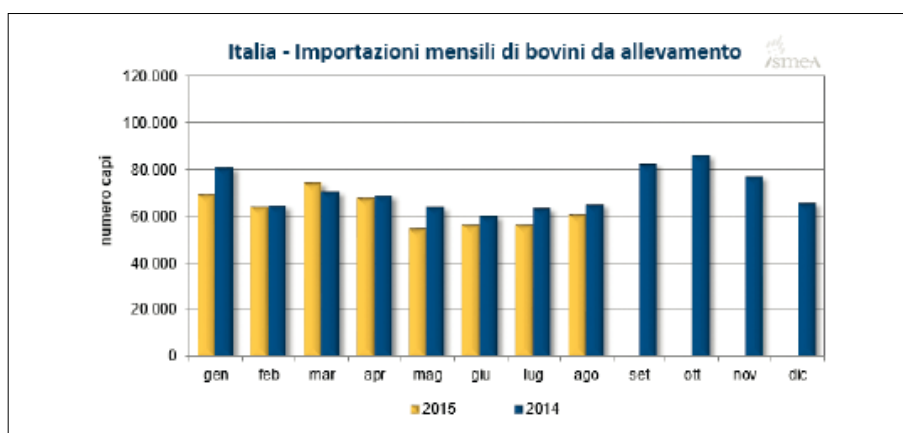
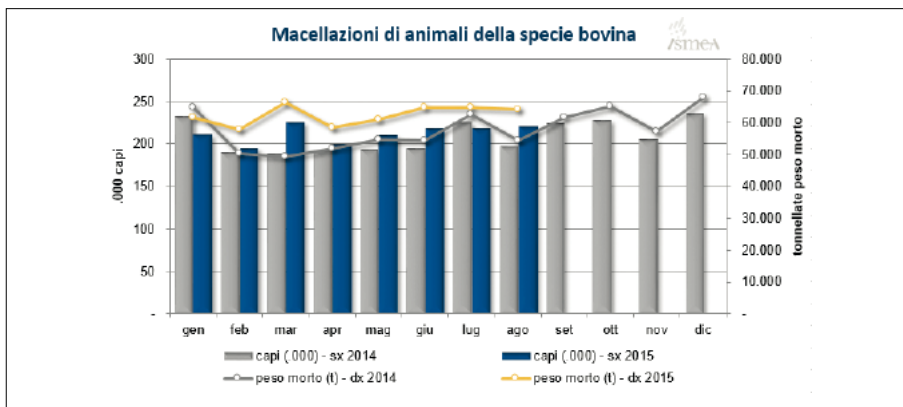
Fra le tipologie di carne prodotte su scala mondiale quella suina (36,8% della produzione mondiale) e quella avicola (34,1%) risultano le più importanti. La carne avicola rappresenta la tipologia in maggiore espansione (+23,2%), mentre l'andamento produttivo della carne suina è in linea con la dinamica generale. Per contro la produzione di carne bovina, che rappresenta il 21,1% della produzione mondiale di carne, manifesta un'inversione di tendenza con un trend negativo a partire dal 2011.

Per quanto riguarda le tipologie di carne prodotta in Europa, oltre la metà di questa (23 milioni di tonnellate) è rappresentata da carne suina che nello stesso periodo segna una crescita del 6,5%. Segue in termini di importanza la carne avicola (12 milioni di tonnellate) che segna la crescita più importante, pari al 17,2%, e la carne bovina che, con 8 milioni di tonnellate prodotte, è l'unica tipologia di carne che registra una lenta ma progressiva riduzione dell'offerta (-1,1%).

Il comparto della carne bovina è stato fortemente influenzato negli anni dalle scelte della Politica agricola comune e da scandali di tipo sanitario. Un ulteriore aspetto che va preso in considerazione è il rapporto tra il mercato comunitario e le produzioni nordamericane. Il mercato comunitario è stato per anni un mercato chiuso a potenziali esportatori. Nel 1988 la frontiera è stata

Fig. 1 *Scambi internazionali di carni*

chiusa all'importazione di carne statunitense e canadese in quanto le autorità dell'UE hanno ritenuto, sulla base del principio di precauzione, che la pratica diffusa in Nord America di impiegare l'ormone della crescita nell'allevamento dei bovini comportasse rischi per la salute del consumatore. In conseguenza a ciò, nel 1996, Stati Uniti e Canada hanno contestato questa azione in sede dell'Organizzazione mondiale del commercio. L'esito del procedimento ha decretato l'illegittimità del blocco delle importazioni in ragione del fatto che l'UE non è stata in grado di avanzare prove sufficienti in merito al rischio sanitario dichiarato. Questo giudizio sfavorevole è stato pronunciato nel 1997 e confermato in seconda battuta anche nel 1998 [7, 8]. Poiché l'UE, nonostante il pronunciamento, ha voluto mantenere il blocco all'importazione di queste carni, nel luglio 1999 l'OMC ha autorizzato Stati Uniti e Canada ad applicare una tassazione addizionale a carico dei prodotti di origine comunitaria per un valore di 116,8 milioni di dollari americani e 11,3 milioni di dollari canadesi per anno a titolo di risarcimento del danno commerciale subito dai rispettivi paesi. Questa sentenza è stata riconfermata anche nel 2008 [9, 10]. Ulteriori sviluppi in materia di scambio di carni bovine si sono avuti nel maggio 2009. In questa data Unione europea e Stati Uniti hanno raggiunto un accordo preliminare che prevede l'apertura del mercato comunitario alle carni bovine prodotte senza l'impiego di ormoni con un contingente pari a 20.000 tonnellate per i primi tre anni e 45.000 tonnellate negli anni successivi. Allo stesso tempo gli Stati Uniti rinunciano ad applicare le sanzioni sui prodotti di provenienza comunitaria. Nel 2011 l'Unione europea è giunta a un accordo simile con il Canada consentendo l'ingresso di carni non ottenute con ormoni della crescita per una quota di 3.200 tonnellate. Le sanzioni finanziarie sono state quindi revocate a



partire dal 2011 e, dal marzo 2012, i citati quantitativi di carne nordamericana, prodotta senza l'ausilio di ormoni, possono essere importate annualmente nel mercato comunitario (Regolamento (UE) n. 464/2012).

WPI 1) GENI CANDIDATI: ESTENSIONE DEI GENI/SNP/INDIVIDUI DI SELMOL

Finalità

Associazione SNPs con caratteri produttivi carne.

NOME	GENE	CROMOSOMA BOVINO	POSIZIONE E SNP	ACCESSION NUMBER
Recettore ormone della crescita	GHR_1	20	Promotore 149 G>A	AF126288
Recettore ormone della crescita	GHR_2	20	Introne IV 300 G>A	AY643807
Fattore di crescita e differenziazione	GDF8_1	2	Promotore -371 T>A	AF348479
Fattore di crescita e differenziazione	GDF8_2	2	Promotore -805 G>C	AJ438578
Grelina	GHRL	22	Introne III 446 G>A	AY455980
Leptina	LEPTIN_1	4	Esone II 305 C>T	AY138588
Leptina	LEPTIN_2	4	Promotore 528 C>T	AB070368
Leptina	LEPTIN_3	4	Promotore 1759 C>G	AB070368
Leptina	LEPTIN_4	4	Introne II 1620 G>A	Y11369
Fattore miogenico	MYF_5	5	Introne II 1948 A>G	M95684
Fattore di crescita insulino Simile 2°	IGF_2	29	Esone II 150 T>C	AY237543
Recettore leptina	Ob_R	3	Esone 20 115 C>T	AJ580799/800 /801
Proteina di disaccoppiamento mitocondriale 2°	UCP_2	15	Introne V 380 G>C	AY147821
Proteina di disaccoppiamento mitocondriale 3°	UCP_3	15	Introne III 1099 G>A	AF127030
Recettore melanocortina 4°	MC4R	24	Esone 1069 G>C	AF265221

Tab. 1 SNP oggetto dello studio

Materiale

- 477 tori chianini
- 420 tori marchigiani
- 305 tori romagnoli

Risultati

Grazie ai risultati ottenuti da questo studio è stato possibile individuare diversi SNP favorevoli per la selezione nel campione considerato, quali:

GHR_1, LEPT_2, LEPT_4, MYF_5, UCP_3, Ob-R correlati ad accrescimento, peso corporeo, muscolosità, metabolismo lipidico ed energetico, che risultano essere aspetti fondamentali per il miglioramento genetico delle razze da carne.

WPI 2) EFFETTO DI GENI LEGATI ALLE CARATTERISTICHE QUALITATIVE DELLE CARNI IN PROGENIE DI TORI LIMOUSINE

Materiali

- Novantasette (97) bistecche provenienti da vitelloni interi, progenie di 9 tori di razza Limousine allevati nelle medesime condizioni di allevamento e alimentazione
- Animali macellati a un peso medio di 481 kg e un'età media di 596 giorni
- Taglio campione alla sesta vertebra toracica prelevato 8 giorni dopo la macellazione

Analisi effettuate

- Composizione chimica
- Profilo acidi grassi
- Colore
- pH
- Calo di cottura
- Sforzo al taglio
- Acqua libera
- Genotipizzazione di 10 SNPs (KBioScience)
- Ricostruzione aplotipi (Phase V2.1)
- Analisi di associazione tra SNP/aplotipi e caratteri mediante modello misto con inclusione matrice di parentela (pedigreemm2 R software)
- Effetto genico (i.e. valore dell'effetto SNP / d.s. fenotipica del carattere)

Due SNPs al gene della miostatina risultano fissati (F94L and Q204X) così come lo SNP nel gene della tiroglobulina (C422T).

Primi due SNP fissati per azione delle scelte selettive nella razza Limousine.

Solo CAST282 situato nel gene della calpastatina mostra un moderato eccesso di genotipi eterozigoti.

Utilizzazione degli aplotipi nello studio dell'associazione genica non ha modificato i risultati

GENE	CHR	SNP NAME	SNP DESCRIPTION	ALLELES	FREQUENCIES
MYOSTATIN	2	F94L	AF320998 – C > A	A	1.00
				C	0.00
		Q204X	AB076403 – C > T	C	1.00
				T	0.00
CALPAIN	29	CAPN316	AF252504 – C > G	G	0.84
				C	0.16
		CAPN530	AF248054 – A > G	T	0.61
				C	0.39
		CAPN4751	AF245054 – C > T	G	0.48
CALPASTATIN	7	CAST282	AY008267 – C > G	A	0.52
				C	0.74
FATTY-ACID-BIN-DING PROTEIN	14	FABP4	X89244 – G > C	G	0.74
				C	0.26
DIACYLGLYCEROL O-ACYLTRANSFERASE I	14	DGAT1	AY065621 – A > C	G	0.64
				C	0.36
LEPTIN	7	LEP	AF120500 – C > T	G	0.93
				A	0.07
THYROGLOBULIN	14	TG	X05380 – C > T	C	0.70
				T	0.30
				C	1.00
				T	0.00

Tab. 2 Frequenze alleliche dei dieci SNP analizzati

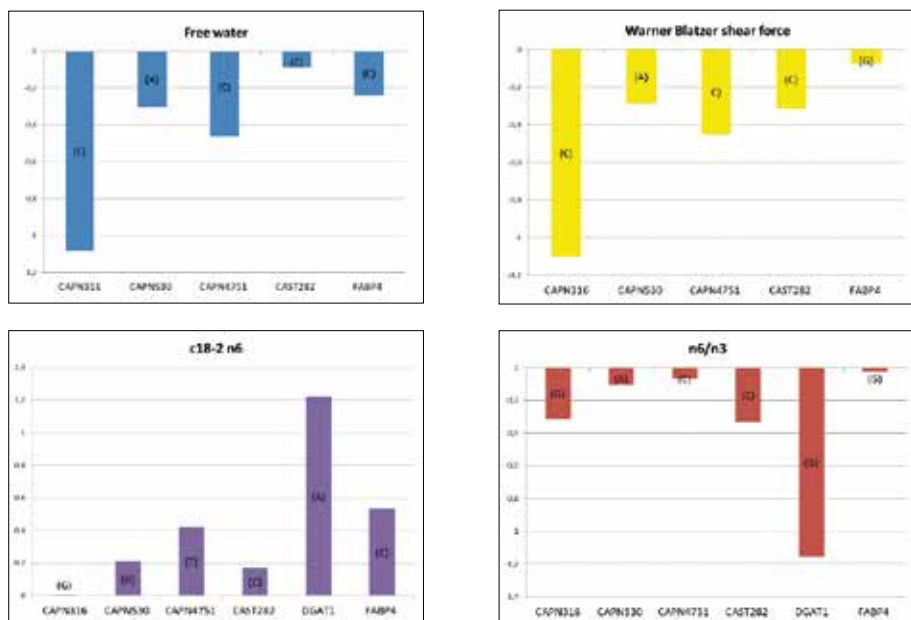


Fig. 2 Effetto della sostituzione genica su Acqua libera e sforzo al taglio (allele favorevole tra parentesi).

Allele C allo SNP CAPN316 risulta associata a una diminuzione di acqua liberata per compressione e a un minore sforzo al taglio (Figure 1 e 2)

Allele A al gene DGAT1 e l'allele C al gene FABP4 sembrano favorire l'aumento della percentuale di C18:2-n6 (fig. 3) mentre l'allele G a entrambe gli SNP sembra quella favorevole per il rapporto n6/n3 (fig. 4).

Gli alleli favorevoli individuati possono essere considerati marcatori utili per la razza Limousine e meritevoli di ulteriori approfondimenti al fine di una loro inclusione negli schemi selettivi della razza.

WP2 SNP CHIP TIPIZZAZIONE CON DIVERSI SNP CHIP (800K, 54K, 3K) GENOMIC SELECTION, GENOME WIDE SCAN PER DIVERSI FENOTIPI INTERESSANTI LA CARNE

WP2 - 1) È stata individuata una regione cromosomica nella razza Piemontese nella quale si trova uno o più geni che influenzano la facilità di parto¹. Una popolazione di 323 tori con indice genetico per la facilità parto diretto (EBV) è stata analizzata con un pannello a media densità di SNP (54.001 SNPs) per eseguire un genome-wide scan. Il segnale più forte è stato rilevato sul cromosoma 6 tra 37,8 e il 38,7 Mb dove sono stati trovati 13 SNPs associati alla facilità parto. Tre geni sono localizzati in questa regione: LAP3, codificante per un aminopeptidasi leucina coinvolto nella idrolisi dell'ossitocina; NCAPG, codificante per un complesso condensin non-SMC I, che è stato associato nel bovino con la crescita del feto e con le dimensioni della carcassa, e LCORL, che è stato associato all'altezza negli esseri umani e nei bovini. Per confermare ulteriormente i risultati della scansione genomica abbiamo genotipizzati SNPs aggiuntivi all'interno di questa regione. I risultati di questa analisi supplementare hanno pienamente confermato i risultati del GWAS e particolarmente indicano LAP3 come il più probabile gene coinvolto. L'analisi di Linkage Disequilibrium (LD) ha mostrato un'alta correlazione fra gli SNP situati all'interno di LAP3 e LCORL indicando una possibile firma di selezione dovuta sia a un aumento della fitness o di selezione degli allevatori per il carattere.

¹ BONGIORNI SILVIA, MANCINI GIORDANO, CHILLEMI GIOVANNI, PARISSET LORRAINE, VALENTINI A, CHILLEMI GIOVANNI (2012): *Identification of a Short Region on Chromosome 6 Affecting Direct Calving Ease in Piedmontese Cattle Breed*, «PLOS ONE», vol. 7. 10.1371/journal.pone.0050137

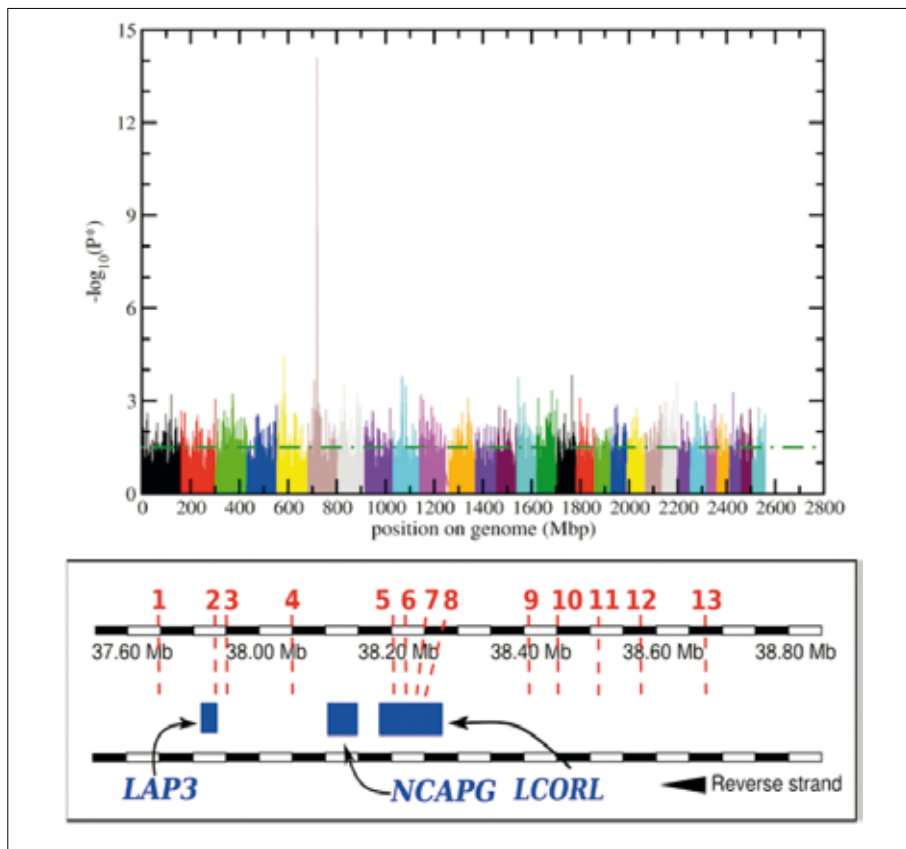


Fig. 3 Scan del genoma che dimostra il picco di probabilità della zona coinvolta nel cromosoma 6 (fig. superiore) e dettaglio del cromosoma 6 (fig. inferiore)

WP2 2) IMPUTAZIONE

Le valutazioni genomiche di 161,341 Frisone sono state stimate utilizzando 311.725 su 777.962 marcatori del chip Illumina BovineHD (HD). Studi iniziali con 1.741 genotipi HD da 5 razze ha rivelato che 636,967 marcatori erano utilizzabili, ma che la metà erano ridondanti. Le correlazioni quadrate con i dati da predire erano leggermente superiori per 16 caratteri e un po' inferiori per 12 nel chip HD rispetto al chip 50K. Di conseguenza si conclude che non vale la pena di spendere di più per la genotipizzazione con il chip HD rispetto a quello normale a 54k. I chip a numero più basso di SNP non sono stati impiegati perché Illumina ha cambiato diverse volte il numero degli stessi, rendendo di fatto impossibile seguire uno standard.

WP3 NEXT GENERATION SEQUENCING. SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA DI INDIVIDUI RAPPRESENTATIVI; RICOSTRUZIONE AFFIDABILE E PRECISA DEGLI ALOTIPI DELLA POPOLAZIONE, FONDAMENTALI PER L'IMPUTAZIONE E L'ANALISI TRA LE RAZZE. SCOPERTA DELL'INTERO PATRIMONIO DI SNP DELLE RAZZE

Sono stati sequenziati i genomi completi di diversi individui delle principali razze da carne italiane. Su un numero ancora superiore di individui sono state effettuate le sequenze dell'intero esoma, ovvero delle regioni codificanti le proteine. Tutti i risultati sono stati collocati nella banca dati a disposizione delle Associazioni Allevatori. È complicato dare qui tutti i dettagli contenuti nella banca dati: esporremo solo un esempio che dimostra la possibilità di affinare l'analisi per caratteri per i quali si conosce grosso modo la zona nella quale dovrebbero essere localizzati il/i gene/i causativi di un determinato fenotipo.

L'esempio è relativo al carattere "facilità di parto" da noi già identificato nella razza Piemontese. Sono stati sequenziati gli esomi di quattro + quattro individui estremi per questo carattere. Solo nel cromosoma 6 sono stati individuati 214.148 SNP tra gli estremi. Nella figura seguente sono riportati gli SNP tra gli estremi intorno alla zona nella quale avevamo individuato un picco di probabilità per la presenza di un putativo gene causativo del fenotipo. Come si vede, la maggior parte degli SNP si colloca nella regione già individuata con una metodologia differente.

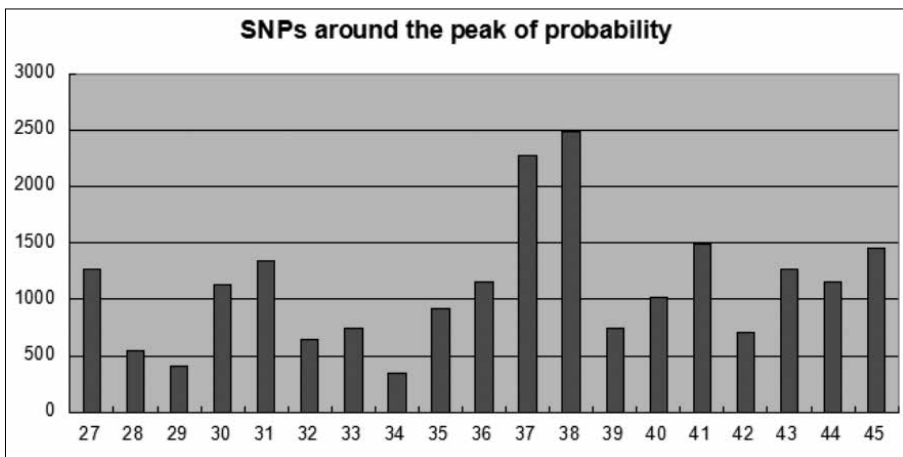


Fig. 4. SNP intorno la picco di probabilità

WP4 ANALISI STATISTICA, IMPUTAZIONE, ASSOCIAZIONE E CORRELAZIONE
CON I VALORI GENETICI, MODELLI E METODI PER RICOSTRUIRE FENOTIPI
O VALORI GENETICI VERI, GENOMIC SELECTION, GENOME WIDE SCAN

Uso del test di permutazione modificato per GWAS su caratteri accrescimen-
to e macellazione per la Marchigiana
408 torelli Marchigiani; Genotipo Illumina 54K

Caratteri presi in considerazione:
Peso corporeo
Accrescimento giornaliero
Peso carcassa, testa, pelle
Resa alla macellazione
pH alla macellazione, 24h
Circonferenza stinco
Classificazione SEUROP

Modello di analisi: $Y = \text{HERD} + \text{DATE} + \text{AGE} + \text{SNP} + \text{SIRE} + e$

Versione modificata della soglia experiment-wise proposta da Churchill e Doerge

Single marker analysis

Marcatori significativi ($P < 0.01$) 10,000 permutazioni tra animali
Il 5° percentile delle significatività per ciascun SNP viene ritenuto

Lo soglia del 5° percentile totale usata come soglia genome-wide

Alcuni geni identificati

Table 2 List of common candidate genes that were detected by both the control chart and varLD methods		
BTA	Position (Mb)	Gene symbol
2	5.6 to 5.8	NABP1, INPP1
4	92.2 to 92.3	GRM8, ZNF800, MIR592
6	37.9 to 38.1	HERC6, PYURF, NAP1L5, HERC5, FAM13A, PPM1K, ABCG2, PKD2, IBPS, MEPE
13	63.2 to 63.6	SNAT1, E2F1, ZNF341, CHMP4B, PXMP4, NECAB3
17	64.8 to 65.0	SIRT4, RPLP0, RAB35, PLA2G1B, ALDH2, COX6A1, GATC, ACAD5, POP5, RNF10, MAPKAPK5, TRAP1, SRSF9, DYNLL1, MLEC, UNC119B, CABP1
18	35.7 to 35.8	CDH3
19	28.4	PER1, HSE, ALOX15B, GUCY2D, PFAS, RANGRF, RPL26, KCNAB3, TMEM, CYB5D1, TRAFCT1, VAMP2, AURKB, ARHGEF15, ODF4
25	41.0 to 41.1	CARD11, GNA12
26	9.5 to 9.8	PAPSS2, ATAD1, RNSL

Tab. 3. *Geni candidati identificati*

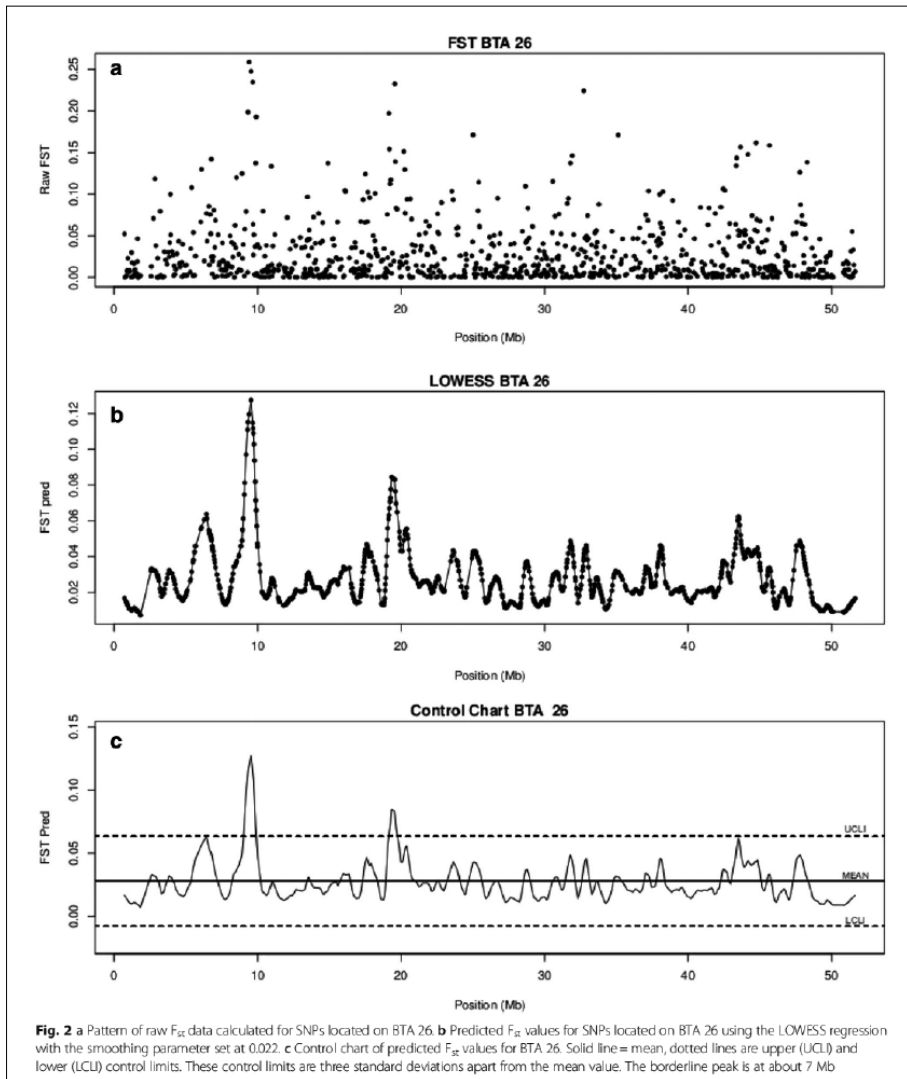


Fig. 5 Esempio di scan sul genoma 26 rivelante picchi di probabilità in zone probabilmente ospitanti geni che influenzano il fenotipo

Funzioni di alcuni dei geni individuati

BTA	GENE SYMBOL	BIOLOGICAL FUNCTION	TRAIT
1	OSTN : osteocrin	Bone metabolism	ADG
2	SLC40A 1 : solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member1	Muscle metabolism	DP
7	SPARC : secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	Osteoblastic differentiation	ADG, HW
7	MEF2C : myocyte enhancer factor 2C	Myogenesis	ADG
11	FPGS : folypolyglutamate synthase	Folate homeostasis	HW
14	TTPA : tocopherol (alpha) transfer protein	Tocopherol homeostasis	ADG
15	ACAD 8 : Acyl-CoA dehydrogenase family, member 8	Fatty acid metabolism	ADG, HW
17	ACACB : Acetyl-CoA carboxilase beta	Fatty acid metabolism	ADG, HW

Table 1 Genes known to affect bovine traits identified by the control chart approach

BTA	Position (bp)	Gene symbol and name
2	6213566-6220196	<i>MSTN</i> myostatin
6	37959536-38030586	<i>ABCG2</i> ATP-binding cassette, subfamily G (white), member 2
10	37829007-37885645	<i>CAPN3</i> calpain 3
13	66863225-66872531	<i>GHRH</i> growth hormone releasing hormone
14	1795425-1804838	<i>DGAT1</i> diacylglycerol O-acyltransferase 1
18	22118201-22541539	<i>FTO</i> fat mass and obesity associated

Tab.4. Geni *candidati nelle regioni identificate*

WP5 TRASFERIMENTO ATTIVITA CON CRSA

C'è stata un'attività molto stretta in collaborazione sia con le ANA che con CRSA. In particolare quest'ultimo ente si è fatto carico del reperimento dei campioni biologici, degli indici genetici e delle analisi presso LGS. Sono previste ulteriori azioni per il trasferimento tecnologico appena saranno disponibili più dati provenienti dai WP1-5.

PUBBLICAZIONI

MARRAS G., GASPA G., SORBOLINI S., DIMAURO C., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., WILLIAMS J.L., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy*, «Animal genetics», 46 (2), pp. 110-121.

GASPA G., PINTUS M.A., NICOLAZZI E.L., VICARIO D., VALENTINI A., DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Use of principal component approach to predict direct genomic breeding values for beef traits in Italian Simmental cattle*, «Journal of animal science», 91 (1), pp. 29-37

- MANCINI G., GARGANI M., CHILLEMI G., NICOLAZZI E.L., MARSAN P.A., VALENTINI A., AND PARISET L. (2014): *Signatures of Selection in Five Italian Cattle Breeds Detected by a 54K SNP Panel*, «Molecular Biology Reports», 41 (2), pp. 957-65.
- SORBOLINI S., MARRAS G., GASPA G., DIMAURO C., CELLESI M., VALENTINI A., AND MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Detection of selection signatures in piemontese and marchigiana cattle, two breeds with similar production aptitudes but different selection histories*, «Genetics Selection Evolution», DOI 10.1186/s12711-015-0128-2.
- VANRADEN P.M., NULL D.J., SARGOLZAEI M., WIGGANS G.R., TOOKER M.E., COLE J.B., SONSTEGARD T.S., ET AL. (2013): *Genomic Imputation and Evaluation Using High-Density Holstein Genotypes*, «Journal of Dairy Science», 96 (1), pp. 668-78.
- CHESSA S., EZEQUIEL L.N., NICOLOSO L., NEGRINI R., MARINO R., VICARIO D., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., AND STEFANON B. (2015): *Analysis of Candidate SNPs Affecting Milk and Functional Traits in the Dual-Purpose Italian Simmental Cattle*, «Livestock Science», 173 (March), pp. 1-8.
- PINTUS E., SORBOLINI S., ALBERA A., GASPA G., DIMAURO C., STERI R., MARRAS G. AND MACCIOTTA N.P.P. (2014): *Use of locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS) regression to study selection signatures in Piedmontese and Italian Brown cattle breeds*, «Animal Genetics», 45, pp. 1-11.
- CICCONARDI F., CHILLEMI G., TRAMONTANO A., MARCHITELLI C., VALENTINI A., AJMONE-MARSAN P., AND NARDONE A. (2013): *Massive Screening of Copy Number Population-Scale Variation in Bos Taurus Genome*, «BMC Genomics», 14 (1).
- BONGIORNI S., MANCINI G., CHILLEMI G., PARISET L., AND VALENTINI A. (2012): *Identification of a Short Region on Chromosome 6 Affecting Direct Calving Ease in Piedmontese Cattle Breed*, «PLOS ONE», 7 (12).
- SORBOLINI S., GASPA G., STERI R., DIMAURO C., CELLESI M., STELLA A., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Use of Canonical Discriminant Analysis to Study Selection Signatures in Cattle*, Submitted to «PlosOne».
- SORBOLINI S., GRUBER C., DIMAURO C., GASPA G., CELLESI M., VALENTINI A. AND MACCIOTTA N.P.P.: *Genome-wide association analysis for beef traits in Marchigiana cattle breed*, ADSA-ASAS JOINT ANNUAL MEETING 2014 (KANSAS CITY 20-24/07/2014).
- GASPA G., SORBOLINI S., DIMAURO C., CELLESI M., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Genomic Selection of Marchigiana Beef Traits*, ASPA 2015 (MILANO 9-11/06/2015).
- PULEDDA A., GASPA G., DIMAURO C., NICOLAZZI E.L., AJMONE-MARSAN P., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Accuracy of genomic prediction using Principal Component Analysis on an Imputed High Density SNP panel in Italian Holstein cattle*, ADSA 2015 (ORLANDO 9-11/06/2015).
- GASPA G., MARRAS G., SORBOLINI S., AJMONE MARSAN P., WILLIAMS J.L., MACCIOTTA N.P.P.: *Genome-Wide Homozygosity in Italian Holstein Cattle using HD*, SNP Panel 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production

Latte Bovino

Responsabile Scientifico:

Paolo Ajmone Marsan, *Università Cattolica del S. Cuore*

L'Unità di Ricerca (U.R.) latte bovino è stata guidata dall'Università Cattolica del S. Cuore (UNICATT) di Piacenza (responsabile prof. Paolo Ajmone Marsan) che ha coordinato un gruppo di lavoro afferente alle Università di Milano (UNIMI), Udine (UNIUD), Viterbo (UNITUS), Bologna (UNIBO), Brescia (UNIBS), al CNR e al Parco Tecnologico Padano (PTP). Hanno attivamente collaborato alle ricerche i tecnici delle Associazioni Nazionali Allevatori (ANA) delle razze Frisona Italiana (ANAFI), Bruna Italiana (ANARB) e Pezzata Rossa Italiana (ANAPRI). I team che hanno partecipato ai lavori sono descritti in tabella 1.

Nel corso del progetto sono stati assunti diversi giovani ricercatori (tab. 2) che hanno attivamente contribuito alla raccolta, organizzazione e analisi dei dati e che hanno ricevuto un training specifico per la gestione ed elaborazione di "big data" genomici attraverso scuole dedicate (due Innovagen Winter School), periodi trascorsi in laboratori esteri di chiara fama, periodi di scambio di giovani ricercatori all'interno del progetto (tab. 3), creazione di un network stabile e "learnig by doing".

COLLABORAZIONI CON ALTRE U.R. INNOVAGEN

La collaborazione dell'U.R. latte bovino è stata particolarmente stretta con l'U.R. carne bovina (coordinata da A. Valentini, Università della Tuscia), l'U.R. modelli (coordinata da N. Macciotta, Università di Sassari) e l'U.R. malattie (coordinata da J.L. Williams, Parco Tecnologico Padano). La collaborazione ha portato alla pubblicazione di diversi lavori in collaborazione.

ISTITUZIONI	RESPONSABILI SCIENTIFICI	COLLABORATORI
UNICATT	P. Ajmone Marsan	L. Bomba, S. Capomaccio, L. Colli, E. Eufemi, M. Milanese, E. Vajana, L. Poletti, N. Bacciu.
UNITUS	L. Pariset, U. Bernabucci	M. Gargani, C. Gruber, L. Basiricò, P. Morera, F. Tinarelli
UNIBO	L. Fontanesi	
UNIUD	B. Stefanon	D. Guiatti, S. Sgorlon
UNIMI	P. Crepaldi	B. Coizet, S. Frattini, L. Nicoloso, A. Talenti
PTP/CNR	A. Stella	E.L. Nicolazzi, S. Biffani
UNIBS	A. Caroli	O. Bulgari, S. Chessa
ANAFI	J.T. van Kaam	
ANARB	E. Santus	
ANAPRO	D. Vicario	

Tab. 1 *Ricercatori che hanno partecipato all'U.R. INNOVAGEN latte bovino*

PERSONALE	TIPO DI CONTRATTO	PERIODO	LUOGO DI LAVORO
Lorenzo Bomba	Assegno di ricerca	01/11/11-31/10/12	UNICATT
	Assegno di ricerca	01/01/12-31/10/13	
Nicola Bacciu	Cocopro	02/11/11-06/02/12	UNICATT
	Assegno di ricerca	07/02/12-06/02/13	
Omar Bulgari	Cocopro	02/01/12-30/06/12	UNIBS
	Cocopro	01/07/12-31/12/12	
	Occasionale	10/01/13-19/01/13	
Cesare Gruber	Assegno di ricerca	07/02/12-06/02/13	UNITUS
	Assegno di ricerca	01/02/13-31/01/14	
Akram Yazdani	Assegno di ricerca	09/05/12-30/04/13	UNIUD
Letizia Nicoloso	Occasionale	15/03/12-31/03/12	UNIMI
Francesco Tinarelli	Cocopro	01/06/12-30/11/12	UNITUS
Stefano Frattini	Cocopro	01/02/13-31/03/13	UNIMI
	Cocopro	02/04/13-30/06/13	
Luca Poletti	Cocopro	18/03/13-17/09/13	UNICATT

Tab. 2 *Giovani ricercatori assunti nell'ambito del progetto INNOVAGEN. Sono indicati tipo di contratto, periodo di contratto e luogo di lavoro*

COLLABORAZIONI CON PROGETTI ESTERNI

Innovagen latte ha collaborato con diversi progetti esterni, in particolare con il progetto ProZoo (coordinato da J.L. Williams del Parco tecnologico Padano) e con il progetto Elica (coordinato da J.T. van Kaam di ANAFI). I dati prodotti da questi progetti sono stati condivisi con Innovagen per aumentare le numerosità e la potenza dei test statistici utilizzati.

GIOVANE RICERCATORE	LAB DI ORIGINE	LAB VISITATO	MOTIVO DELLA VISITA	REFERENTE NEL LAB. VISITATO
Marco Milanesi	UNICATT	Università di Uppsala, Svezia	Analisi di sequenze	J.C. Rubin
Ana Maria Perez O'Brien	BOKU, Vienna	UNICATT	Analisi di admixture di razze bovine	P. Ajmone Marsan
Lorenzo Bomba	UNICATT	Department of Primary Industries Victoria, Australia	Analisi di sequenze e accesso ai dati del "1000 bull genome project"	B. Hayes
Letizia Nicoloso	UNIMI	UNICATT	Analisi dati genomici	P. Ajmone Marsan
Stefano Frattini	UNIMI	UNICATT	Analisi dati genomici	P. Ajmone Marsan
Omar Bulgari	UNIBS	UNICATT	Analisi dati genomici	P. Ajmone Marsan
Denis Guiatti	UNIUD	UNICATT	Analisi dati genomici	P. Ajmone Marsan

Tab. 3 *Scambi di giovani ricercatori nel corso del progetto INNOVAGEN*

OBIETTIVI GENERALI RAGGIUNTI DALL'U.R. LATTE BOVINO INNOVAGEN

- 1) Ha formato un network di ricercatori e giovani ricercatori in grado di analizzare e interpretare dati genomici complessi, di dare supporto al sistema zootecnico italiano e produrre pubblicazioni scientifiche di alto livello. Da questo punto di vista ha continuato e perfezionato il processo iniziato dal progetto SELMOL.
- 2) Ha prodotto dati genomici che hanno permesso ad ANAFI di entrare nel consorzio internazionale USA-CANADA-UK per la selezione genomica.
- 3) Ha condotto ricerche di alto profilo e prodotto pubblicazioni sulle migliori riviste internazionali di settore e generaliste.
- 4) Ha identificato una serie di mutazioni candidate ad avere un effetto su caratteri complessi (produzione e qualità del latte, morfologia, fertilità) di potenziale utilità per aumentare l'efficacia del miglioramento genetico e il controllo delle anomalie genetiche nelle razze studiate, in particolare nella Frisone Italiana.

OBIETTIVI SPECIFICI *PREVISTI*/RAGGIUNTI

- 1) *il sequenziamento o l'analisi con il pannello di SNP ad alta densità di 800,000 SNP di tori già analizzati in SelMol di particolare rilevanza e incidenza nelle tre razze da latte studiate a la valutazione del contenuto informativo del pannello di 54,000 SNP utilizzato nel progetto SelMol in confronto alle informazioni ottenute.*

Lo sforzo di genotipizzazione ad alta densità è stato concentrato sulla Frisone Italiana per permettere ad ANAFI di entrare a far parte del consorzio internazio-

nale USA-Canada-UK che condivide i dati per la selezione genomica. Un totale di 1009 tori di Frisone Italiana sono stati analizzati con un pannello di 777.000 SNP. Inoltre è stato sequenziato l'esoma (parte del genoma che codifica per proteine) di 20 tori Frisone, 8 Bruni e 8 Pezzati Rossi e il genoma completo di 3 tori Bruni e 3 Pezzati Rossi. Infine sono state genotipizzate con il chip 54K 50 tori Pezzati Rossi e a bassa densità 104 vacche Pezzate Rosse e 100 vacche Brune.

- 2) *lo studio di metodi di imputazione delle informazioni da pannelli meno densi a pannelli a densità più elevata e alla sequenza completa.*

I metodi di imputazione sono stati messi a punto e i risultati pubblicati (Dimauro et al., 2013; Nicolazzi et al., 2013; Milanese et al., 2014)

- 3) *la stima dei valori e dell'accuratezza dei DBV utilizzando i genotipi misurati o imputati a 800,000 SNP in confronto ai DBV ottenuti da SelMol.*

L'utilizzo dei dati 800K (Van Raden et al., 2013) e l'analisi multibreed (Gaspa et al., 2014) non hanno aumentato l'accuratezza delle stime dei DBV. Ma i dati 800K insieme ai dati di sequenziamento dell'esoma hanno permesso di identificare una serie di mutazioni deleterie che possono avere un effetto significativo sulla fertilità della razza Frisone Italiana (Milanesi, 2015).

- 4) *lo studio della struttura genetica delle popolazioni, l'identificazione degli aplotipi più frequenti e del livello di linkage disequilibrium.*

Nella razza Frisone Italiana, l'identificazione degli aplotipi e lo studio della struttura genetica delle popolazioni hanno permesso l'identificazione di 34 aplotipi presenti a elevata frequenza allo stato eterozigote e mai osservati allo stato omozigote (Milanesi, 2015). Questi sono stati classificati come aplotipi deleteri. Dieci di questi contengono mutazioni classificate come deleterie (codoni di stop, delezioni, cambi di aminoacidi che alterano la struttura della proteina) in geni associati a malattie genetiche in uomo o a sterilità o mortalità embrionale nel topo. Nella Bruna Alpina la struttura genetica della popolazione di tori in FA è stata studiata con particolare riferimento al livello di consanguineità (Marras et al., 2015).

- 5) *lo rivedimento delle associazioni genotipo-fenotipo identificate in SelMol e la ricerca di geni candidati nelle regioni significativamente associate.*

Le analisi di associazione genome-wide/GWAS effettuate in Selmol sono state completate (Mancini et al., 2014) e rivisitate utilizzando un numero maggiore di animali, genotipizzati da Innovagen e dai progetti ProZoo e Elica (quasi 3000 nella Frisone Italiana; Capomaccio et al., 2015a), un numero maggiore di marcatori (777.000 al posto di 54.000) e nuove strategie (Capomaccio et al., 2015b). Geni utili sono stati ricercati anche studiando i segnali lasciati nel genoma dai processi di selezione (Bomba et al., 2015; Mancini et al., 2014; Pintus et al., 2014)

- 6) *l'approfondimento delle relazioni tra caratteristiche qualitative del latte e attitudine alla caseificazione alla luce delle nuove tecnologie sia di genotipizzazione che di valutazione dell'attitudine alla coagulazione attraverso il vicino infra rosso (NIR).*

Sono state confermate le associazioni tra alcune varianti delle proteine del latte, produzione e contenuti di grasso e proteina nel latte. L'effetto dell'allele B della K caseina nella razza Bruna, della variante E nella razza Frisona e di diversi alleli della lattoglobulina (LGB) sono particolarmente interessanti. È interessante rilevare che nel caso della LGB gli alleli hanno effetti opposti nella razza Bruna in confronto a Frisona e Pezzata Rossa. Questo suggerisce che LGB non sia direttamente il gene responsabile della risposta produttiva.

L'approfondimento delle relazioni tra le caratteristiche qualitative del latte e la sua attitudine alla caseificazione alla luce delle nuove tecnologie di analisi con InfraRosso a Trasformata di Fourier (FT-IR). Sono stati calcolati degli indici di caseificabilità per i tori padri di 1.055 vacche analizzati. I risultati ottenuti dimostrano che l'attuale indice di selezione della Frisona non influisce particolarmente sulle caratteristiche di coagulazione del latte e che c'è ampio margine di miglioramento, ottenibile utilizzando i dati di caseificabilità registrati mediante tecnica FT-IR.

- 7) *lo studio molecolare delle correlazioni tra caratteri. In particolare verrà approfondita la relazione tra produzione di latte e fertilità;*

Il confronto tra sequenze dell'esoma in 18 tori Frisoni con EBV estremo per fertilità maschile e femminile e zone del genoma di 1000 tori Frisoni analizzati con 777.000 SNP ha permesso l'identificazione di 83 mutazioni deleterie che compaiono con zone del genoma che mancano completamente o hanno un numero di aplotipi omozigoti osservati significativamente minori di quelli attesi. Diverse mutazioni sono in geni associati con la riproduzione, che danno aborti, sterilità o difetti in topi knock-out o che sono associati a difetti genetici nell'uomo.

- 8) *lo studio delle basi molecolari dell'adattamento, con particolare riferimento allo stress da caldo.*

Nuovi polimorfismi sono stati identificati in geni candidati alla risposta allo stress da caldo, tra questi una mutazione nel gene HSP70.1 è associata all'indice di selezione PFT nella razza Frisona

PIANO DI LAVORO PREVISTO

Il lavoro previsto da INNOVAGEN è stato organizzato in 5 Work Packages (WPs).

WP	WP titolo	Attività e metodi	Risultati	Indicatori di verifica
WP1	Identificazione, risequenziamento e analisi SNP ad alta densità dei tori fondatori	Analisi pedigree e dati SelMol; campionamento estrazione di DNA, sequenziamento e genotipizzazione in outsourcing	Sequenziamento 6X di 15 riproduttori e genotipizzazione ad alta densità di 150 riproduttori	Dati di sequenza e genotipi nel database
WP2	Studio della struttura genetica delle tre principali razze da latte italiane. Imputazione e stime DBV	Analisi di LD; identificazione aplotipi, verifica stima indiretta di genotipi a geni candidati analizzati in SelMol. Metodi di imputazione dei genotipi e della sequenza completa	Elenco aplotipi più frequenti, metodo indiretto di stima genotipi a geni candidati. Genotipi ad alta densità (imputati) su tutti i riproduttori SelMol, Miglioramento delle stime DBV per la selezione genomica	Protocollo per stima aplotipi. Protocollo per imputazione e pubblicazioni
WP3	Associazioni fenotipo genotipo e correlazioni genetiche tra caratteri	Genotipizzazione; metodi Bayesiani e parametrici di associazione; analisi bioinformatiche	Associazioni genotipo-fenotipo, geni candidati per posizione e funzione, regioni cromosomiche che spiegano le correlazioni tra caratteri	Report, pubblicazioni
WP4	Validazione geni candidati e studio associazione tra aplotipi caseinici e attitudine alla coagulazione latte	Genotipizzazione; metodi Bayesiani e parametrici di associazione; calcolo EBV	Associazioni aplotipo-EBV/fenotipo, stime effetti di sostituzione allelica, parametri genetici ed EBV attitudine alla coagulazione	Report, pubblicazioni
WP5	Validazione e ricerca di marcatori associati a stress da caldo	Genotipizzazione; rilevazioni fenotipiche; test in vitro; metodi Bayesiani e parametrici di associazione	Associazioni genotipo-fenotipo, identificazione geni e marcatori associati a stress da caldo	Report, pubblicazioni

Tab. 4 *Piano di lavoro INNOVAGEN e indicatori di verifica dei risultati*

La tabella 4 presentata al momento della proposta di progetto, descrive sinteticamente le attività previste nei diversi WP e le strategie di verifica dei risultati. Di seguito sono descritti il piano sperimentale seguito e i risultati raggiunti in ogni WP

WP1: IDENTIFICAZIONE, RI-SEQUENZIAMENTO E ANALISI SNP AD ALTA DENSITÀ DI TORI DI PARTICOLARE RILEVANZA E INCIDENZA NELLE TRE RAZZE DA LATTE STUDIALE.

Le decisioni su quali animali analizzare prioritariamente sono state prese in accordo con ANAFI, ANARB e ANAPRI.

In particolare in Bruna Italiana e Pezzata Rossa sono stati identificati 11 fondatori non imparentati per pedigree e con parentela genomica minima che hanno contribuito in modo maggiore alla genetica della popolazione attuale. Tre di questi sono stati sequenziati in modo completo a una profondità 10X. L'esoma dei restanti 8 è stato sequenziato a una profondità 50X.

In Frisona Italiana sono stati scelti 1009 tori in FA. Questi sono stati genotipizzati ad alta densità con l'Array HD Illumina (777.000 marcatori). Questi dati, oltre alle analisi svolte in INNOVAGEN, hanno garantito ad ANAFI l'accesso al consorzio internazionale USA-CD-UK.

Sempre in Frisona Italiana sono stati scelti 20 tori in FA nelle code della distribuzione degli EBV per fertilità maschile e femminile. L'esoma (la parte del genoma che codifica per proteine) di questi è stato sequenziato a una profondità 50X.

WP2: STUDIO DELLA STRUTTURA GENETICA DELLE RAZZE DA LATTE ITALIANE E VERIFICA DI METODI DI IMPUTAZIONE DEI GENOTIPI DA PANNELLI A BASSA E MEDIA DENSITÀ AD ALTA DENSITÀ E SEQUENZE COMPLETE (IN COLLABORAZIONE CON U.O. MODELLI CHE VALUTERÀ ANCHE IL GUADAGNO IN ACCURATEZZA DEI DBV STIMATI CON I GENOTIPI IMPUTATI AD ALTA DENSITÀ RISPETTO AI GENOTIPI OTTENUTI CON IL PANNELLO DI 54,000 SNP).

Struttura genetica delle razze

La conoscenza della struttura genetica delle razze è importante per comprendere quale sia il numero ottimale di marcatori per poter imputare i genotipi da una densità minore a una maggiore e per la stima dell'inbreeding.

Nel lavoro di Capomaccio et al. (2015a) e nel lavoro di Bomba et al. (2015) si evidenzia che la razza Pezzata Rossa presenta un livello di *Linkage Disequilibrium* (LD) minore rispetto alla razza Frisona e alla razza Bruna. Questo fenomeno può essere spiegato dalla diversa gestione genetica della razza, che favorisce l'utilizzo di giovani tori e limita il numero di dosi di seme raccolte da ogni riproduttore e dalla minore intensità di selezione cui è sottoposta per caratteri specifici, essendo la razza Pezzata Rossa a duplice attitudine.

Nel lavoro di Marras et al. (2014) le razze Frisona, Bruna e Pezzata Rossa sono state analizzate per individuare zone del genoma fissate (*run of homozygosity* – ROH). La razza Pezzata rossa presenta molte zone con ROH

corte, segnale di una consanguineità antica. Mentre le razze Frisona e Bruna presentano ROH molto più lunghe, segno di inbreeding recente. Le ROH sono state utilizzate per calcolare un coefficiente di inbreeding genomico, da confrontare con quello calcolato utilizzando le informazioni di pedigree e la matrice di parentela genomica. Si è testata la correlazione tra queste tre misure e utilizzando ROH lunghe i risultati sono migliori rispetto a quelli ottenuti con ROH corte. Dalle analisi effettuate si comprende che i pannelli a media densità (50k) possono dare una buona stima dell'inbreeding in razze come la Frisona o la Bruna ma non in razze con ROH corte come la Pezzata Rossa, dove una maggiore densità degli SNP è richiesta.

Metodi d'imputazione

Obiettivo di questo task era di valutare nuove strategie e testare quelle esistenti per ottenere, senza incrementi di costi, genotipi ad alta densità da genotipi a bassa densità attraverso metodi di imputazione.

Nel lavoro di Nicolazzi et al. (2013) un nuovo metodo di imputazione, PedImpute, è stato creato e messo a disposizione delle associazioni degli allevatori (ANAPRI e ANARB) per l'utilizzo nelle loro routine.

Nel lavoro di Dimauro et al. (2013) è stato utilizzato il metodo della “*partial least squared regression*” (PLSR) in confronto con il software Beagle nelle tre razze da latte oggetto di studio di questa unità. È stata inoltre testata la possibilità di utilizzare un approccio multi razza per aumentare l'accuratezza dell'imputazione. Nell'approccio singola razza PLSR ha ottenuto un'accuratezza di imputazione migliore ed è risultato più veloce rispetto a Beagle. L'utilizzo o meno dell'informazione di pedigree non ha influenzato i risultati ottenuti con il metodo PLSR. L'applicazione invece dell'approccio multi razza non ha portato a miglioramenti dell'accuratezza. Utilizzando quindi il nuovo approccio proposto da Dimauro e colleghi la bontà dell'imputazione migliore riducendo i tempi di imputazione.

Nel lavoro di Milanesi et al. (2014) è stato valutato l'impatto della sequenza di riferimento sull'accuratezza di imputazione. Per fare ciò sono stati analizzati i genotipi di tori di razza Pezzata Rossa con quattro diversi software d'imputazione (Pedimpute, Findhap, Fimpute e Beagle). Nel confronto intra-metodo il cambio di sequenza di riferimento porta solo a piccole variazioni nell'accuratezza, non sufficienti a definire una sequenza di riferimento migliore delle altre. In compenso le differenze tra i diversi metodi sono apprezzabili. Diventa quindi importante conoscere il tipo di

dato che si sta analizzando per poter scegliere la strategia (software) più adatto.

Valori genomici dei riproduttori stimati con pannelli di marcatori ad alta densità

Nel lavoro di VanRaden et al. (2013) i genotipi HD di Frisone prodotti all'interno di questo progetto sono stati utilizzati per valutare il possibile incremento in accuratezza della valutazione genomica. L'incremento medio di attendibilità nell'uso del pannello 800K rispetto all'uso del pannello 50k è dello 0.4% (inferiore rispetto all'atteso 0.9% ottenuto con dati simulati), passando da 60.7% a 61.1%. Per la selezione genomica nella razza Frisone sembra quindi sufficiente, e più economico, l'uso del pannello 50K.

Nel lavoro di Gaspa et al. (2014) è stata valutata la possibilità di aumentare l'accuratezza della valutazione genomica utilizzando un approccio multi razza. In questo caso tutte e tre le razze oggetto di studio sono state valutate utilizzando i genotipi 54k. Il valore genomico è stato calcolato utilizzando il metodo delle componenti principali (PC) e lo SNPBLUP come confronto. L'utilizzo dell'approccio multi-razza aumenta di poco l'accuratezza rispetto all'uso della singola razza. I risultati ottenuti sono stati variabili nelle diverse razze e per i diversi fenotipi analizzati. Questa "instabilità dei risultati è probabilmente dovuta a differenze nella struttura delle razze (ad es nei valori di LD) nella diversa numerosità delle popolazioni di riferimento.

WP3: RIVISITAZIONE DELLE ASSOCIAZIONI GENOTIPO-FENOTIPO
E DELLE CORRELAZIONI GENETICHE TRA CARATTERI TROVATE IN SELMOL
E RICERCA DI GENI CANDIDATI.

Obiettivo del WP è quello di trovare nuovi approcci e nuovi segnali nel genoma legati alla selezione, sia dal punto di vista generale che dal punto di vista fenotipo-specifico.

GWAS 54K e 800K con Mugbas

Nuove strategie e nuovi metodi sono stati testati e implementati al fine di ottenere risultati biologicamente più attendibili dalle associazioni genotipo-fenotipo.

Il lavoro di Capomaccio et al. (2015b) presenta un adattamento del software VEGAS, utilizzabile solo per dati umani, a tutte le specie: MUGBAS, *Multi species Gene-Based Association Suite*. Il software utilizza i risultati prodotti da un'analisi GWA a singolo marcatore (p -value per SNP) e li combina, tenendo conto della struttura del linkage disequilibrium, per ottenere un valore di associazione (gene-wise p -value) tra il fenotipo di interesse e l'unità funzionale.

Con unità funzionale non si intende solo il gene ma una qualsiasi regione genomica di interesse per l'utente.

Il metodo è stato applicato nel lavoro di Capomaccio et al. (2015a) dove le tre razze in esame sono state analizzate per l'associazione con la produzione di latte e caratteristiche qualitative (proteine e grasso). Il nuovo approccio ha permesso, rispetto alla GWAS a singolo marcatore, l'individuazione di nuovi e interessanti segnali associati ai fenotipi analizzati. In particolare, sono stati individuati - in tutte le razze - geni e *pathway* coerenti con i caratteri produttivi legati al sistema immunitario, alla qualità del latte e allo sviluppo della ghiandola mammaria.

Interessante è anche l'approccio utilizzato nel dataset Frisona: l'analisi è stata effettuata anche rimuovendo l'effetto del gene *DGATI* (gene conosciuto per aver il suo effetto sulla produzione di grasso e di latte) permettendo la valorizzazione di segnali più deboli.

Sono in via di pubblicazione le analisi dei dati ad alta densità della razza Frisona utilizzando la questa strategia gene-based.

Selection signatures

Diversi metodi e approcci sono stati testati per poter individuare i segnali della selezione nel genoma.

Pintus et al. (2013) e Mancini et al. (2014) usando l'indice di fissazione (F_{st}) che cerca di individuare, nei confronti a coppie di due razze, regioni che hanno segnali opposti.

Pintus et al. (2013) hanno analizzato i genotipi di razza Bruna con la razza Piemontese con un metodo che prevede l'uso della regressione LOWESS e di grafici di controllo. Con questo approccio combinato i segnali ottenuti risultano chiari e collegabili alla risposta immunitaria, alla riproduzione, alla produzione di carne e quella lattifera.

Mancini et al. (2014) hanno utilizzato i genotipi di cinque razze bovine italiane (Frisona, Bruna, Pezzata Rossa, Piemontese e Marchigiana) per individuare i segnali della selezione utilizzando l' F_{st} . I segnali più forti sono stati

individuati nei cromosomi 6 e 13, dove sono presenti geni candidati quali ABCG2 e KIT per il gruppo delle razze da latte e NCAPG e LCORL per il gruppo delle razze da carne.

Il lavoro di Bomba et al (2015) utilizza un dataset simile a Mancini et al. (2014) ma con un approccio diverso: relative extended haplotype homozygosity (rEHH): l'obiettivo è la ricerca di zone di genoma (aplotipi) con alto LD e alta frequenza, indice di selezione recente. L'analisi è stata svolta una razza alla volta ma successivamente i risultati sono stati combinati tra razze con la stessa attitudine produttiva (carne: Marchigiana, Piemontese e Pezzata Rossa; latte: Frisona, Bruna e Pezzata Rossa) per individuare i segnali comuni. L'approccio multi-razza è stato in grado di individuare segnali in regioni, e quindi geni, nuovi. Nel gruppo "latte" si sono individuati segnali collegati al cambio della razione (aumento dell'ingestione di amido e necessità di digestione nell'intestino).

Un nuovo approccio è in corso di studio, basato sull'analisi dei cambiamenti nelle frequenze alleliche nel tempo in riproduttori Frisoni (Talent et al., 2015).

I nuovi approcci proposti sono risultati efficaci nell'individuazione dei segnali della selezione nel genoma. Sono in corso nuovi studi su genotipi ad alta densità.

Esomi

All'interno del progetto sono state prodotte sequenze complete (WGS) e sequenze dell'esoma (WES) delle tre razze di interesse.

Le 20 sequenze dell'esoma di razza Frisona sono state utilizzate, in associazione con i genotipi ad alta densità, per la ricerca di aplotipi (zone del genoma) e varianti considerate deleterie.

L'obiettivo è l'individuazione di segnali collegabili alla riduzione di fertilità della razza, che non può essere dovuta solo all'aumento di produzione avvenuto negli ultimi anni.

L'analisi ha portato all'individuazione di 61 possibili aplotipi e 83 possibili varianti deleterie. Successivi approfondimenti hanno individuato alcune varianti che mappano in geni che, in uomo o topo, risultano essere correlati alla riproduzione o a difetti genetici.

La metodica utilizzata potrà essere applicata in futuro su altre razze o sempre sulla frisona ma utilizzando altri tipi di varianti (es varianti strutturali, CNV, ecc...)

WP4: VALIDAZIONE DELLE ASSOCIAZIONI TRA GENI CANDIDATI
E CARATTERI IDENTIFICATE IN SELMOL E APPROFONDIMENTO
DELLE ASSOCIAZIONI TRA ALOTIPI CASEINICI E ATTITUDINE
ALLA CASEIFICAZIONE DEL LATTE. (RESPONSABILITÀ UNIBS)

Geni candidati e produzioni

Le associazioni tra geni candidati, alotipi caseinici ed EBV identificate nel progetto Selmol sono state validate, al fine di confermare le associazioni e meglio stimare gli effetti di sostituzione allelica, necessari per valutare il loro utilizzo negli schemi di selezione. Scopo dello studio era quello di confrontare la struttura lattoproteica e l'effetto dei polimorfismi genetici sulle caratteristiche produttive di tre razze, Frisona italiana (FI), Bruna italiana (BI) e Pezzata rossa italiana (PRI). Sono stati selezionati oltre 450 tori provati in ogni razza. Le quattro caseine (α S1-CN, β -CN, α S2-CN e κ -CN) e le due proteine del siero di latte, α -lattoalbumina (α -LA) e β -lattoglobulina (β -LG), sono state genotipizzate a livello di DNA a livello dei geni corrispondenti (*CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2*, *CSN3*, *LGB*, *LALBA*) mediante la genotipizzazione di SNP. Un totale di 11 SNP sono stati considerati permettendo di identificare le principali varianti genetiche proteiche o gruppi di varianti, nonché alcuni polimorfismi all'interno delle sequenze non codificanti.

Le associazioni tra ogni SNP e gli indici genetici (EBV) per latte, kg di proteina e di grasso e proteina percentuale sono state valutate all'interno di ogni razza. L'importanza di considerare i polimorfismi lattoproteici nel miglioramento genetico è confermata. Tuttavia, la tendenza divergente della maggior parte degli effetti tra razze suggerisce che gli SNP responsabili delle varianti genetiche classiche agiscano come marcatori genetici dei QTL che interessano direttamente le caratteristiche di produzione del latte. Tra le varianti genetiche classiche, *CSN3*B* mantiene una posizione di rilievo a causa dei suoi effetti costanti e favorevoli in tutte le razze sulla componente proteica.

Attitudine alla trasformazione casearia

Data l'importanza economica dell'attitudine del latte alla trasformazione casearia, uno degli obiettivi dell'Unità di ricerca Latte bovino è stato l'approfondimento delle relazioni tra le caratteristiche qualitative del latte e la sua attitudine alla caseificazione alla luce delle nuove tecnologie di analisi. Per far questo è stato analizzato il latte di 1.055 vacche di razza Frisona, figlie di

SNP	SNP / VARIANTE PROTEICA	BI	FI	PRI
CSN1S1_10175	Promotore A vs C	PP (-0.07)		
CSN1S1_26181	Variante B vs C	PP (-0.04)		
CSN2_8101	A ² (I) vs A ¹ (B, C)		MY (-135.6)	
			PY (-4.75)	
CSN2_8178	Variante I vs non-I	Nt	PY (+22.57)	Nt
		Nt	PP (-0.04)	Nt
CSN3_13068	Variante B vs non-B	MY(+151.24)		
		FY(+5.71)		
		PY(+6.35)		PY (+2.92)
			PP (+0.03)	PP (+0.02)
CSN3_13124	Variante E vs non-E	Nt	MY (-257.84)	Nt
		Nt	FY (-13.22)	Nt
LGB_1740	Promotore G vs C	MY (-126.27)	MY (+92.02)	
		FY (-6.49)		
			PY (+4.57)	PY (+2.90)
		PP (+0.02)	PP (+0.02)	
LGB_3982	Variante A vs B	MY (-145.2)	MY (+97.16)	MY (+62.3)
		FY (-7.32)	FY (+2.51)	
		PY (-4.04)	PY (+4.77)	PY (+2.92)
		PP (+0.02)	PP (+0.02)	
LGB_5261	Variante A vs B	MY (-172.98)	MY (+97.07)	MY (+84.06)
		FY (-8.28)		
		PY (-4.92)	PY (+4.77)	PY (+3.55)
		PP (+0.02)	PP (+0.02)	

Tab. 1 Effetti significativi ($P < 0.05$) degli SNP analizzati nelle 3 razze sugli indici genetici per kg di latte (MY, kg), kg di grasso (FY, kg), kg di proteina (PY, kg) e percentuale di proteina (PP, %). I nomi delle varianti considerate o dei gruppi di varianti sono indicati tra parentesi. nt = polimorfismo non tipizzato

51 tori, allevate in 16 aziende della provincia di Brescia. Anziché utilizzare le vecchie tecniche lattodinamografiche, che richiedono un apposito prelievo di latte e consentono l'analisi di un numero ridotto di campioni alla volta, il latte è stato analizzato mediante spettroscopia **InfraRosso** a **Trasformata di Fourier**, abbreviato in **FT-IR**. Sono state analizzate varianze, ereditabilità e correlazioni dei parametri lattodinamografici registrati mediante l'uso di questa tecnica, sono stati calcolati degli indici di caseificabilità per i tori padri delle 1.055 vacche ed è stato verificato anche l'effetto degli aplotipi caseinici

e delle varianti A e B di beta-lattoglobulina sulle caratteristiche di coagulazione. I risultati ottenuti dimostrano che l'attuale indice di selezione della Frisone non influisce particolarmente sulle caratteristiche di coagulazione del latte e che c'è ampio margine di miglioramento, ottenibile utilizzando i dati di caseificabilità registrati mediante tecnica **FT-IR**. A differenza della classica lattodinamografia con la tecnica **FT-IR** è inoltre possibile individuare lattini a coagulazione lenta o non coagulabili. Inoltre per quanto gran parte dell'effetto delle varianti lattoproteiche sulle caratteristiche di coagulazione del latte venga già catturato nella stima degli indici di caseificabilità, sia la beta-lattoglobulina, sia alcuni specifici aplotipi caseinici hanno un ulteriore effetto sui parametri di coagulazione così misurati e dati i costi ridotti per la genotipizzazione si ritiene utile considerare anche questa informazione per migliorare l'attitudine alla trasformazione casearia del latte.

FT-IR

In termini semplici questa tecnica consiste nel colpire con raggi infrarossi una molecola che risponderà riflettendo, assorbendo o trasmettendo (si lascia attraversare) tali raggi e registrare la risposta della molecola in un grafico o spettro. Ogni molecola risponde diversamente in funzione della sua struttura e dei suoi legami chimici, perciò il latte di ogni singola bovina, avendo una sua composizione specifica in proteine, grassi e lattosio, produce uno spettro diverso. Facendo uno studio di associazione fra gli spettri e i risultati delle normali tecniche lattodinamografiche di 250 campioni di latte è stato possibile costruire una curva di calibrazione che è stata poi usata per predire i parametri lattodinamografici dei 1.055 campioni di latte semplicemente dall'analisi degli spettri, senza bisogno di utilizzare la tecnica lattodinamografica. Il Comitato internazionale per la registrazione degli animali (ICAR) nel 2012 ha approvato l'utilizzo della tecnica FT-IR come metodo di routine per l'analisi di grasso, proteine e lattosio del latte, pertanto si possono utilizzare gli stessi spettri del controllo funzionale.

Contenuto naturale di vitamina D in campioni individuali di latte bovino

A corollario del lavoro svolto dall'WP4, è stata condotta un'indagine sul contenuto naturale di vitamina D in campioni individuali di latte di bovine di razza Frisone italiana (campioni prelevati per lo studio sull'attitudine alla trasformazione casearia). È stata osservata un'interessante

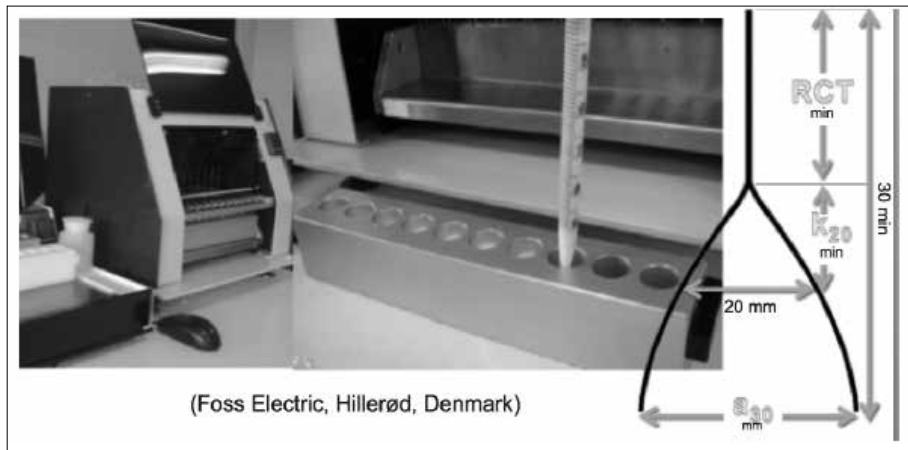


Fig. 1 Analisi dei parametri di coagulazione del latte mediante tecnica lattodinamografica

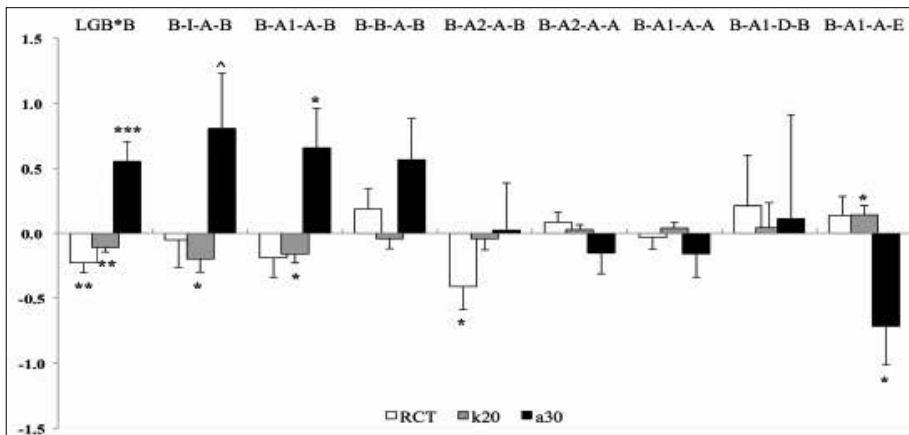


Fig. 2 Effetto della variante B di beta-lattoglobulina (LGB*B) e degli aptotipi caseinici sui parametri di coagulazione del latte (RCT e K_{20} sono più favorevoli tanto più assumono valore negativo e a_{30} è tanto più favorevole quanto più assume valore positivo). Si nota l'effetto significativo e favorevole della variante B di beta-lattoglobulina e della kappa-caseina B su a_{30} e k_{20} quando associato con beta-caseina I o A_1 rispetto a quando associato con beta-caseina A_2 . Quest'ultimo effetto favorevole si perde in presenza della variante D di alfas2-caseina.

variabilità del contenuto in vitamina D. Il genotipo di beta-LG sembra influenzare il contenuto in vitamina D (AA > AB e BB). Questa siero proteina è implicata nel trasporto di molecole idrofobiche come la vitamina D; inoltre la variante A è correlata a una maggiore espressione di beta-LG rispetto alla variante B.

SNPs	Numero degli Animali			Frequenza genotipica (%)			Frequenza allelica (%)	
HSP 70 A1A 5'UTR -/C	/--	C:-	C:C	/--	C:-	C:C	/-	C
	26	203	346	4.50	35.30	60.20	22.20	77.80
HSP 70 A1A 5'UTR G/T	G:G	T:G	T:T	G:G	T:G	T:T	G	T
	283	275	13	49.30	47.90	2.80	73.30	26.70

Tab. 1 *Frequenza allelica e genotipica dei 600 tori di razza frisona del gene HSP70 A1A per i polimorfismi g115 C/- e g348 G/T nella regione 5'UTR.*

SNPs	Numero degli Animali			Frequenza genotipica (%)			Frequenza allelica (%)	
HSP 70 A1A 5'UTR -/C	/--	C:-	C:C	/--	C:-	C:C	/-	C
	25	122	146	8.53	41.64	49.83	29.35	70.65
HSP 70 A1A 5'UTR G/T	G:G	T:G	T:T	G:G	T:G	T:T	G	T
	115	128	13	44.92	50.00	5.08	69.92	30.08

Tab. 2 *Frequenza allelica e frequenza genotipica del gene HSP70 A1A per i polimorfismi g115 C/- e g348 G/T nella regione 5'UTR di vacche da latte di razza Frisona*

WP5: RICERCA E VALIDAZIONE IN CAMPO DI MARKER DI MARCATORI GENETICI DI TERMO-TOLLERANZA IN CONDIZIONI DI STRESS DA CALDO

È stato estratto il DNA dai campioni, dopo l'estrazione il DNA purificato è stato quantificato con il Picogreen dsDNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e inviato alla KBioscience per la genotipizzazione. In tabella 1 sono riportate la frequenza allelica e la frequenza genotipica degli SNP identificati.

Dall'analisi di associazione tra HSP70-A1A ed EBV dei tori genotipizzati, condotta in collaborazione con il prof. Macciotta dell'unità di Sassari, è emerso che i tori che presentano il polimorfismo del gene HSP70 A1A, g115 C/- nella regione 5'UTR hanno mostrato valori più elevati per il PFT (Produzione, Funzionalità e Tipo), e migliori per conformazione e statura. Il risultato è di interesse poiché conferma quanto era stato evidenziato in un precedente studio in vitro (Basiricò et al., 2011) in cui questo SNP era associato a una migliore termo-tolleranza cellulare al caldo.

Per la validazione in vivo dell'associazione di alleli del gene HSP70 A1A, per i polimorfismi g115 C/- e g348 G/T nella regione 5'UTR, e la risposta al caldo sono state inoltre genotipizzate 318 vacche di razza Frisona (tab. 2).

SNPs	L/capo/d	Grasso, %	Proteine, %	Giorni Lattazione	SCS
-/-	35.8 A	3.64	3.38	185	3.15
C/-	35.1 B	3.61	3.42	190	3.11
C/C	34.4 C	3.61	3.4	198	3.09

SCS: Somatic cell score = $[\log_2(\text{CS}/100000)+3]$

A,B,C $P<0.01$

Tab. 3 *Dati della produzione di latte e della qualità del latte (grasso, proteine, cellule somatiche) in relazione ai polimorfismi di vacche da latte di razza Frisone*

SNPs	Numero degli Animali			Frequenza genotipica (%)			Frequenza allelica (%)	
HSP 70 A1A codR G/A	G:G 283	G:A 0	A:A 0	G:G 100.00	G:A 0.00	A:A 0.00	G 100.00	A 0.00
HSP 70 A1A 3'UTR T/C	C:C 40	C:T 87	T:T 114	C:C 16.60	C:T 36.10	T:T 47.30	T 65.80	C 34.65
HSP 70 A1A 3'UTR C/T	C:C 130	T:C 130	T:T 26	C:C 45.45	T:C 45.45	T:T 9.09	C 68.17	T 31.81
HSP 90 AB1 i3 T/C	C:C 97	C:T 145	T:T 47	C:C 33.56	C:T 50.17	T:T 16.26	T 41.34	C 58.60
HSF 1 i3 T/C	C:C 19	C:T 122	T:T 151	C:C 6.51	C:T 41.78	T:T 51.71	C 27.40	T 72.60
HSF 1 3'UTR G/T	G:G 152	T:G 126	T:T 15	G:G 51.88	T:G 43.00	T:T 5.12	G 73.38	T 26.62

Tab. 4 *Frequenza allelica e frequenza genotipica del gene HSP70 A1A g1524G/A nella regione codificante e g3494T/C, g6600C/T nella regione 3'UTR; del gene HSP90AB1, g4338T/C nell'introne 9; del gene HSF1, g909T/C nell'introne 3 e g4693G/T nella regione 3'UTR di vacche da latte di razza Frisone*

Gli animali sono stati seguiti per almeno tre lattazioni e sono stati raccolti i dati fenotipici e genealogici. I dati raccolti hanno riguardato la produzione di latte (produzione giornaliera e curva di lattazione), qualità del latte (grasso, proteine, conducibilità elettrica, cellule somatiche), parametri riproduttivi, incidenza di malattie e dismetabolie, indici genetici e genealogia della bovina.

L'analisi statistica eseguita per verificare l'associazione tra polimorfismi di interesse e i dati fenotipici raccolti ha di nuovo confermato una associazione positiva tra il genotipo C/- e -/- con la produzione di latte durante il periodo caldo. In particolare gli animali che presentano la delezione hanno una maggiore produzione di latte a parità di contenuti di grasso, proteine e cellule somatiche (tab. 3).

Azione 5.2: L'azione prevedeva di individuare e genotipizzare 1000 bovine per genotipizzate per altri geni che codificano proteine heat shock. L'azienda scelta per la raccolta dei campioni è stata l'azienda "Bruni" (Nepi, Viterbo). Sono state selezionate 318 vacche di razza Frisona, le stesse utilizzate per l'azione 5.1 in lattazione. Il numero di soggetti è risultato inferiore a quello previsto (1000) poiché per limitare l'effetto di fattori ambientali si è deciso di operare in una unica azienda.

Gli animali sono stati genotipizzati per i polimorfismi del gene HSP70 A1A g1524G/A nella regione codificante e g3494T/C, g6600C/T nella regione 3'UTR; un SNP del gene HSP90AB1, g4338T/C nell'introne 9; due SNPs nel gene HSF1, g909T/C nell'introne 3 e g4693G/T nella regione 3'UTR, associati alla termo-tolleranza (tab. 4).

È stata condotta un'analisi trascrittomica su mRNA estratto da cellule mononucleate isolate da sangue periferico di vacche con genotipo diverso al gene HSP70 A1A, g115 C/- e g348 G/T nella regione 5'UTR e sottoposte a test in vitro per valutare la relazione tra genotipo e risposta a stress da caldo. Quest'ultima attività è stata svolta in collaborazione con il prof. R. J. Collier del Department of Animal Science della University of Arizona-Tucson, USA. L'RNA è stato ottenuto da una prova in vitro su PBMC isolate da bovine con genotipi diversi per l'HSP70 A1A e stressate a 43°C per 1 ora. L'RNA è stato poi inviato in Arizona dove è stata valutata l'espressione genica tramite l'utilizzo di microarray.

SCUOLE INNOVAGEN

Al fine di istruire i giovani ricercatori nelle moderne tecniche di analisi di dati genetici, genomici e dei modelli statistici, Innovagen organizza due corsi di statistica applicata alle analisi molecolari.

– First INNOVAGEN Winter School [21/01-01/02 2013 - Piacenza]

La prima Winter School INNOVAGEN aveva come obiettivo quello di insegnare l'utilizzo del linguaggio di programmazione "R", dare le basi statistiche per l'analisi dei modelli misti e introdurre la statistica bayesiana. Il cor-

so ha alternato lezioni teoriche e pratiche; inoltre ha previsto la discussione critica di articoli scientifici. Il corso è stato propedeutico alla seconda Winter School Innovagen.

Alla scuola hanno partecipato una sessantina di giovani ricercatori, molti dei quali coinvolti nelle diverse unità INNOVAGEN.

- Second INNOVAGEN Winter School [18-22/03 2013 - Piacenza]: Course lectures Dr. B. Hayes from AgriBio (Melbourne)

Durante il corso sono stati trattati diversi metodi per l'utilizzo dei dati SNP e di sequenziamento nei programmi di miglioramento genetico delle specie animali di interesse zootecnico. Il corso ha affrontato i temi del linkage disequilibrium, della GWAS e della valutazione genomica. Alla scuola hanno partecipato una cinquantina di giovani ricercatori.

PUBBLICAZIONI DELL'U.R. LATTE INNOVAGEN

1. BERNABUCCI U., BASIRICÒ L., MORERA P., TINARELLI F. (2013): *Polymorphisms in HSP70A1A, HSP90AB1 and HSF1 genes associated with heat tolerance in Italian Holstein cows*, «Italian J. Animal Sci.», 12-s1, p. 63.
2. BOMBA L., EZEQUIEL L., NICOLAZZI, MILANESI M., NEGRINI R., MANCINI G., BISCARINI F., STELLA A., VALENTINI A. AND AJMONE-MARSAN P. (2015): *Relative extended haplotype homozygosity signals across breeds reveal dairy and beef specific signatures of selection*, «Genetics Selection Evolution», 47, p. 25.
3. BULGARI O., CAROLI A.M., CHESSA S., RIZZI R., AND GIGLIOTTI C. (2013): *Variation of Vitamin D in Cow's Milk and Interaction with β -Lactoglobulin*, «Molecules», 18, pp. 10122–10131.
4. CAPOMACCIO S., MILANESI M., BOMBA L., CAPPELLI K., NICOLAZZI E.L., WILLIAMS J.L., AJMONE-MARSAN P., STEFANON B. (2015a): *Searching new signals for production traits through gene-based association analysis in three Italian cattle breeds*, «Anim Genet.», May 22. doi: 10.1111/age.12303. [Epub ahead of print]
5. CAPOMACCIO S., MILANESI M., BOMBA L., VAJANA E., AJMONE-MARSAN P. (2015b): *MUGBAS: a species free gene-based programme suite for post-GWAS analysis*, «Bioinformatics», Mar 11. pii: btv144. [Epub ahead of print]
6. CAROLI A.M., CHESSA S., BULGARI O., IACOPONI F., PARISSET L. (2013): *Effects of milk protein polymorphisms on milk traits: an across-breed study*, «Italian Journal of Animal Science», 12 (1), p. 66.
7. CHESSA S., BULGARI O., CHESSA S., RIZZI R., CALAMARI L., CAROLI A.M. (2013): *Genetic analysis of milk clotting aptitude in the Italian Holstein-Friesian*, «Italian Journal of Animal Science», 12 (1), p. 38.
8. CHESSA S., BULGARI O., ROSSONI A., CERIOTTI G., CAROLI A.M. (2013): *Bovine β -casein: detection of two single nucleotide polymorphisms by bidirectional allele specific polymerase chain reaction (BAS-PCR) and monitoring of their variation*, «Open Journal of Animal Science», 3, pp. 36–41.

9. CHessa S., BULGARI O., RIZZI R., CALAMARI L., BANI P., BIFFANI S., AND CAROLI A.M. (2014): *Selection for milk coagulation properties predicted by Fourier transform infrared spectroscopy in the Italian Holstein-Friesian breed*, «J. Dairy Sci.», 97, pp. 4512-4521.
10. CICCOnARDI F., CHILLEMI G., TRAMONTANO A., MARCHITELLI C., VALENTINI A., AJMONE-MARSAN P., NARDONE A. (2013): *Massive screening of copy number population-scale variation in Bos taurus genome*, «BMC Genomics», 14 (1), art. no. 124.
11. DIMAURO C., CELLESI M., GASPA G., AJMONE-MARSAN P., STERI R., MARRAS G., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Use of partial least squares regression to impute SNP genotypes in Italian Cattle breeds*, «Genetics Selection Evolution», 45 (1), art. no. 15.
12. FONTANESI L., CALÒ D.G., GALIMBERTI G., NEGRINI R., MARINO R., NARDONE A., AJMONE-MARSAN P., RUSSO V. (2014): *A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle*, «Anim Genet.», Aug; 45 (4), pp. 576-80.
13. GASPA G., JORJANI H., DIMAURO C., CELLESI M., AJMONE-MARSAN P., STELLA A. AND MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Multiple-breed genomic evaluation by principal component analysis in small size populations*, «Animal» 9, pp. 738-749.
14. MANCINI G., GARGANI M., CHILLEMI G., NICOLAZZI E.L., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., AND PARISSET L. (2014): *Signatures of selection in five Italian cattle breeds detected by a 54K SNP panel*, «Mol. Biol. Rep.», 41, pp. 957-965.
15. MANCINI G., NICOLAZZI E.L., VALENTINI A., CHILLEMI G., AJMONE MARSAN P., SANTUS E., AND PARISSET L. (2013): *Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and milk production traits in Italian Brown cattle*, «Livest. Sci.», 157, pp. 93-99.
16. MARRAS G., GASPA G., SORBOLINI S., DIMAURO C., AJMONE-MARSAN P., VALENTINI A., WILLIAMS J.L., MACCIOTTA N.P. (2015): *Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy*, «Anim Genet.», 46, pp. 110-121.
17. McCLURE M., KIM E., BICKHART D., NULL D., COOPER T., COLE J., WIGGANS G., AJMONE-MARSAN P., COLLI L., SANTUS E., LIU G.E., SCHROEDER S., MATUKUMALLI L., VAN TASSELL C., SONSTEGARD T. (2014): *Fine mapping for Weaver syndrome in Brown Swiss cattle and the identification of 41 concordant mutations across NRCAM, PNPLA8 and CTTNBP2*, PLoS One. 2013; 8(3):e59251.
18. MILANESI M. (2015): *High-throughput sequencing technologies and genomics: insights into the bovine species*, Ph D Thesis.
19. MILANESI M., VICARIO D., STELLA A., VALENTINI A., AJMONE-MARSAN P., BIFFANI S., BISCARINI F. (2014): *Imputation accuracy is robust to cattle reference genome updates*, «Animal Genetics», doi: 10.1111/age.12251.
20. MINOZZI G., NICOLAZZI E.L., STROZZI F., STELLA A., NEGRINI R., AJMONE-MARSAN P., WILLIAMS J.L. (2011): *Genome wide scan for somatic cell counts in holstein bulls*, BMC Proc., 5 (Suppl 4):S17.
21. MINOZZI G., NICOLAZZI E.L., STELLA A., BIFFANI S., NEGRINI R., LAZZARI B., AJMONE-MARSAN P., AND WILLIAMS J.L. (2013): *Genome Wide Analysis of Fertility and Production Traits in Italian Holstein Cattle*, «PLOS ONE», 8.
22. NICOLAZZI E.L., BIFFANI S. & JANSEN G. (2013): *Short communication: imputing genotypes using PedImpute fast algorithm combining pedigree and population information*, «Journal of Dairy Science», 96, pp. 2649-53.
23. NICOLOSO L., CREPALDI P., MAZZA R., AJMONE-MARSAN P., NEGRINI R. (2013): *Re-*

- cent advance in DNA-based traceability and authentication of livestock meat PDO and PGI products, «Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture», 5 (1), pp. 9-18.
24. PINTUS E., SORBOLINI S., ALBERA A., GASPA G., DIMAURO C., STERI R., MARRAS G., AND MACCIOTTA N.P.P. (2014): *Use of locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS) regression to study selection signatures in Piedmontese and Italian Brown cattle breeds*, «Anim. Genet.», 45, pp. 1-11.
 25. PINTUS M.A., GASPA G., NICOLAZZI E.L., VICARIO D., ROSSONI A., AJMONE-MARSAN P., NARDONE A., DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2012): *Prediction of genomic breeding values for dairy traits in Italian Brown and Simmental bulls using a principal component approach*, «Journal of Dairy Science», 95 (6), pp. 3390-3400.
 26. VANRADEN P.M., NULL D.J., SARGOLZAEI M., WIGGANS G.R., TOOKER M.E., COLE J.B., SONSTEGARD T.S., CONNOR E.E., WINTERS M., VAN KAAM J.B., VALENTINI A., VAN DOORMAAL B.J., FAUST M.A., DOAK G.A. (2013): *Genomic imputation and evaluation using high-density Holstein genotypes*, «J Dairy Sci. Jan», 96 (1), pp. 668-78.

PARTECIPAZIONE A CONVEGNI NAZIONALI E INTERNAZIONALI:

1. AJMONE MARSAN P., NICOLAZZI E.L., van KAAM J.B.C.H.M., PARISET L., VALENTINI A., GRUBER C.E.M., GARGANI M., BACCIU N. (2013): *Genomic structure of Italian Holstein assessed by high density single nucleotide polymorphisms*, XX ASPA congress, Bologna, 11-13 June.
2. AJMONE MARSAN P., MILANESI M., BOMBA L., NEGRINI R., COLLI L., NICOLAZZI E., CAPOMACCIO S., MAZZA R., BACCIU N., STEFANON B. (2013): *Advantages of High-Density genotyping for morphologic and production traits GWAS in Italian Holstein*, 64th annual meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP). Nantes (France), 26-30 August.
3. AJMONE-MARSAN P., BOMBA L., NICOLAZZI E.L., NEGRINI R., MILANESI M., MANCINI G., BIFFANI S., BISCARINI F., STELLA A. e VALENTINI A. (2014): *Detection of Selection Signatures in Italian Dairy and Beef Cattle*, Food, Nutrition and Agriculture Genomics Congress, Londra (UK), 7-8 April.
4. BACCIU N., BOMBA L., NICOLAZZI E.L., MILANESI M., NEGRINI R., AJMONE-MARSAN P. (2012): *Linkage disequilibrium and haplotype analysis of two holstein BTA6 italian regions using 50k and 800k SNP panels*, 16th QTL-MAS Workshop, Alghero, 24-25 May.
5. BOMBA L., NICOLAZZI E.L., NEGRINI R., BACCIU N., MILANESI M., MANCINI G., PARISET L., SANTUS E., VICARIO D., ROSSONI A., VALENTINI A., NARDONE A., AJMONE MARSAN P. (2013): *Selection signatures in five cattle breeds detected by a 50K single nucleotide polymorphism panel*, XX ASPA congress. Bologna, 11-13 June.
6. BOMBA L., NICOLAZZI E.L., UTSUNOMIYA Y.T., NEGRINI R., MILANESI M., MANCINI G., PARISET L., SANTUS E., VICARIO D., ROSSONI A., VALENTINI A., NARDONE A., GARCIA J.F., AJMONE MARSAN P. (2013): *Comparison of Extended Haplotype Homozygosity (EHH) signals across breeds reveals signatures of selection for dairy and beef production*, 5th International Symposium on Animal Functional Genomics (ISAFG). Guarujà/SP (Brasil), 9-11 September.
7. CAPOMACCIO S., MILANESI M., BOMBA L., VAJANA E., COLLI L., EUFEMI E., NEGRINI R. AND AJMONE-MARSAN P. (2014): *Exome data on the Holstein Friesian cattle breed:*

- Investigation of causative mutations associated with female fertility*, Animal Genome Informatics, Cambridge (UK), 29 settembre-3 October.
8. CAPOMACCIO S., MILANESI M., VAJANA E., BOMBA L., EUFEMI E., COLLI L., NEGRINI R., CAPELLI K., NICOLAZZI E.L., TALENTI A., WILLIAMS J.L., STEFANON B., AJMONE MARSAN P. (2015): *Genome-wide gene-based analysis reveals new associations between SNP and production and morphological traits in Italian Holstein*, XXI ASPA congress, Milan, 9-12 June.
 9. GRUBER C.E.M., GARGANI M., NICOLAZZI E., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., PARISET L. (2013): *Regions in the bovine genome harboring evidence of selection signatures revealed by dense single nucleotide polymorphism panels*, XX ASPA congress. Bologna, 11-13 June.
 10. MACCIOTTA N.P.P., AJMONE MARSAN P., MILANESI M., VICARIO D., VALENTINI A., SORBOLINI S., DIMAURO C. (2015): *A comprehensive strategy for detecting genomic regions associated with traits of economic interest using information generated in genomic selection programmes*, XXI ASPA congress. Milan, 9-12 June.
 11. MILANESI M., CAPOMACCIO S., UTSUNOMIYA Y.T., BOMBA L., COLLI L., EUFEMI E., VAN KAAM J.T., CAPELLI K., BIFFANI S., NICOLAZZI E.L., NEGRINI R., GARCIA J.F., RUBIN C.J., NARDONE A., MACCIOTTA N.P.P., VALENTINI A., WILLIAMS J.L., AJMONE MARSAN P. (2015): *Combining exome sequencing and high density SNP analysis for the detection of common deleterious recessive mutations segregating in Italian Holstein bulls*, XXI ASPA congress. Milan, 9-12 June.
 12. MILANESI M., S. CAPOMACCIO, YURI T. UTSUNOMIYA, BOMBA L., COLLI L., EUFEMI E., VAN KAAM J.T., CAPELLI K., NICOLAZZI E.L., BIFFANI S., NEGRINI R., GARCIA J.F., RUBIN C.J., NARDONE A., MACCIOTTA N.P.P., VALENTINI A., WILLIAMS J.L. AND AJMONE-MARSAN A. (2015): *Combining high density genotyping and exome sequencing to identify deleterious mutation in italian holstein bulls*, 6th ISAFG congress. Piacenza, 27-29 July.
 13. NEGRINI R., AJMONE MARSAN P., NICOLAZZI E.L., BOMBA L., BACCIU N., MILANESI M., MANCINI G., PARISET L., VALENTINI A., NARDONE A. (2012): *A genome-wide study of selection signatures in five cattle breeds*, ISAG 2012. Cairns, Australia, 15-20 July.
 14. PULEDDA A., MILANESI M., GASPA G., DIMAURO C., AJMONE MARSAN P., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Study of genomic prediction accuracy using high density SNP panel in Italian Holstein cattle*, XXI ASPA congress. Milan, 9-12 June.
 15. TALENTI A., MILANESI M., NICOLAZZI E.L., FRATTINI S., COIZET B., PAGNACCO G., WILLIAMS J.L., VALENTINI A., NARDONE A., VAN KAAM J.T., AJMONE-MARSAN P. AND CREPALDI P. (2015): *Genomic retrospective evaluation of 20 years of selection in italian holstein bulls for feet and legs trait*, 6th ISAFG congress. Piacenza, 27-29 July.
 16. TALENTI A., MILANESI M., NICOLAZZI E.L., NICOLOSO L., FRATTINI S., COIZET B., PAGNACCO G., WILLIAMS J.L., AJMONE MARSAN P., CREPALDI P. (2015): *Birth date regression to identify genomic signatures of recent selection in Italian Holstein*, XXI ASPA congress. Milan, 9-12 June.

Variabilità di geni candidati per il miglioramento quali-quantitativo del latte bufalino e individuazione di marcatori associati a differenze nella loro espressione

Responsabile Scientifico:

Luigi Ramunno, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

La bufala Mediterranea Italiana rappresenta un'importante risorsa economica del nostro paese, principalmente per la produzione di latte destinato ai vari processi di caseificazione (mozzarella, ricotta, yogurt, gelato, ecc...). Il crescente interesse nazionale e internazionale per il suo prodotto più noto (mozzarella di bufala Campana DOP) ha consentito una crescita economica del comparto, che nel corso degli ultimi 10 anni ha visto un raddoppiamento del patrimonio zootecnico bufalino, attualmente stimato in più di 400000 capi (www.faostat.org).

Questo processo, intensificatosi negli ultimi 10 anni, ha favorito lo sviluppo dell'intero comparto, con un indotto che oggi vede impegnati oltre 2.000 imprenditori, 128 caseifici iscritti al consorzio di tutela e oltre 20 mila addetti. Il fatturato espresso dal comparto si aggira intorno ai 500 milioni di euro, con un aumento del 5% annuo delle esportazioni che si attesta al 25% sul totale della produzione (dati Ismea 2010). Ne consegue che, nonostante l'esiguo numero di capi allevati, il comparto della mozzarella di bufala si pone, al quarto posto in Italia dopo quelli del grana padano, parmigiano e pecorino romano. Risulta quindi piuttosto evidente che il miglioramento delle produzioni di questa specie è argomento dalle significative implicazioni economiche soprattutto per il meridione.

Un tale incremento non è stato però affiancato da un adeguato miglioramento del livello produttivo degli animali, che risulta insufficiente a soddisfare la richiesta di mercato. Ciò non appare incoraggiante per gli allevatori a causa: a) della riduzione del prezzo di cessione del latte al caseificio; b) del progressivo aumento dei costi di alimentazione; c) della necessità di fronteggiare situazioni di crisi come la contaminazione da diossina, e le recenti emergenze generate dalla cosiddetta terra dei fuochi.

È evidente, pertanto, che il miglioramento delle produzioni di questa specie è argomento dalle significative implicazioni economiche. Più di 58000 bufale sono coinvolte nei controlli funzionali (ANASB, Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina), tuttavia lo sviluppo di programmi di selezione per il miglioramento delle caratteristiche quali-quantitative del latte basate su progeny test e calcolo degli EBV è ostacolato dalla scarsa efficienza della fecondazione artificiale. La realtà della bufala differisce alquanto rispetto a quella di altre specie in produzione zootecnica, non solo per un certo ritardo e un minore investimento nella ricerca di settore, ma soprattutto perché le peculiarità biologiche della specie non hanno permesso di trasferire a essa i risultati delle ricerche ottenute su altre specie. A tutt'oggi il miglioramento delle caratteristiche quali-quantitative del latte di bufala è realizzato prevalentemente agendo su fattori ambientali (tecniche di alimentazione, qualità della razione, modalità di mungitura, sanità dell'allevamento, ecc...). Negli ultimi anni, si sono tuttavia moltiplicati gli sforzi per evidenziare geni e marcatori genetici utili per il miglioramento delle caratteristiche quali-quantitative del latte di bufala. Attraverso l'approccio del gene candidato diversi studi hanno già consentito l'individuazione di associazioni statisticamente significative tra marcatori e variabilità delle caratteristiche quali-quantitative del latte nella specie bovina oltre che caprina e ovina (Ramunno et al., 1997, 2001, 2005; Cosenza et al., 2007; Selvaggi et al., 2014; Caroli et al., 2009) e più recentemente analoghe ricerche sono state condotte anche per la specie bufalina (Pauciullo et al., 2012a e b; Bonfatti et al., 2012; Cosenza et al., 2015). Nella maggior parte dei casi le mutazioni investigate ricadono in regioni codificanti (cSNPs). Sebbene alcuni di questi abbiano un chiaro effetto funzionale e siano responsabili delle osservate differenze fenotipiche, alterando sequenze aminoacidiche o livelli di fosforilazione/glicosilazione con conseguente cambiamenti della struttura e delle proprietà biologiche della proteina codificata o modulando il livello di sintesi proteica, il più delle volte tali SNP sono funzionalmente neutrali e, quindi, non causativi del diverso livello di espressione osservato. Si rende, pertanto, necessaria una più attenta analisi anche di quei polimorfismi che ricadono in regione geniche non codificanti. Polimorfismi coinvolti nel diverso livello di espressione genica sono spesso localizzati all'interno di regioni regolatrici quali promotori, enhancer, silencer e introni (regulatory SNPs, rSNPs) e svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione allele-specifica dell'espressione genica. Un polimorfismo a livello di promotore può, ad esempio, modificare, creare o abolire siti di legame di fattori di trascrizione così da alterare o modulare l'espressione del gene e,

conseguentemente, la variabilità fenotipica (Chorley et al., 2008; Hohjoh & Tokunaga, 2001; Wang et al., 2005). Tali polimorfismi funzionali rappresentano, pertanto, un'importante ma relativamente meno esplorata classe di variazione genetica. Un'altra regione particolarmente interessante per il controllo dell'espressione di un gene è la regione 3' non-tradotta (3'UTR) dell'mRNA. Eventuali polimorfismi che ricadono in questa regione potrebbero creare o distruggere sequenze riconosciute (seed sequence) per il legame con microRNA (miRNA). I miRNA, sequenze di RNA non codificante della lunghezza di 19-25 nucleotidi, sono responsabili della regolazione dell'espressione genica in molteplici processi fisiologici tra i quali anche la lattazione (Chen et al., 2010). Conseguentemente, nell'ultimo decennio sono state condotte diverse ricerche mirate all'individuazione di SNP anche in regioni non codificanti di geni candidati per la variabilità del carattere produzione latte nelle principali specie di ruminanti. Sono stati individuati e caratterizzati diversi SNP responsabili o di alterazione di meccanismi di splicing (Cosenza et al., 2009; Giambra et al., 2010), della completa abolizione/creazione ex novo di transcription factor binding site dimostrando in diversi casi una loro associazione con variazioni dell'espressione genica (Kuss et al., 2003; Ramunno et al., 2005; Liefers et al., 2005; Ordovás et al., 2009; Waters et al., 2010; Pauciullo et al., 2012a, b; Moioli et al., 2013; Cosenza et al., 2015; Yang et al., 2015) o polimorfismi nei siti di miRNA legati a particolari caratteri che nutrizionali del latte (Zidi et al., 2010).

L'applicazione delle più moderne tecniche di biologia molecolare fornisce un contributo essenziale per una sempre più rapida ed economica identificazione di quei marcatori in geni candidati fondamentali per accelerare i processi di miglioramento genetico per caratteri quali: quantità di latte, tenore e percentuale in proteina e grasso e profilo acido. Ciò consente un passo importante per il miglioramento genetico della specie bufalina sia in campo nazionale che internazionale e il mantenimento della competitività della genetica italiana nei confronti di altri paesi a zootecnia avanzata.

La linea di ricerca proposta da dall'Unità Operativa UNINA, nell'ambito del progetto INNOVAGEN, rappresenta una naturale continuazione delle attività svolte per il precedente progetto SelMol e si è posta quali principali obiettivi:

Analisi della variabilità di geni candidati per variazioni delle caratteristiche quali-quantitative del latte;

1. raccolta di un congruo numero di campioni individuali di sangue e latte in diverse aziende bufaline distribuite tra le regioni Campania e Basilicata

e dei quali si disponeva dei controlli funzionali e/o dei controlli giornalieri per la sola quantità di latte prodotta;

2. valutazione mensile della resa casearia individuale su un numero rappresentativo di bufale;
3. analisi della composizione acidica del latte di bufale distribuite in diversi allevamenti.
4. studi di associazione tra i marcatori individuati e i caratteri presi in esame: quantità e profilo acidico del latte, resa casearia individuale

RISULTATI

CAMPIONAMENTO BIOLOGICO

Durante il primo anno di attività sono stati raccolti oltre 770 campioni individuali di sangue in diverse aziende bufaline distribuite tra le regioni Campania (657) e Basilicata (120) e dei quali si disponeva dei controlli funzionali e/o dei controlli giornalieri per la sola quantità di latte prodotta. oltre alle date dal parto, numero di parti, data prelievo e numero giorni dal parto.

Da una parte degli stessi soggetti (circa 430 distribuiti in 13 aziende campane e una lucana) sono stati prelevati campioni individuali latte. Da ciascuno campione di sangue si è proceduto all'estrazione di DNA per mezzo della metodica Fenolo/Cloroformio e successiva quantizzazione mediante misure spettrofotometriche.

ANALISI DELLA VARIABILITÀ DI GENI CANDIDATI PER VARIAZIONI QUALI QUANTITATIVE DEL LATTE

Per il soddisfacimento degli obiettivi prefissati dall'U.O. UNINA nell'ambito del presente progetto sono stati presi in esame 9 geni candidati per variazioni quali quantitative del latte già oggetto di indagine nel precedente progetto SELMOL: Acetil CoA Carbossilasi a (*ACACA*), b-Lattoglobulina (*BLG*), Caseina as1 (*CSN1S1*), Caseina b (*CSN2*), Caseina k (*CSN3*), Lipoproteina lipasi (*LPL*), Ossitocina (*OXT*), Stearoil-CoA-Desaturasi (*SCD*). Inoltre, è stata realizzata un'analisi della variabilità di nuovi 6 geni candidati: Recettore dell'Ossitocina (*OXTR*), Prolattina (*PRL*), Recettore della Prolattina (*PRLR*), Leptina (*LEP*), Lattoterrina (*LTF*), Caseina as2, alleli A e B (*CSN1S2A* e *CSN1S2B*).

Recettore dell'Ossitocina (OXTR)

Il Recettore dell'Ossitocina (*OXTR*) svolge un ruolo centrale nel funzionamento dei caratteri riproduttivi femminili. Attualmente le sole sequenze disponibili in banca dati sono relative a parziali sequenze genomiche o di trascritti per la specie bovina (EMBL AF100633, NM_174134) ovina (AY163261, HM856597), mentre per la specie bufalina si dispone di solo una sequenza parziale di trascritto (FJ917398). Il gene del Recettore dell'Ossitocina (*OXTR*) nel bovino si caratterizza per 4 esoni e tre introni e codifica per una proteina di 391 aminoacidi. In nessuna delle principali specie di interesse zootecnico sono noti polimorfismi a tale *locus*. Il gene *OXTR* per la specie bovina mappa sul cromosoma BTA22 dove Gutiérrez-Gil et al. (2010) hanno individuato 9 QTL per la composizione in acidi grassi (FA) della carne. In particolare, è stato osservato che cinque di tali QTL influenzano il contenuto di acido palmitico (C16:0), palmitoleico (C16:1), oleico (c9 C18:1) linoleico coniugato (CLA) così come la somma del totale degli acidi grassi (SUMWFA). Pertanto, tale gene può esser eletto quale candidato per le variazioni quali-quantitative del grasso in carne e latte.

Al fine di individuare polimorfismi al *locus OXTR* nella bufala Mediterranea italiana sono stati amplificati e successivamente sequenziati i tratti di DNA comprendenti parte del primo esone, l'intero secondo esone e il terzo esone fino alla tripletta (TGA) codificante per lo stop codon del gene per un totale di 1963 bp in 10 soggetti allevati in provincia di Salerno. Sono stati individuati 7 SNP: 5 nella regione del 1° esone trascritta e non tradotta g.230G>T, g.522G>T, g.567C>G, g.577G>C, g.579G>T e 2 nel terzo esone: g.129C>T e g.139C>A. Mentre quest'ultima è di tipo silente, in quanto non altera il senso della tripletta (GGA^{Gly356}→GGC^{Gly}), mutazione g.129C>T è responsabile del cambiamento aa: CGC^{Arg353}→TGC^{Cys} (Cosenza et al., 2016a).

Leptina (LEP)

La Leptina è un ormone coinvolto in numerosi processi fisiologici, fra i quali la regolazione dell'appetito e del metabolismo energetico. La leptina sembrerebbe svolgere un ruolo chiave nella comunicazione fra adipociti e cellule miogeniche, la cui interazione determina l'intensità dell'adipogenesi, miogenesi e lipogenesi/lipolisi, con possibili riflessi sulla qualità delle produzioni. Il gene della Leptina (*Lep*) bufalina presenta una organizzazione simile a quella dell'omologo gene nella specie bovina. In particolare, la grandezza degli esoni è di 33 bp dell'esone 1, 172 bp dell'esone 2 e 1846 bp dell'esone 3 (EMBL AH013754). Per

mezzo di PCR è stato amplificato e successivamente sequenziato parte del gene Leptina di diversi soggetti allevati in provincia di Salerno e il confronto delle sequenze ottenute ha permesso di evidenziare 3 SNP. Trattasi di transizioni A→G localizzate in posizione 219, 231 265 a partire dall'inizio dell'esone 3. In particolare, lo SNP in posizione 231 è di tipo missenso in quanto responsabile del cambiamento aminoacidico Ala→Thr in posizione 89. L'aminoacido Ala è di tipo polare, di massa molecolare pari a 89,09 u e con punto isoelettrico 6,11, mentre la Thr è neutro.polare, con massa molecolare di 119,12u e punto isoelettrico 5,60. Un cambiamento della sequenza aminoacidica, considerando tale differenza, potrebbe comportare una variazione della struttura secondaria e terziaria della proteina tradotta e alterare la sua interazione col rispettivo recettore.

Prolattina (PRL)

La Prolattina è un ormone polipeptidico secreto dalla ghiandola pituitaria anteriore che regola la maturazione della ghiandola mammaria. Inoltre, la Prolattina promuove la captazione di alcuni aminoacidi e la trascrizione di geni che producono le proteine del latte, come la caseina, la lattoalbumina e la β-lattoalbumina. Il gene nella specie bovina è stato completamente sequenziato (Cao et al., 2002) e mappato sul cromosoma 23. Il gene si estende per un tratto di circa 10kb ed è costituito da 5 esoni che codificano per un peptide leader di 30 aminoacidi e una proteina matura di 199 aminoacidi. Di contro, per la specie bufalina erano note solo sequenze parziali di trascritto (EMBL EU352822; EU340420; EF054878...).

Per mezzo di PCR è stato sequenziato l'intero gene codificante la Prolattina di 10 soggetti scelti a random e allevati in provincia di Salerno più 361 nucleotidi fiancheggianti la regione 5'. Il gene della Prolattina bufalina si estende su un tratto di 8681 bp, che comprendono 858 bp di regioni esoniche e 7741 bp di regioni introniche le quali si caratterizzano per la presenza di 4 sequenze riconducibili a retroposoni, i primi due (L1_Art e Bov-B) realizzatesi a livello del 1° introne, i rimanenti (Bov-tA2 e Bov-A2) localizzati al 2° esone. Il gene della Prolattina bufalina ha mostrato un'organizzazione molto simile a quella dell'omologo gene nella specie bovina (omologia pari al 96%). Il confronto delle sequenze ottenute ha consentito di evidenziare un totale di 35 SNP: quindici nel 1° introne (10 transizioni, 5 trasversione), otto nel 2° introne (5 transizioni, 3 trasversioni), otto nel 3° introne (6 transizioni 1 trasversione e una inserzione) e tre mutazioni nel 4° introne (1 transizioni, 2 trasversioni) oltre a una mutazione silente al nt 108 del 5° esone (CTT^{Leu202}→CTC^{Leu}) (Cosenza et al., 2013).

Recettore della prolattina (PRLR)

Il Recettore della Prolattina (*PRLR*) è il recettore specifico per la Prolattina. Il Recettore della Prolattina gioca un ruolo centrale nella trasmissione del segnale da Prolattina ai geni che codificano per le proteine del latte. Nello specifico esso lega la Prolattina e contribuisce alla attivazione della chinasi JAK2 e successivamente del fattore di trascrizione STAT5 il quale si lega a specifiche sequenze nella regione promotrice dei geni codificanti le proteine del latte. Studi recenti hanno messo in evidenza associazioni tra polimorfismi al *locus PRLR* e caratteri riproduttivi sia in maiale che pecora (Chu et al., 2007; Terman, 2005). Inoltre, associazioni significative sono state osservate anche tra varianti *PRLR* e caratteri produttivi nei bovini da latte (Brym et al., 2005; Lü et al., 2011a,b; Russo et al., 2012). Pertanto, il gene *PRLR* è considerato un buon gene candidato per studi di associazione con caratteri legati alla produzione del latte. Il gene *PRLR* bovino è localizzato sul cromosoma 20 (20q17), ed è costituito da almeno 10 esoni. Per la specie bufalina sono riportate in banca sequenze parziali del gene (EMBL GQ339914) e del trascritto (EMBL HQ236497).

L'amplificazione e il parziale sequenziamento del gene *PRLR* (dal 2° al 9° esone e introni fiancheggiati) di 10 soggetti allevati in provincia di Salerno ha permesso di evidenziare 36 mutazioni, delle quali 13 esoniche. Riguardo quest'ultime, una sostituzione C→T si realizza al nucleotide 102 dell'esone 2, uno SNP C→G al 49° nucleotide del 6° esone e 11 sostituzioni si localizzano al 9° esone del gene: G→A, C→T, G→A, C→A, C→T, G→A, T→C, G→A, G→A, G→A e G→A rispettivamente in posizione 128, 374, 517, 520, 623, 627 e 708, 822, 876, 954 e 1040 rispetto al 1° nt dell'esone. I primi 7 SNP sono di tipo missenso essendo responsabili dei seguenti cambiamenti aminoacidici: Val¹⁹→Phe, Pro¹⁹⁷→Ala, His³²⁸→Arg, Ala⁴¹⁰→Val, Asp⁴⁵⁸→Asn, Gln⁴⁵⁹→Lys e Thr⁴⁹³→Met. L'analisi dei soggetti informativi ha consentito di evidenziare al momento almeno 4 diversi aplotipi, lasciando supporre che tale *locus* si caratterizzi per un peculiare multiallelismo (Cosenza et al., 2013).

Lattoferrina (LTF)

La Lattoferrina (Lf) è una glicoproteina monomerica del peso di circa 80 KDa e con due siti di legame Fe³⁺ appartenente alle frazioni proteiche del siero del latte. La Lattoferrina riveste un ruolo prioritario nell'alimentazione neonatale,

poiché è resistente alla proteolisi e permette l'assorbimento gastrointestinale del ferro. Altre funzioni biologiche attribuite a questa proteina comprendono la modulazione della risposta infiammatoria, l'attivazione del sistema immunitario e il controllo della mielopoiesi. La funzione meglio conosciuta della Lattoferrina è, però, la sua marcata attività antibatterica che si manifesta sia con un'attività batteriostatica che battericida. (Vogel et al., 2002; Kang et al., 2008). Oltre a tutte le funzioni di cui sopra, la Lattoferrina, in quanto componente del latte, è considerata un potenziale gene candidato per la variabilità di caratteri quali lo sviluppo corporeo e le caratteristiche quali-quantitative e tecnologiche del latte (Guo et al., 2010). La concentrazione di Lattoferrina è molto variabile tra le specie diverse e, in particolare, nel latte di bufala ($0,332 \pm 0,165$ g / kg) sembra essere inferiore a quello riportato per il latte umano, ma superiore a quello presente nel latte bovino (Giacinti et al., 2013).

Il gene che codifica per la Lattoferrina (*LTF*), che nella specie bovina si estende su di un tratto di DNA di circa 34,5 Kb ed è composto da 17 esoni e 16 introni, è stato particolarmente studiato in vacca e capra con l'identificazione di diversi polimorfismi in entrambe le specie, alcuni delle quali hanno mostrato un effetto positivo sulle caratteristiche produttive e antimicrobiche del latte (Lee et al., 1997; Li et al., 2004; Guo et al., 2010). Di contro, pochi studi sono stati condotti nella specie bufalina e disponibili solo sequenze relative a cDNA o incomplete sequenze genomiche.

Al fine di individuare polimorfismi al *locus LTF* della Bufala Mediterranea Italiana, è stata sequenziata la regione di DNA compresa tra gli ultimi 2 nucleotidi del 14° introne e i primi due del 16° introne per un totale di 1505 bp (EMBL acc. no. HG515533). L'analisi e il confronto delle sequenze ottenute da 10 soggetti allevati in provincia di Salerno ha messo in evidenza 11 siti polimorfici, nove dei quali localizzati a livello del 15° introne: g.299C>T, g.367A>G, g.893A>G, g.1051A>G, g.1110A>G, g.1113A>G, g.1120C>T, g.1127C>T, g.1214C>T. I restanti due polimorfismi sono stati evidenziati rispettivamente al 15° esone (g.88G>A), e 16° (g.1351G>A). Entrambe le mutazioni sono di tipo silente: p.Thr⁵⁸² and p.Lys⁶²⁸ (Pauciullo et al., 2016).

Caseina α 2, alleli A e B (CSN1S2A e CSN1S2B)

Le Caseine (α 1-Cn, β -Cn, α 2-Cn, k-Cn), oltre a rappresentare un'importante fonte di amminoacidi, svolgono un ruolo determinante nel trasporto di fosforo e calcio in quantità sufficienti per le esigenze di sviluppo del tessuto osseo. In particolare, le Caseine del gruppo α s (α 1, α 2) definiscono la capacità delle micelle di

trasportare il calcio e il fosforo colloidale (Threadgill e Womack, 1990). Le 4 Caseine sono codificate da quattro geni autosomici strettamente associati (*CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* e *CSN3*). Nei bovini e negli ovi-caprini l'intero complesso genico delle caseine è localizzato sul cromosoma 6 (Threadgill e Womack, 1990; Gallagher et al., 1994), mentre per la specie bufalina sul cromosoma 7 (Iannuzzi et al., 2003). Riguardo al polimorfismo a tale *locus*, la specie caprina mostra il più alto grado di variabilità quali-quantitativa. A tutt'oggi per tale specie sono stati caratterizzati almeno 7 alleli associati ad almeno 3 diversi livelli di sintesi della corrispondente proteina: mentre gli alleli *CSN1S2* A, B, C, E e F sono associati a un contenuto normale di caseina α s2 (Bouniol et al., 1994, Ramunno et al., 2001a; Boulanger et al., 1984; Lagonigro et al., 2001), l'allele D è responsabile di un suo contenuto intermedio, mentre l'allele 0 è un allele "nullo" in quanto associato a una apparente assenza di Caseina α s2 (Ramunno et al., 2001b). Meno polimorfo tale *locus* nella specie bufalina per la quale sono state identificati solo diversi livelli di fosforilazione (D'Ambrosio et al., 2008). Per la specie bufalina attualmente sono disponibili solo sequenze relative a cDNA (EMBL n° AJ005431, DQ133467 e DQ173244) e brevi sequenze introniche, mentre i pochi polimorfismi sono stati individuati solo a livello intronico (EMBL EF025984 EF025985, EF025986) e del 18° esone (EMBL EF025987, EF025988 e EF025989), e, pertanto, in regioni non codificanti. Recentemente, Cosenza et al. (2009) riportano di una singola sostituzione nucleotidica (FM865620:g.773G>C) realizzatasi al sito donatore di splice dell'introne 7 che da origine a un nuovo allele (*CSN1S2B*) che si caratterizza per lo skipping del corrispondente esone a livello di mRNA.

Per mezzo di PCR è stato sequenziato l'intero gene codificante la Caseina α s2 di 2 bufale omozigoti rispettivamente per gli alleli *CSN1S2A* e B oltre a circa 900 nucleotidi del promotore. Nel bufalo il gene della Caseina α s2 (*CSN1S2*) è costituito da oltre 18000 nucleotidi ed è suddiviso in 18 esoni, di dimensioni variabili tra 21 e 266 nucleotidi. L'organizzazione del gene al 5' e al 3' è molto simile a quella descritta per la specie bovina (Groenen et al., 1993). Il confronto delle sequenze dei due soggetti esaminati ha evidenziato un totale di 75 siti polimorfi (inserzioni, delezioni, SNP), sei dei quali realizzatesi nella regione promotrice e cinque esonici. Confermata per l'allele *CSN1S2B* la sostituzione G>C al sito donatore di splice dell'introne 7 osservata da Cosenza et al. (2009). Per quanto riguarda le mutazioni esoniche due sono responsabili di cambiamento aminoacidico: transversione A→T al 16° nucleotide del 14° esone (p.Ile147Phe) e transizione A→G al 31° nucleotide del 16° esone (p.Thp185Ala). Pertanto, l'allele *CSN1S2B* dovrebbe tradurre una proteina di 198 amminoacidi *vs* 207 che si caratterizza per la presenza in posizione 147 e 185 rispettivamente di Phe e Ala.

Gene	SNP	Distribuzione genotipica			Totale	Frequenze alleliche	
ACACA*	ex1_C/T	C:C	T:C	T:T		C	T
		600	153	18	771	0,88	0,12
BLG*	ex5_65_C/T	C:C	T:C	T:T		C	T
		53	276	416	745	0,25	0,75
CSN1S1*	ex17_89_T/C	C:C	T:C	T:T		C	T
		347	316	102	765	0,66	0,34
CSN1S2**	ex16_31_A/G	G:G	G:A	A:A		G	A
		202	358	202	762	0,50	0,50
CSN1S2*	int7_773_G/C	G:G	G:C	C:C		G	C
		523	215	25	763	0,83	0,17
CSN2*	Ex9_274_G/T	G:G	T:G	T:T		G	T
		554	192	18	764	0,85	0,15
LEP**	ex3_231_G/A	G:G	A:G	A:A		G	A
		546	194	23	763	0,84	0,16
LPL*	ex1_A/G	G:G	G:A	A:A		G	A
		302	343	115	760	0,62	0,38
LTF**	ex15_85_A/G	A:A	A:G	G:G		A	G
		80	326	359	765	0,32	0,68
LTF**	ex16_39_G/A	A:A	A:G	G:G		A	G
		358	320	77	755	0,68	0,32
OXR**	ex3_129_T/C	C:C	C:T	T:T		C	T
		429	270	55	754	0,75	0,25
OXT*	ex2_G/T	G:G	G:T	T:T		G	T
		353	311	98	762	0,67	0,33
PRLR**	ex9_G/A	A:A	A:G	G:G		A	G
		601	142	12	755	0,89	0,11
PRL**	ex5_108_T/C	T:T	T:C	C:C		C	T
		586	156	12	754	0,88	0,12
SCD*	Prom_133_A/C	A:A	A:C	C:C		A	C
		487	215	56	758	0,78	0,22
CSN3**	Ex4_nt 377 T/C	C:C	T:C	T:T		C	T
		345	327	91	763	0,67	0,33

Tab. 1

*SNP individuati nell'ambito del progetto SELMOL; ** SNP individuati nell'ambito del progetto INNOVAGEN

GENOTIPIZZAZIONE

Al fine di individuare marcatori/geni associati a variazioni delle caratteristiche quali-quantitative del latte di bufala sono stati investigati un totale di 16 SNP relativi ai 14 geni oggetto di indagine. Tutti i marcatori presi in esame ricadevano in regioni codificati o in regioni regolatrici. La genotipizzazione di oltre 770 campioni individuali di DNA bufalino è stata realizzata presso

la K Biosciences (www.Kbioscience.com) (UK). In tabella 1 sono riportate per ciascun SNP le distribuzioni genotipiche osservate e relative frequenze alleliche.

VALUTAZIONE MENSILE DELLA RESA CASEARIA INDIVIDUALE

L'attitudine alla coagulazione presamica del latte e la resa casearia assumono un ruolo fondamentale nel nostro Paese che, tradizionalmente, destina la maggior parte del latte bufalino alla trasformazione. Attualmente, la resa in formaggio viene valutata indirettamente attraverso il contenuto di grasso e proteina e la determinazione dell'attitudine alla coagulazione del latte (LDG), utilizzando il lattodinamografo. Nonostante si faccia un ampio utilizzo di questa tecnica analitica, le relazioni che intercorrono tra LDG e resa casearia non sono state chiarite, soprattutto dal punto di vista genetico.

Al fine di individuare le basi genetiche dell'attitudine casearia del latte si rende necessario disporre di dati di individuale e, pertanto, si è proceduto alla caseificazione di ridotti quantitativi di latte (micro-caseificazione) di singole bufale.

In collaborazione con il Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università degli Studi di Napoli e dell'ANASB, si è proceduto alla valutazione della resa casearia mensile di 147 soggetti allevati in diverse aziende in provincia di Salerno e Caserta. Mediamente per ciascun soggetto sono state realizzate almeno 6 prove mensili di micro-caseificazioni a partire da un kg di latte e determinati i 36 principali parametri chimico-fisici che influenzano l'attitudine alla caseificazione del latte oltre a permettere il calcolo della resa teorica collezionando un totale di circa 930 report.

Sono state osservate differenze significative sulla resa casearia a parità di parametri analizzati lasciando ipotizzare, analogamente ad altre specie di ruminanti, la presenza di alleli associati a differenze quantitative nella loro espressione.

ANALISI DELLA COMPOSIZIONE ACIDICA DEL LATTE

I circa 430 campioni di latte, raccolti in diversi stadi di lattazione da bufale allevate in 14 diverse aziende, aliquotati e congelati sono stati inviati presso il laboratorio della prof.ssa A. Nudda dell'Università degli Studi di Sassari per sottoporli ad analisi per la determinazione dei profili acidi individuali

mediante tecniche di gas cromatografiche e, limitatamente a 30 soggetti distribuiti in 5 allevamenti, alla valutazione dell'andamento del profilo acido nel corso della lattazione.

L'azienda di campionamento ha influenzato significativamente sia il contenuto in grasso ($P < 0,01$) che la sua composizione ($P < 0,01$) fatta eccezione per il contenuto di DHA (22:6 n-3 o acido docosaesaenoico) che, comunque, è stato ritrovato in tracce solo in pochi campioni di latte. Tra gli acidi grassi il più abbondante è risultato l'acido palmitico (C16:0), che rappresenta mediamente il 35% del totale degli acidi grassi, seguito dall'acido oleico (C18:1 cis9) e dall'acido stearico (C18:0) che rappresentano rispettivamente il 20% e l'11% del totale degli acidi grassi considerati. Questi risultati sono in linea con precedenti osservazioni sul latte bufalino (Varricchio et al., 2007). Per quanto riguarda gli acidi grassi più importanti da un punto di vista nutrizionale si osserva che l'acido vaccenico (C18:1 trans11), che rappresenta circa il 60% del totale degli acidi grassi trans, è risultato mediamente pari all'1,36% variando da un minimo di 0,67% a un massimo di 1,21%. Anche per quanto riguarda il contenuto in acido rumenico (CLA c9, t11), che rappresenta mediamente il 40% del totale dei CLA, si è osservata una variabilità tra le aziende. I contenuti percentuali di questo acido grasso infatti variano da un minimo di 0,33% a un massimo di 0,67%. Il contenuto di acido α -linolenico (C18:3 n3) è risultato compreso tra un minimo di 0,16% a un massimo di 0,41 (tab. 2)

Per quanto riguarda i principali gruppi di acidi grassi anche in questo caso l'azienda di campionamento ha avuto un effetto significativo su tutti i gruppi considerati. Il contenuto di acidi grassi saturi (SFA) è risultata mediamente del 70% con un valore massimo di 76,18% e un valore minimo di 68,80%. Gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) sono risultati mediamente pari al 25% del totale degli acidi grassi. Il contenuto percentuale più elevato osservato è stato di 27,43%, il più basso di 21,22%. Il contenuto di acidi grassi polinsaturi (PUFA) era mediamente del 3,13% e variava da un minimo di 2,53% a un massimo di 4,47%. Infine, gli acidi grassi ramificati (BCFA) sono risultati mediamente pari al 2% del totale degli acidi grassi (dal 2,58% all'1,75%) (tab. 2)

Il mese di campionamento ha influenzato principalmente i contenuti del C4:0, C6:0, C14:1, C15:0, C16:1, C17:0, C17:1 e CLA c9, t11 (Tabelle 3 e 4) (Cosenza et al., 2016b).

Herd	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	P
Far (%)	7.44	7.99	7.94	7.28	7.00	7.80	6.93	8.03	9.34	8.43	8.58	6.24	7.42	7.59	**
Fatty acid (%)															
C4:0	3.47	4.38	3.85	3.90	3.51	4.10	4.35	3.88	3.86	3.65	4.42	3.93	3.80	3.60	**
C6:0	1.61	1.96	2.04	1.86	1.71	1.69	1.83	1.62	1.49	1.52	1.93	1.54	1.64	1.52	**
C8:0	0.8	0.98	1.14	0.95	0.90	0.78	0.86	0.77	0.66	0.73	0.95	0.69	0.79	0.72	**
C10:0	1.73	2.05	2.53	2.03	1.96	1.60	1.77	1.65	1.33	1.47	1.95	1.39	1.65	1.49	**
C12:0	2.38	2.72	3.30	2.63	2.60	2.11	2.34	2.28	1.76	1.96	2.57	1.88	2.22	1.98	**
C14:0	11.07	12.55	12.74	11.65	11.18	10.16	10.81	10.62	9.49	9.26	11.56	9.95	10.50	9.61	**
C14:1	0.73	0.84	0.93	0.59	0.71	0.59	0.85	0.57	0.46	0.50	0.81	0.61	0.56	0.52	**
C15:0	1.26	1.24	1.24	1.23	1.19	1.10	1.28	0.97	0.89	1.00	1.05	1.03	1.09	0.92	**
C16:0	37.68	39.00	33.50	33.93	33.36	33.83	35.65	33.50	34.45	32.17	35.26	33.65	35.21	34.29	**
C16:1	2.31	2.34	2.19	1.57	1.83	1.76	2.52	1.60	1.49	1.55	2.29	1.78	1.60	1.53	**
C17:0	0.55	0.47	0.54	0.57	0.48	0.48	0.56	0.48	0.43	0.50	0.44	0.58	0.48	0.46	**
C17:1	0.23	0.16	0.21	0.18	0.16	0.16	0.24	0.15	0.12	0.13	0.17	0.22	0.15	0.14	**
C18:0	9.07	8.46	9.21	11.54	11.64	11.20	9.72	12.67	14.24	14.22	8.86	12.15	12.14	12.71	**
C18: <i>n</i> 11 (VA)	0.78	0.67	0.77	0.98	0.84	1.11	0.96	0.94	1.15	1.21	0.68	1.05	1.11	1.71	**
CLA <i>c9,t11</i> (RA)	0.38	0.33	0.36	0.39	0.38	0.43	0.46	0.36	0.39	0.45	0.35	0.45	0.43	0.67	**
C18:2 <i>n</i> 6 (LA)	1.42	1.28	1.56	1.34	1.95	1.51	1.32	1.36	1.62	2.51	1.58	1.31	1.36	1.55	**
C18:3 <i>n</i> 3 (ALA)	0.33	0.22	0.22	0.19	0.22	0.26	0.19	0.18	0.21	0.41	0.26	0.16	0.22	0.17	**
C20:4 <i>n</i> 6 (ARA)	0.10	0.08	0.13	0.11	0.13	0.09	0.12	0.08	0.07	0.12	0.09	0.12	0.09	0.10	**
C20:5 <i>n</i> 3 (EPA)	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.04	0.02	0.03	**
C22:5 <i>n</i> 3 (DPA)	0.04	0.02	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04	0.03	0.05	0.04	0.03	**
C22:6 <i>n</i> 6 (DHA)	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ns

Tab. 2. *Principali gruppi di acidi grassi nel latte di bufala campionato in differenti aziende.*

Herd		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	P
Fatty acid classes (%)																
SCFA		7.74	9.50	9.72	8.87	8.22	8.26	8.94	7.99	7.39	7.44	9.37	7.61	7.96	7.40	**
MCFA		58.79	61.80	57.64	54.74	54.11	52.54	57.24	52.74	51.42	49.50	56.47	52.28	54.08	51.54	**
LCFA		33.47	28.70	32.64	36.38	37.67	39.21	33.82	39.27	41.19	43.06	34.17	40.10	37.96	41.06	**
SEA		72.09	76.18	72.96	72.61	71.03	69.18	71.97	70.84	70.75	68.80	71.12	69.22	71.59	69.26	**
MUFA		24.69	21.22	23.86	24.15	25.31	27.43	25.13	26.36	26.13	26.54	25.80	27.61	25.27	26.98	**
PUFA		3.14	2.53	3.07	3.04	3.50	3.16	2.82	2.67	3.02	4.47	2.94	3.02	2.92	3.51	**
OBCFA		2.22	2.13	2.55	1.95	2.19	1.95	2.58	2.24	1.99	2.10	1.96	2.22	1.89	1.75	**
PUFA n3		0.42	0.28	0.29	0.28	0.30	0.33	0.26	0.22	0.26	0.49	0.32	0.26	0.28	0.24	**
PUFA n6		1.64	1.44	1.84	1.56	2.23	1.72	1.58	1.55	1.80	2.80	1.78	1.58	1.58	1.79	**
Ratio and index																
n6/n3		4.25	5.31	6.41	5.64	7.47	5.30	6.26	6.98	7.47	5.70	5.55	6.17	5.61	7.46	**
AI		3.15	3.98	3.33	3.09	2.88	2.61	3.07	2.73	2.62	2.30	2.95	2.51	2.86	2.48	**
TI		2.67	2.97	2.33	2.37	2.04	2.15	2.39	2.05	2.00	1.90	2.32	2.05	2.32	1.96	**

Tab. 3 Profilo acido del latte di bufala campionato in differenti aziende

	Rilevo							Azienda
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Fat (%)	6,38	6,37	7,08	7,47	8,02	8,33	8,68	**
Fatty acid (%)								
C4:0	4,13	3,78	3,74	3,70	3,62	3,39	3,53	*
C6:0	1,65	1,60	1,63	1,59	1,50	1,40	1,50	**
C8:0	0,75	0,75	0,78	0,76	0,71	0,66	0,73	**
C10:0	1,57	1,55	1,61	1,56	1,47	1,35	1,51	**
C12:0	2,08	2,07	2,13	2,08	2,01	1,87	2,07	**
C14:0	10,30	10,06	10,21	10,03	9,86	9,46	9,91	**
C14:1	0,39	0,51	0,56	0,60	0,64	0,66	0,62	*
C15:0	0,88	1,00	1,00	1,04	1,07	1,08	1,10	**
C16:0	34,98	34,65	35,07	34,34	34,50	33,60	33,48	*
C16:1	1,16	1,49	1,61	1,72	1,86	2,00	1,77	**
C17:0	0,53	0,50	0,46	0,47	0,48	0,50	0,54	**
C17:1	0,17	0,16	0,15	0,15	0,16	0,17	0,19	**
C18:0	12,90	12,53	11,95	12,40	11,96	12,40	12,35	ns
C18:1 t11 (VA)	1,23	1,33	1,36	1,37	1,44	1,40	1,38	**
C18:1 c9	19,84	19,77	19,47	19,81	20,13	21,20	20,88	**
C18:2 n6 (LA)	1,40	1,47	1,43	1,44	1,46	1,40	1,34	**
C18:3 n3 (ALA)	0,18	0,19	0,19	0,18	0,19	0,22	0,20	**
CLA c9,t11 (RA)	0,42	0,50	0,54	0,55	0,61	0,62	0,60	**
C20:4 n6 (ARA)	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	**
C20:5 n3 (EPA)	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	**
C22:5 n3 (DPA)	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	**
C22:6 n3 (DHA)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	ns

Tab. 4 *Profilo acido del latte di bufala campionato in differenti aziende in diversi periodi*

	Rilevo							P		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	Azienda	Rilevo	Int
Fatty acid classes (%)										
SCFA	8,17	7,76	7,83	7,69	7,40	6,87	7,36	**	**	*
MCFA	52,47	52,63	53,37	52,73	53,00	51,85	52,12	**	ns	ns
LCFA	39,36	39,61	38,80	39,57	39,60	41,28	40,53	**	ns	ns
SFA	71,58	70,53	70,62	70,12	69,48	68,05	68,99	**	**	ns
MUFA	25,32	26,10	25,98	26,41	26,95	28,33	27,57	**	*	ns
PUFA	2,91	3,17	3,19	3,25	3,33	3,38	3,22	**	*	ns
BCFA	1,65	1,85	1,83	1,95	2,06	2,14	2,05	**	**	ns
PUFA n3	0,25	0,26	0,26	0,26	0,26	0,29	0,28	**	ns	ns
PUFA n6	1,62	1,71	1,66	1,69	1,71	1,66	1,59	**	ns	ns
Ratio and index										
n6/n3	6,52	6,76	6,52	6,65	6,70	5,85	5,79	**	ns	ns
AI	2,81	2,71	2,71	2,62	2,54	2,34	2,47	**	*	ns
TI	2,20	2,12	2,16	2,10	2,06	2,01	2,07	**	ns	ns

Tab. 5 *Principali gruppi di acidi grassi nel latte di bufala campionato in differenti aziende in diversi periodi*

ASSOCIAZIONE MARCATORE/PROFILO ACIDICO

Il seguente modello lineare misto è stato utilizzato per l'analisi di associazione tra i diversi genotipi osservati ai diversi *loci* e i caratteri fenotipici presi in esame: composizione in acidi grassi del latte, classi di acidi grassi e percentuale di grasso.

$$y = \text{AGE} + \text{DIM} + \text{Month} + \text{SNP} + \text{HERD} + e_{ijklmno}$$

dove:

- y = carattere considerato;
 AGE = effetto fisso dell'età dell'animale al parto espressa in anni
 (6 classi: 1 = <4 yrs., 2=4 yrs., 3=5 yrs., 4=6 yrs., 5=7 yrs., 6 = >7 yrs.);
 DIM = effetto fisso dello stadio di lattazione (10 livelli di 30 giorni ciascuno)
Month = effetto fisso del mese di parto (12 livelli);
 SNP = effetto fisso del genotipo;
 HERD = effetto casuale dell'allevamento

Lo studio di associazione ha evidenziato un effetto statisticamente significativo tra genotipi ai *loci* *ACACA*, *CSN2*, *CSNIS2*, *LPL*, *OXTR*, *PRLR* e *SCD* e i caratteri presi in esame (tab. 6). In particolar modo è stata osservata una associazione tra lo SNP g.129C>T al *locus* *OXTR* e un più alto livello di acidi grassi a catena dispari e ramificati (OBCFA) ($P < 0.0006$), acidi grassi polinsaturi (PUFA n 3 e n 6) ($P < 0.0032$ e $P < 0.0006$, rispettivamente), acido Stearico (C18) ($P < 0.02$) e un più basso livello di acido Palmitico (C16) ($P < 0.02$) in animali con genotipo CC (Cosenza et al., 2016c).

Analogamente, per lo SNP prom_461_AC al *locus* *SCD* è stata osservata una associazione significativa tra il genotipo A/C e un maggior livello di acidi grassi moninsaturi (MUFA) ($P < 0.006$), di acido oleico (C18:1 cis9) ($P < 0.0026$) e acidi grassi a catena dispari e ramificati (OBCFA) ($P < 0.05$), oltre a un minor livello di acidi grassi saturi (SFA) ($P < 0.005$).

ASSOCIAZIONE MARCATORE/RESA CASEARIA INDIVIDUALE

Per l'analisi di associazione tra i diversi genotipi osservati ai diversi *loci* e i diversi parametri chimico-fisici che influenzano l'attitudine alla caseificazione del latte di bufala è stato applicato un modello lineare misto che prevedeva quali fattori inclusi la data del prelievo, l'allevamento, l'ordine e la stagione di parto, lo stadio di lattazione, il genotipo e l'effetto casuale dell'animale.

Lo studio di associazione ha evidenziato un effetto statisticamente significativo tra genotipi ai *loci* *OXTR* e *SCD* e alcuni caratteri presi in esame. In particolare, è stata osservata una associazione significativa tra lo SNP g.129C>T al *locus* *OXTR* e la resa a 24h (genotipo C/C vs T/T = + 18.08 g, $p = 0.0445$), % di grasso (genotipo C/C vs T/T = + 1.01 %, $p = 0.0018$) e % di proteina (C/C vs C/T = + 0.137 %, $p = 0.0169$) (tab. 7). La mutazione g.129C>T è responsabile del cambiamento aa: CGC

Marcatore	Carattere	P	Genotipi		
ACACA_ex1_CT			CC (226)	TC (76)	TT (9)
	Fat %	0.005	7.55 ^A	7.81 ^{ABa}	9.41 ^{Bb}
	OBCFA	0.04	3.93 ^a	3.88 ^{ab}	3.60 ^b
CSN2_GT			GG(210)	GT(90)	TT(9)
	Fat %	0.04	7.75 ^a	7.17 ^b	7.71 ^{ab}
CSN1S2_ex16_31_AG			AA (97)	AG (142)	GG (71)
	C16	0.05	35.23 ^a	34.71 ^{ab}	34.13 ^b
LPL_ex1_AG			AA(53)	AG(134)	GG(119)
	PUFA n 3	0.03	0.291 ^a	0.294 ^{ab}	0.315 ^b
OXTR_ex3_129_TC			CC (173)	CT (109)	TT (24)
	OBCFA	0.0006	3.94 ^A	3.89 ^A	3.57 ^B
	PUFA n 3	0.0032	0.313 ^A	0.285 ^B	0.287 ^{AB}
	PUFA n 6	0.0006	1.77 ^A	1.63 ^B	1.70 ^{AB}
	C16	0.02	34.46 ^a	35.25 ^b	35.84 ^{ab}
	C18	0.02	11.13 ^a	10.48 ^b	10.61 ^{ab}
PRLR_ex9_GA			AA (253)	AG (49)	GG (6)
	OBCFA	0.06	3.92 ^a	3.91 ^{ab}	3.52 ^b
SCD_prom__461_AC			AA (180)	AC (95)	CC (28)
	SFA	0.005	71.53 ^A	70.17 ^B	71.53 ^{AB}
	MUFA	0.006	25.33	26.55	25.30
	OBCFA	0.05	3.88	3.99	3.82
	C18_1_c9	0.0026	19.36 ^A	20.55 ^B	19.50 ^{AB}

Tab. 6

Arg353→ TGC Cys al *locus* OXTR bufalino, pertanto di particolare interesse in quanto potrebbe creare un nuovo legame disolfuro influenzante la struttura della proteina.

Analogamente, per lo SNP prom__461_AC al *locus* SCD è stata osservata una associazione statisticamente significativa tra il genotipo A/C e la resa a 24h (A/C *vs* A/A= + 13.15 g, p= 0.0158) e la % di grasso (A/C *vs* A/A= + 0.544 %, p= 0.0104) (tab. 8). La mutazione presa in esame al *locus* SCD si localizza in posizione -461 (regione promotrice) e potrebbe essere responsabile della “clusterizzazione” del sito consenso del fattore di trascrizione SP1 (da 2 a 3). Ciò potrebbe determinare un aumento dell’espressione del gene nella ghiandola mammaria (Cosenza et al., 2016b).

L’indice PKM, ovvero la stima della quantità di mozzarella ottenuta in base al contenuto in grasso e proteine, ha mostrato una sottostima della previsione di resa (in media 0,929). Questi dati confermano i risultati di Parlato e Zicarelli (2015) sulla necessità di un nuovo modello di previsione e offrono indicazioni utili per l’applicazione dei programmi di MAS per la specie bufalina.

<i>Genotipo locus OXTR</i> <i>g.129C>T</i>	Resa 24h media (g/kg)	<i>Genotipo locus OXTR</i> <i>g.129C>T</i>	% grasso media (%)	<i>Genotipo locus OXTR</i> <i>g.129C>T</i>	% proteine media (%)	N° Oss
CC ^a	289.81	CC ^a	8.30	CC ^a	4.80	116
CT ^{ab}	282.13	CT ^b	8.20	CT ^b	4.66	93
TT ^b	271.73	TT ^b	7.29	TT ^{ab}	4.72	20

Tab. 7

<i>Genotipo locus SCD</i> <i>prom 461 AC</i>	Resa 24h media (g/kg)	<i>Genotipo locus SCD</i> <i>prom 461 AC</i>	% grasso media (%)	N° Oss
AA ^a	278.27	AA ^a	7.91	83
AC ^b	291.42	AC ^b	8.45	94
CC ^b	286.18	CC ^{ab}	8.10	46

Tab. 8

ASSOCIAZIONE MARCATORE/QUANTITÀ DI LATTE PRODOTTA

Dei 770 genotipi di partenza per ciascun *locus*, applicando i filtri riportati in tabella 9, si è ottenuto un dataset finale mediamente di 520 soggetti utilizzabili per *locus* con una media di circa 6200 osservazioni (controlli mensili produzione latte) e circa 950 lattazioni

Lo studio di associazione ha evidenziato un effetto statisticamente significativo tra i marcatori ai *loci* *LEP*, *CSN1S1* e *CSN3* e il carattere preso in esame.

In dettaglio, sono state individuate associazioni statisticamente significative tra il genotipo A/A al *locus* *LEP* (A/A *vs* G/G = + 1,02 Kg, $p < 0.05$, tab. 10) e i genotipi C/C ai *loci* *CSN1S1* (C/C *vs* T/T = + 0,61 Kg, $p < 0.05$, tab. 11) e *CSN3* (C/C *vs* T/T = + 0,61 Kg, $p < 0.05$, tab. 12) e una maggiore quantità di latte prodotta.

CONCLUSIONI

Sempre più ai giorni nostri si rende necessario investire nella ricerca per la selezione di animali di interesse zootecnico che possano essere più idonei per una più alta produzione qualitativa degli alimenti. In questi ultimi anni, infatti, le richieste sia dei consumatori che dell'industria di trasformazione nei

ETA'/ ORDINE DI PARTO		
PARTO I	PARTO II	PARTO ≥ III
23 < ETA, MESI < 46	36 < ETA, MESI < 66	ETA, MESI ≥ 48
LATTE, KG/ GIORNO		
> 2.5 KG		
CONTROLLI		
3 < N-CONTROLLI ≤ 9		
GRUPPI DI CONTEMPORANEITA'- HYS		
(ALLEVAMENTO- ANNO- STAGIONE DI PARTO)		
HYS ≥ 5		

Tab. 9 *Fattori inclusi nel modello di analisi*

Genotipo <i>Lep</i>	Freq. allelica	Media (kg)	N° Sogg	N° lattazioni	N° controlli
AA ^a	A: 0.15	9.10	17	40	278
AG ^{ab}		8.41	136	293	1,925
GG ^b		8.08	405	808	5,413

Tab. 10

Genotipo <i>CSN1S1</i>	Freq. allelica	Media (kg)	N° Sogg	N° lattazioni	N° controlli
CC ^a	C: 0.66	8.29	256	854	3,423
CT ^{ab}		8.25	224	223	3,150
TT ^c	T: 0.34	7,68	72	18	974

Tab. 11

Genotipo <i>CSN3</i>	Freq. allelica	Media (kg)	N° Sogg	N° lattazioni	N° controlli
CC ^a	C: 0.66	8.30	258	531	3,525
CT ^a		8.21	232	475	3,169
TT ^b		7,68	65	135	907

Tab. 12

riguardi dei prodotti di origine animale sono state rivolte sempre più verso aspetti legati alla qualità, concetto che coinvolge, oltre alle ovvie garanzie sull'origine degli animali e sui sistemi di allevamento, aspetti nutrizionali, organolettici e tecnologici. La crescente consapevolezza del legame esistente tra dieta e salute ha determinato una sempre maggiore richiesta di cibi

con migliori caratteristiche nutrizionali soprattutto per quanto riguarda la frazione lipidica e quella proteica. Grazie ai risultati conseguiti attraverso il presente progetto sarà possibile il trasferimento alla comunità scientifica e al sistema produttivo delle conoscenze acquisite dalla ricerca su geni e marcatori utili al miglioramento delle caratteristiche produttive della specie bufalina oltre alla divulgazione e valorizzazione presso i consumatori di prodotti alimentari con particolari caratteristiche nutrizionali e funzionali. Un esempio fra tutti quello riguardante la osservata associazione tra il marcatore *OXTR* e la variabilità del profilo acidico. Fino a oggi, i polimorfismi a tale *locus* sono stati correlati a differenze nel comportamento sociale nell'uomo così come in altri mammiferi. Dalla presente ricerca è emersa una importante significativa associazione tra lo SNP g.129C>T e la composizione di diversi acidi grassi nel latte di bufala, in particolare un maggior contenuto di OBCFA, acidi grassi polinsaturi (PUFA n 3 e 6), acido stearico (C18) e un più basso livello di acido Palmitico. Tutte tali variazioni potrebbero essere di indubbio aiuto nella produzione di "healthy milk". Inoltre, poiché è noto che gli acidi grassi polinsaturi e l'acido stearico influenzano caratteristiche quali la consistenza e il gusto della carne, tale SNP potrebbe esser adottato per nuovi studi di associazione per il miglioramento qualitativo di questo nuovo carattere di rilevante importanza economica.

Nell'immediato futuro, sarà quindi possibile un trasferimento diretto alla Organizzazione che gestisce le strutture di selezione dei riproduttori e gli schemi di miglioramento genetico della bufala Mediterranea Italiana, delle capacità tecniche e delle conoscenze teoriche per l'applicazione dei moderni metodi di selezione che integrano le informazioni molecolari a quelle di genetica quantitative.

BIBLIOGRAFIA

- BRYM P., KAMIŃSKI S., WÓJCIK E. (2005): *Polymorphism within the bovine prolactin receptor gene (PRLR)*, «Animal Science Papers and Reports», 23, pp. 61-6.
- BONFATTI V., GIANTIN M., GERVASO M., ROSTELLATO R., COLETTA A., DACASTO M., CARNIER P. (2012): *CSN1S1-CSN3 (as1-k-casein) composite genotypes affect detailed milk protein composition of Mediterranean water buffalo*, «Journal of Dairy Science», 95, pp. 6801-5.
- BOULANGER A., GROSCLAUDE F., MAHÈ M.F. (1984): *Polymorphisme des caseines as1 et as2 de la chèvre (Capra hircus)*, «Genetics Selection Evolution», 16, pp. 157-75.
- BOUNIOU C., BRIGNON G., MAHÈ M.F., PRINTZ C. (1994): *Biochemical and genetic analysis of variant C of caprine as2-casein (Capra hircus)*, «Animal Genetics», 25, pp. 173-7.
- CAO X., WANG Q., YAN J.B., YANG F.K., HUANG S.Z., ZENG Y.T. (2002): *Molecular*

- cloning and analysis of bovine prolactin full-long genomic as well as cDNA sequences*, «Yi Chuan Xue Bao», 29 (9), pp. 768-73.
- CAROLI A.M., CHessa S., ERHARDT G.J. (2009): *Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition*, «Journal of Dairy Science», 92 (11), pp. 5335-52.
- CHEN X., GAO C., LI H., HUANG L., SUN Q., DONG Y., TIAN C., GAO S., DONG H., GUAN D., HU X., ZHAO S., LI L., ZHU L., YAN Q., ZHANG J., ZEN K., ZHANG C.Y. (2010): *Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products*, «Cell Research», 20 (10), pp. 1128-37.
- CHU M.X., MU Y.L., FANG L., YE S.C., SUN S.H. (2007): *Prolactin receptor as a candidate gene for prolificacy of small tail han sheep*, «Animal Biotechnology», 18 (1), pp. 65-73.
- CHORLEY B.N., WANG X., CAMPBELL M.R., PITTMAN G.S., NOUREDDINE M.A., BELL D.A. (2008): *Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies*, «Mutation Research», 659, pp. 147-57.
- COSENZA G., PAUCIULLO A., COLIMORO L., MANCUSI A., A. RANDO A., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2007): *A SNP in the goat CSN2 promoter region is associated with the absence of b-casein in the milk*, «Animal Genetics», 38, pp. 655-68.
- COSENZA G., PAUCIULLO A., FELIGINI M., COLETTA A., COLIMORO L., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2009): *A point mutation in the splice donor site of intron 7 in the as2-casein encoding gene of the Mediterranean River buffalo results in an allele-specific exon skipping*, «Animal Genetics», 40 (5), p. 791.
- COSENZA G., APICELLA E., PAUCIULLO A., RUBESSA M., PALMIERI N., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2013): *Genetic variability of Prolactin (PRL) and Prolactin Receptor (PRLR) genes in the Italian Mediterranean river buffalo*, 10th World Buffalo Congress and the 7th Asian Buffalo Congress, 6th - 8th May, Phuket, Thailand, 96.
- COSENZA G., PAUCIULLO A., MACCIOTTA N.P.P., APICELLA E., STERI R., LA BATTAGLIA A., JEMMA L., COLETTA A., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2015): *Mediterranean River Buffalo CSN1S1 gene: search for polymorphisms and association studies*, «Animal Production Science», 55 (5), pp. 654-60.
- COSENZA G., IANNACCONI M., PICO B.A., RAMUNNO L., CAPPARELLI R. (2016a): *The SNP g1311T>C associated with the absence of β -casein in goat milk influences CSN2 promoter activity*, «Animal Genetics», in press.
- COSENZA G., MACCIOTTA N.P.P., NUDDA A., COLETTA A., LUIGI RAMUNNO, PAUCIULLO A. (2016b): *A novel polymorphism in the Oxytocin receptor encoding gene (OXTR) affects milk fatty acid composition in Italian Mediterranean river buffalo*, «Journal of Dairy Research», submitted.
- COSENZA G., ZICARELLI L., MACCIOTTA N.P.P., RAMUNNO L., PAUCIULLO A. (2016c): *Individual dairy curd production and association analysis with 14 candidate genes in Italian buffalo*, EAAP 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Belfast UK, 29 Aug-2 Sept, submitted.
- D'AMBROSIO C., ARENA S., SALZANO A.M., RENZONE G., LEDDA L., SCALONI A. (2008): *A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens*, «Proteomics», 8 (17), pp. 3657-66.
- GALLAGHER D.S., SCHELLING C.P., GROENEN M. M. WOMACK J.E. (1994): *Confirmation that the casein gene cluster resides on cattle chromosome 6*, «Mammalian Genome», 5, p. 524.
- GIAMBRA I.J., CHIANESE L., FERRANTI P., ERHARDT G. (2010): *Short communication: mo-*

- lecular genetic characterization of ovine alpha(S1)-casein allele H caused by alternative splicing, «Journal of Dairy Science», 93 (2), pp. 792-5.
- GIACINTI G., BASIRICÒ L., RONCHI B., BERNABUCCI U. (2013): *Lactoferrin concentration in buffalo milk*, «Italian Journal of Animal Science», 12:e23, pp. 139-43.
- GUO B.L., JIAO Y., HE C., WEI L.X., CHANG Z.H., YUE X.P., LAN X.Y., CHEN H., LEI C.Z. (2010): *A novel polymorphism of the lactoferrin gene and its association with milk composition and body traits in dairy goats*, «Genetics and Molecular Research», 9, pp. 2199-2206.
- GUTIÉRREZ-GIL B., WIENER P., RICHARDSON R.I., WOOD J.D., WILLIAMS J.L. (2010): *Identification of QTL with effects on fatty acid composition of meat in a Charolais x Holstein cross population*, «Meat Science», 85 (4), pp. 721-9.
- HOHJOH H., TOKUNAGA K. (2001): *Allele-specific binding of the ubiquitous transcription factor OCT-1 to the functional single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the tumor necrosis factor-alpha gene (TNFA) promoter*, «Genes & Immunity», 2, pp. 105-9.
- IANNUZZI L., DI MEIO G.P., PERUCATTI A., SCHIBLER L., INCARNATO D., GALLAGHER D., EGGEN A., FERRETTI L., CRIBIU E.P., WOMACK J. (2003): *The river buffalo (Bubalus bubalis, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding*, «Cytogenetic and Genome Research», 102, pp. 65-75.
- KANG J.F., LI X.L., ZHOU R.Y., LI L.H., FENG F.J., GUO X.L. (2008): *Bioinformatics analysis of lactoferrin gene for several species*, «Biochemical Genetics», 46, pp. 312-22.
- KUSS A.W., GOGOL J., GEIDERMAN H. (2003): *Associations of a polymorphic AP-2 binding site in the 5'-flanking region of the bovine beta-lactoglobulin gene with milk proteins*, «Journal of Dairy Science», 86 (6), pp. 2213-8.
- LAGONIGRO R., PIETROLÀ E., D'ANDREA M., VELTRI C., PILLA F. (2001): *Molecular genetic characterization of the goat as2-casein E allele*, «Animal Genetics», 32 (6), pp. 391-3.
- LEE T.H., SHIMAZAKI K., YU S.L., NAM M.S., KIM S.J., LEE K.K., YU D.Y. (1997): *Polymorphic sequence of Korean native goat lactoferrin exhibiting greater antibacterial activity*, «Animal Genetics», 28, pp. 367-9.
- LI G.H., ZHANG Y., SUN D.X., LI N. (2004): *Study on the polymorphism of bovine lactoferrin gene and its relationship with mastitis*, «Animal Biotechnology», 15, pp. 67-76.
- LIEFERS S.C., VEERKAMP R.F., TE PAS M.F., DELAUD C., CHILLIARD Y., PLATJE M., VAN DERLENDE T. (2005): *Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows*, «Animal Genetics», 36 (2), pp. 111-8.
- LÜ A., HU X., CHEN H., DONG Y., PANG Y. (2011a): *Single nucleotide polymorphisms of the prolactin receptor (PRLR) gene and its association with growth traits in Chinese cattle*, «Molecular Biology Reports», 38, pp. 261-6.
- LÜ A., HU X., CHEN H., DONG Y., ZHANG Y., WANG X. (2011b): *Novel SNPs of the bovine PRLR gene associated with milk production traits*, «Biochemical Genetics», 49, pp. 177-89.
- MOIOLI B., SCATÀ M. C., MATTEIS G. DE, ANNICCHIARICO G., CATILLO G., NAPOLITANO F. (2013): *The ACACA gene is a potential candidate gene for fat content in sheep milk*, «Animal Genetics», 44, pp. 601-3.
- ORDOVÁS L., ROY R., PAMPÍN S., ZARAGOZA P., OSTA R., RODRÍGUEZ-REY J.C., RODELAR C. (2009): *The g.763G>C SNP of the bovine FASN gene affects its promoter activity via Sp-mediated regulation: implications for the bovine lactating mammary gland*, «Physiological Genomics», 34 (2), pp. 144-8.
- PARLATO E., ZICARELLI L. (2015): *Genetic Parameters and Sire Ranking for the Adjust-*

- ed Estimate of Mozzarella Cheese Production in Italian Mediterranean Buffalo*, «Journal Advances in Dairy Research», 3, p. 148.
- PAUCIULLO A., COSENZA G., STERI R., COLETTA A., JEMMA L., FELIGINI M., DI BERARDINO D., MACCIOTTA N.P.P., RAMUNNO L. (2012a): *An association between Single Nucleotide Polymorphisms at the Oxytocin locus and milk yield and flow in Italian Mediterranean river buffalo*, «Journal of Dairy Research», 79 (2), pp. 150-6.
- PAUCIULLO A., COSENZA G., STERI R., COLETTA A., LA BATTAGLIA A., DI BERARDINO D., MACCIOTTA N.N.P., RAMUNNO L. (2012b): *A single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of River buffalo Stearoyl CoA Desaturase gene (SCD) is associated with milk yield*, «Journal of Dairy Research», 79 (4), pp. 429-35.
- PAUCIULLO A., RAMUNNO L., MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., COLETTA A., APICELLA E., GALLO D., COSENZA G. (2016): *Genetic variability detected at the lactoferrin locus (LTF) in the Italian Mediterranean river buffalo*, «Animal Production Science», 56 (1), pp. 102-7.
- RAMUNNO L., COSENZA G., RANDO A., MACCIOTTA N.P.P., PAPPALARDO M., MASINA P. (1997): *Identification of carriers of the Welsh CASA1 variant using an allele-specific polymerase chain reaction method*, «Animal Genetics», 28, pp. 154-5.
- RAMUNNO L., LONGOBARDI E., PAPPALARDO M., RANDO A., DI GREGORIO P., COSENZA G., MARIANI P., PASTORE N., MASINA P. (2001a): *An allele associated with a non detectable amount of α s2 casein in goat milk*, «Animal Genetics», 32 (1), pp. 19-26.
- RAMUNNO L., COSENZA G., PAPPALARDO M., LONGOBARDI E., GALLO D., PASTORE N., DI GREGORIO P., RANDO A. (2001b): *Characterization of two new alleles at the goat CSN1S2 locus*, «Animal Genetics», 32 (5), pp. 264-8.
- RAMUNNO L., COSENZA G., RANDO A., PAUCIULLO A., ILLARIO R., GALLO D., DI BERARDINO D., MASINA P. (2005): *Comparative analysis of gene sequence of goat CSN1S1 F and N alleles and characterization of CSN1S1 transcript variants in mammary gland*, «Gene», 345 (2), pp. 289-99.
- RUSSO V., FONTANESI L., DOLEZAL M., LIPKIN E., SCOTTI E., ZAMBONELLI P., DALL'OLIO S., BIGI D., DAVOLI R., CANAVESI F., MEDUGORAC I., FÖSTER M., SÖLKNER J., SCHIAVINI F., BAGNATO A., SOLLER M. (2012): *A whole genome scan for QTL affecting milk protein percentage in Italian Holstein cattle, applying selective milk DNA pooling and multiple marker mapping in a daughter design*, «Animal Genetics», 43 (Suppl 1), pp. 72-86.
- SELVAGGI M., LAUDADIO V., DARIO C., TUFARELLI V. (2014): *Investigating the genetic polymorphism of sheep milk proteins: a useful tool for dairy production*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 94, pp. 3090-9.
- TERMAN A. (2005): *Effect of the polymorphism of prolactin receptor (PRLR) and leptin (LEP) genes on litter size in Polish pigs*, «Journal of Animal Breeding and Genetics», 122 (6), pp. 400-4.
- THREADGILL D.W., WOMACK J.E. (1990): *Genomic analysis of the major bovine milk protein genes*, «Nucleic Acids Research», 18, pp. 6935-42.
- VOGEL H.J., SCHIBLI D., JING W., LOHMEIER-VOGEL E.M., EPAND R.F., EPAND R.M. (2002): *Towards a structure function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan and arginine containing peptides*, «Biochemistry and Cell Biology», 80, pp. 49-63.
- VARRICCHIO M.L., DI FRANCIA A., MASUCCI F., ROMANO R., PROTO V. (2007): *Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat*, *Proceedings of the 17th ASPA Congress*, Alghero, May 29-June 1, Vol 6, 1s.
- WATERS S.M., MCCABE M.S., HOWARD D.J., GIBLIN L., MAGEE D.A., MACHUGH D.E.,

- BERRY D.P. (2010): *Bos taurus growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle*, «Animal Genetics», 42, pp. 39-49.
- WANG X.T. TOMSO D.J. LIU X.M. BELL DOUGLAS A. (2005): *Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes*, «Toxicology and Applied Pharmacology», 207, S84-S90.
- YANG S., LI C., XIE Y., CUI X., LI X., WEI J., ZHANG Y., YU Y., WANG Y., ZHANG S., ZHANG Q., SUN D. (2015): *Detection of functional polymorphisms influencing the promoter activity of the SAA2 gene and their association with milk production traits in Chinese Holstein cows*, «Animal Genetics», 46, pp. 591-8.
- ZIDI A., FERNÁNDEZ-CABANÁS V.M., URRUTIA B., CARRIZOSA J., POLVILLO O., GONZÁLEZ-REDONDO P., JORDANA J., GALLARDO D., AMILLS M., SERRADILLA J.M. (2010): *Association between the polymorphism of the goat stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1) gene and milk fatty acid composition in Murciano-Granadina goats*, «Journal of Dairy Science», 93 (9), pp. 4332-9.

Ricerca e impiego di associazioni tra loci SNP e caratteri quantitativi e qualitativi della produzione di latte negli ovini e nei caprini

Responsabile Scientifico:

Prof. Fabio Pilla, *Università degli Studi del Molise*

Come indicato nella scheda c del progetto relativa all'unità operativa ovini e caprini le attività si sono suddivise in tre campi di indagine e cioè:

1. La ricerca dei determinanti genetici delle caratteristiche quanti qualitative del latte ovino con particolare riferimento al profilo degli acidi grassi. Questa attività si è svolta nel nucleo di selezione della pecora Comisana di Asciano.
2. La ricerca di associazione tra polimorfismi ai loci SNP e Estimated breeding value (EBV) in arieti di razza Sarda
3. La analisi della variabilità genetica delle popolazione caprine italiane

Di seguito si riportano le relazioni riassuntive delle attività svolte per le tre attività

RICERCA DEI DETERMINANTI GENETICI DELLE CARATTERISTICHE QUANTI QUALITATIVE DEL LATTE OVINO, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AL PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI, NEL NUCLEO DI SELEZIONE DELLA RAZZA COMISANA DI ASCIANO

La ricerca si è svolta sotto la responsabilità dell'unità operativa dell'Università degli Studi del Molise in collaborazione con l'unità operativa dell'Università degli Studi di Sassari (prof. Nicola Macciotta e Dott. Giustino Gaspa) e l'Associazione Nazionale della Pastorizia. Le attività si sono svolte nel nucleo di selezione della razza Comisana di Asciano. L'obiettivo operativo dello studio è stato quello di fornire strumenti innovativi per la selezione nella razza Comisana in riferimento anche alle caratteristiche funzionali del latte.

Introduzione

La composizione acidica del latte ovino ha un impatto rilevante sia sulla salute umana. La composizione del grasso del latte è tuttavia un fenotipo estremamente complesso. Infatti, la biosintesi di grasso di latte è un processo regolato da una rete di geni che agiscono congiuntamente in maniera articolata. La recente disponibilità di piattaforme high-throughput rappresenta un potente strumento utile a identificare regioni genomiche associate al profilo acidico del latte. Tuttavia, l'analisi dei dati genomici e fenotipici multimedimensionali, richiede l'utilizzo di approcci statistici in grado di combinare proficuamente queste due fonti di informazione. Obiettivo del presente studio è quello di identificare regioni genomiche associate al profilo acidico del latte di ovini di razza comisana.

Materiali e metodi

Un totale di 198 pecore del nucleo allevamento situato a Asciano (Italia) sono stati genotipizzati con il Illumina BeadChip (54.241 SNPs). In seguito al rimappaggio degli SNP sull'assembly Oar_v3.1 e l'editing dei dati, un totale di 46.465 SNP e 178 animali sono stati utilizzati. Sono stati eliminati dal dataset: SNP con basso call rate, SNP monomorfici, SNP con un $MAF < 0.02$, SNP non mappati su alcun cromosoma. Gli individui sono stati eliminati sulla base del call rate o fenotipi mancanti. I genotipi sono stati codificati in 0,1 o 2 a seconda del numero di copie presenti dell'allele B (codifica A/B).

Diverse tecniche sono state considerate per ricercare regioni cromosomiche associate al profilo acidico del latte ovino. È stata condotta una analisi genome-wide (GWA) testando su ciascun fenotipo rilevato, l'effetto del genotipo al i -esimo SNP. Tale analisi è stata ripetuta per tutti i marcatori e su tutte le variabili fenotipiche, riportando per ciascuno SNP analizzato il valore di significatività, come indice dell'associazione tra quel dato SNP e la variabile del profilo acidico considerata. I dati sono stati analizzati utilizzando il package GenABEL sul l'ambiente statistico R.

Inoltre è stata testata l'Analisi Canonica Discriminante (CDA). La CDA è una tecnica di classificazione i cui obiettivi principali sono: a) la valutazione dell'adeguatezza della classificazione, dato un gruppo di variabili discriminanti (le variabili del profilo acidico nel nostro caso); b) assegnazione a ciascuna nuova osservazione del suo gruppo di appartenenza (es. genotipo a ciascuno delle migliaia di loci analizzati). In questo contesto il motivo dell'u-

ACIDI GRASSI	MEDIA	DS
C4	4.08	0.86
C6	2.08	0.35
C8	1.71	0.35
C10	4.82	1.07
C10:1c9	0.17	0.06
C12	2.76	0.46
C14	8.53	0.91
C16	22.71	1.69
C16:1c9	1.10	0.21
C18	9.58	1.37
C18:1c9	20.78	20.78
C18:1t11	1.94	0.42
C18:2c9c12	2.54	0.27
CLA_c9t11	1.47	0.35
C18:3w3	1.20	0.15
SFA	63.21	3.00
UFA	34.89	2.66
PUFA	6.99	0.68
MUFA	27.90	2.28
PUFAn6	3.71	0.38
PUFAn3	1.96	0.18
trans18:1:tot	3.34	0.56
trans:totali	4.33	0.70
UFA:SFA	0.56	0.06
PUFA:SFA	0.11	0.01
n6:n3	1.90	0.10

Tab. 1 *Composizione acidica del latte*

so della CDA è stato quello di identificare le regioni genomiche associate al profilo acidico del latte. Per perseguire questo obiettivo, i genotipi sono stati usati come variabili di classificazione e il profilo acidico è stato utilizzato per stimare le funzioni canoniche in grado di discriminare gli individui con genotipo diverso. Una CDA è stata eseguita per ogni SNP. La capacità del profilo acidico di discriminare tra gli animali che hanno ereditato alleli diversi è stata valutata mediante applicazione di alcune statistiche multivariate, tra cui il lambda di Wilks 'calcolato per ciascun locus. Il coefficiente canonico è stato analizzato all'identità peso delle diverse componenti dello spettro acidico nella composizione funzione canonica.

Sono stati analizzati i profili acidici delle 178 pecore, costituiti da 67 variabili (escluse le somme di acidi grassi e gli indici di desaturazione). Successivamente, dallo spettro acidico completo è stato selezionato un numero ridotto

SNP	Carattere	OAR	Position	A1	A2	effB	Se_effB	P-valueC
s67860.1	CLA9:11ct	1	133297994	G	A	0.107	0.029	0.000212
OAR1:193374638.1	C18:1c9		179249019	T	C	0.598	0.176	0.000657
s22689.1	C18:1c9	2	10835399	G	A	-0.58	0.171	0.000736
s14482.1	CLA9:11ct		16805125	G	A	0.261	0.059	9.91E-06
OAR2:19594087.1	CLA9:11ct		19272653	A	G	-0.1	0.025	4.37E-05
OAR2:137836346.1	C18:1c9		129471116	A	C	-0.58	0.163	0.000361
OAR2:253423292.X.1	C18:3n3		239958619	A	G	0.098	0.027	0.000327
OAR3:20564807.1	C18:1c9	3	19046200	T	A	-0.68	0.185	0.000249
OAR3:20564807.1	C18:3n3		19046200	T	A	-0.05	0.013	0.000361
s69717.1	C18:1c9		19111601	T	C	-0.74	0.199	0.000197
s69717.1	C18:3n3		19111601	T	C	-0.06	0.014	7.55E-05
OAR3:117600112.1	C18:3n3		110405090	T	C	0.084	0.023	0.000329
OAR6:26894928.1	CLA9:11ct	6	23513823	A	C	0.085	0.022	0.00011
OAR6:27552838.1	CLA9:11ct		24157625	T	C	0.1	0.024	2.83E-05
OAR6:43537414.1	CLA9:11ct		39155358	G	A	0.199	0.055	0.000307
s46588.1	CLA9:11ct	7	16795415	G	A	0.08	0.023	0.000634
OAR7:73155616.1	CLA9:11ct		66583182	T	G	0.086	0.02	1.88E-05
s63285.1	C18:3n3		84623729	T	C	0.048	0.014	0.000468
OAR8:39459362.1	C18:1c9	8	36792117	A	G	-0.98	0.289	0.000703
OAR10:94082916.1	C18:1c9	10	86367107	T	C	0.742	0.211	0.00043
OAR11:31486316.1	CLA9:11ct	11	29828994	G	A	0.128	0.034	0.000165
s00011.1	C18:3n3		55675190	T	C	-0.04	0.013	0.000396
s54595.1	C18:1c9	13	69181790	C	T	-0.59	0.174	0.000671
OAR13:88133751.1	C18:3n3		82069140	C	T	-0.08	0.021	0.000305
OAR14:58084909.1	C18:1c9	14	54913688	T	C	-0.84	0.25	0.000812
OAR15:89441287.1	CLA9:11ct	15	80032943	T	G	0.135	0.037	0.000286
s43497.1	C18:3n3	17	62581376	C	A	-0.06	0.017	0.000275
s43497.1	PUFA:n3		62581376	C	A	-0.07	0.021	0.000531
s37770.1	C18:3n3	18	16551660	C	T	0.047	0.013	0.000317
OAR18:44151635.1	C18:1c9		41525466	A	C	0.646	0.167	0.000109
s12851.1	C18:3n3	25	41600515	C	T	0.043	0.012	0.00026

Tab. 2 *Analisi genome-wide sul profilo acidico del latte ovino di razza comisana*

di variabili per ulteriori l'analisi con la CDA (17 variabili in tutto, tab. 1). I fenotipi grezzi sono stati corretti per l'effetto fisso dell'ordine di parto, dei giorni di lattazione, e per l'effetto casuale dell'animale, previsto attraverso l'inserimento della matrice di parentela genomica. Per tutti gli acidi grassi analizzati, i residui del modello precedente sono stati utilizzati i) singolarmente nella GWA, ii) come un fenotipo multidimensionali nella CDA.

Dall'analisi GWA sono risultati significativi per alcuni acidi grassi di interesse per la salute sono stati riportati nella tabella 2. Alcuni marcatori sono

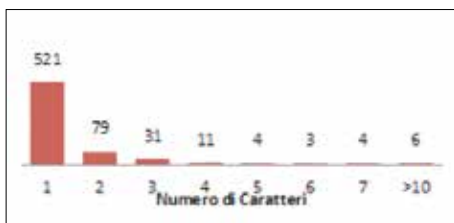


Fig. 1 *Numero di marcatori che influenzano più caratteri*

risultati significativi per più di un acido grasso dello spettro acido. In particolare 6 Marcatori sono risultati significativi per più di 10 acidi grassi. La distribuzione del numero di Marcatori che influenzano più di un carattere è riportata nella figura 1.

Per quanto riguarda l'applicazione della CDA, Sono stati individuati 24 SNP (in 10 cromosomi), i cui genotipi sono stati fortemente discriminati utilizzando la funzione canonica di profilo acido. In particolare alcuni di questi marcatori SNP erano vicini a geni precedentemente segnalati per influenzare la composizione del grasso del latte. Alcuni esempi sono SNP OAR3_184274860 (171.674.185 bp) vicino a IGF1 situato a OAR3 (171,252,000bp); s29492 (64.853.293 bp), vicino a GHRHR (65.348.751 bp) sul OAR4 e OAR14_37391612 (35.940.842 bp) vicino a LCAT (34,760,867bp) su OAR14.

RICERCA DI ASSOCIAZIONE TRA POLIMORFISMI AI LOCI SNP E ESTIMATED BREEDING VALUE (EBV) IN ARIETI DI RAZZA SARDA

Le attività sono state svolte da Agris Sardegna sotto la direzione del dott. Antonello Carta. L'obiettivo generale dell'attività è stato quello di contribuire alla tipizzazione genetica della popolazione di arieti in selezione nella razza Sarda. Le attività sono in corso con l'analisi degli arieti scelti secondo la procedura di seguito riportata.

Scelta arieti da analizzare con impatto sulla popolazione Sarda

Criterio d'impatto (CG)

A ciascun ariete è stato attribuito un valore pari alla somma del suo contributo parentale in ciascuna primipara del 2011 (es. 0.5 se figlia, 0.25 se nipote, 0.0125 se bisnipote, fino a 0.03125 per la quaternipote).

Con questo criterio sono stati selezionati 4955 arieti con CG>0.

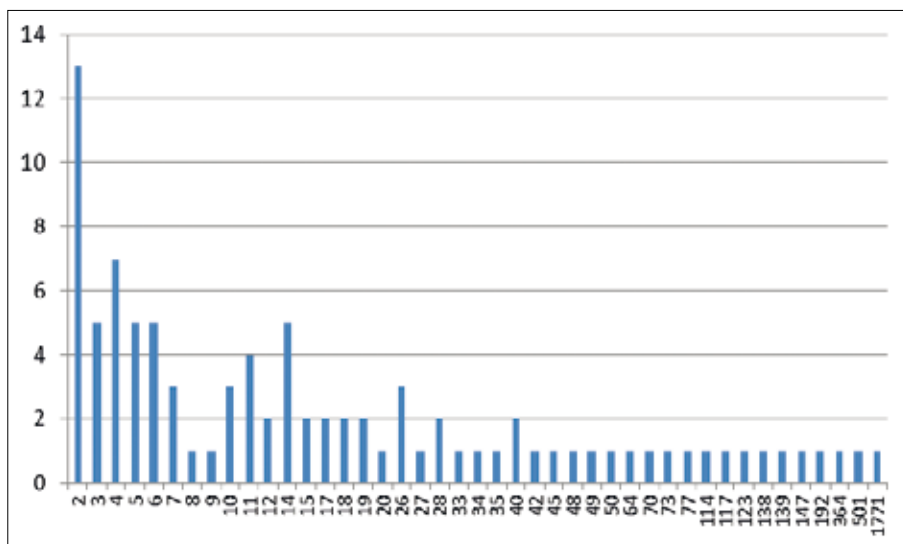


Fig. 2 Numero di cluster per classe di consistenza

Clusterizzazione

I 4955 arieti sono stati clusterizzati in funzione del loro coefficiente di parentela (CP). La procedura prevede l'unione in un cluster dei due arieti con il maggiore CP. Dopo la formazione del cluster il CP tra gli arieti rimasti fuori e il cluster formato è stato calcolato come media del CP fra gli arieti interni al cluster e ciascun ariete esterno considerato. Successivamente la procedura continua sempre con lo stesso criterio unendo i 2 arieti o cluster con CP maggiore. La procedura si è arrestata a un soglia di CP pari a 0.015, significa che il CP tra 2 arieti all'interno di un cluster è ≥ 0.015 mentre tra un ariete del cluster e uno esterno è < 0.015 .

Alla fine della procedura sono stati formati 93 cluster con un numero di arieti compreso tra 2 e 1771 (fig. 1).

Scelta

Per la scelta degli arieti sono stati considerati solo quelli all'interno di cluster che avessero un numero totale di arieti superiore a 5 e che fossero nati in Sardegna per un totale di 63 cluster e 4310. Dovendo scegliere 1000 arieti da chippare è stato scelto il migliore 23% ($1000/4310$) di ogni cluster secondo il più elevato CG (portati a 1231 per riserva).

Dei 1231 sono stati già chippati 84 arieti come padri di Monastir o 100 arieti mentre di 557 si dispone del campione di pelo

Tracciato record file “cluster.exe” sheet1

prcl7	Progressivo cluster alla soglia 0.015
ncl7	Numero arieti compresi nel cluster alla soglia 0.015
matricola	Matricola ariete
annas	anno di nascita
mcp	media parentela con tutti gli altri arieti (x100000)
cg	contributo parentale con primipare 2011
sce	selezionato = 1; scartato = 0.
chip	1 se chippato

ANALISI DELLA VARIABILITÀ GENETICA DELLE POPOLAZIONE CAPRINE ITALIANE ATTIVITÀ SVOLTE SULLA SPECIE CAPRINA

Prof. Paola Crepaldi*

(Dr. Stefania Chessa°, Dr. Letizia Nicoloso* Dott.ssa B. Coizet*, Dott. A. Talenti*, Dott. S. Frattini*)

* *UNIMI, Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità pubblica*

° *CNR, Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria*

L'attività svolta nell'ambito della UO coordinata dal Prof. Pilla in *Capra hircus* si è concentrata principalmente su una iniziativa che, come comunicato fin dall'inizio delle attività, andava a modificare in senso migliorativo quanto originariamente descritto dal piano operativo dell'unità.



Fig. 3 Home page del sito e istituzioni coinvolte nell'Italian Goat Consortium

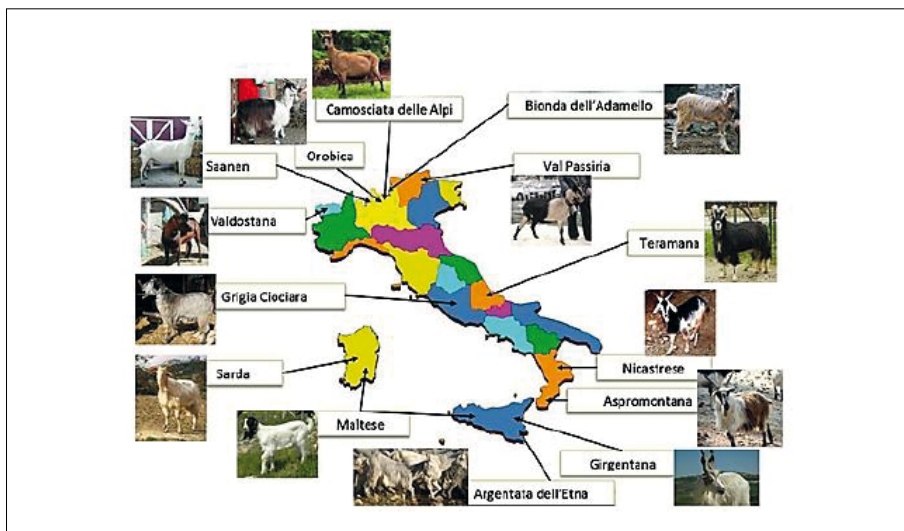


Fig. 4 Distribuzione geografica delle razze analizzate

Si è infatti reso disponibile a livello internazionale (*International Goat Genome consortium*) un nuovo strumento genomico per la specie caprina: un pannello di marcatori a singolo nucleotide (SNP) a media densità -50K (Tosser-Klopp et al., 2014) che promette di offrire ricadute genomiche fino a pochi anni fa impensabile per questa specie.

Il progetto INNOVAGEN ha inoltre contribuito a fondare l'*Italian Goat Consortium*, volto a raggruppare competenze e risorse locali per una caratterizzazione genomica delle razze caprine allevate in Italia. Il Consorzio riunisce oggi 11 istituzioni fra Università, Centri di ricerca, laboratori specializzati e Associazioni di Allevatori interessati allo sviluppo di questo progetto. È stato anche creato un sito web (www.goatit.eu) in Italiano e Inglese per valorizzare il lavoro svolto e le popolazioni studiate e per garantire gli scambi di materiale e informazioni fra le istituzioni coinvolte.

Abbiamo genotipizzato con il chip a media densità 350 animali appartenenti a 14 razze allevate in Italia: Camosciata delle Alpi, Saanen, Orobica, Valdostana, Bionda dell'Adamello, Val Passiria, Teramana, Grigia Ciociara, Aspromontana, Nicaresc, Sarda, Maltese, Argentaia dell'Etna, Gergentana.

Questo ha permesso di valutare il make up genetico delle razze studiate evidenziando l'originalità genetica di alcune, il livello di admixture di altre e i pattern geografici, così come evidenziato dall'analisi svolta con il software Admixture (fig. 4).

I risultati ottenuti sono stati presentati nell'ambito di congressi Internazionali e Nazionali e in pubblicazioni scientifiche Internazionali. Inoltre i

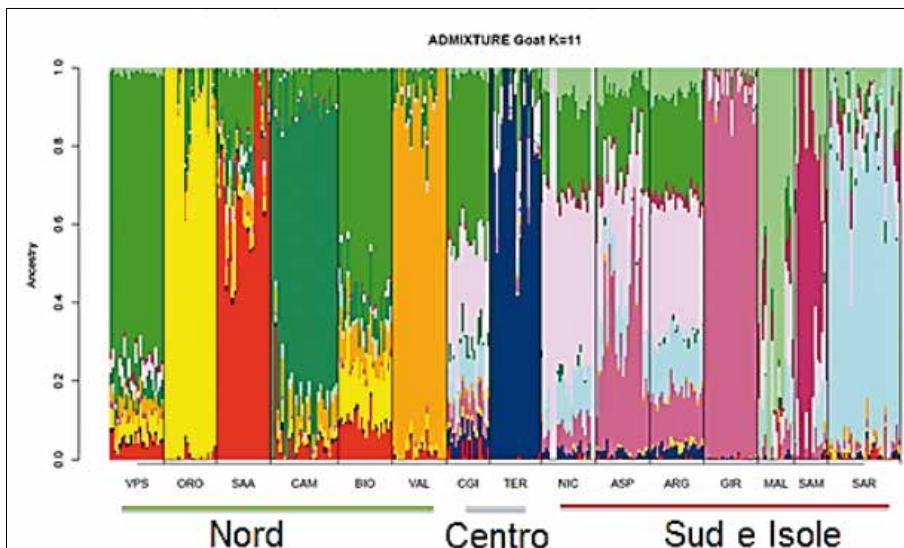


Fig. 5 Risultati dell'analisi con il software Admixture per le popolazioni caprine studiate. I diversi colori rappresentano i background genetici di ciascuna razza

risultati con una panoramica delle possibili applicazioni, analisi di parentela, tracciabilità dei prodotti e individuale sono stati presentati agli operatori del settore durante l'**Incontro Nazionale ESPERTI Settore Caprino ASSONAPA** (Negrini R., Pagnacco G., Crepaldi P.) svoltosi presso l'Università degli Studi di Milano il 25 maggio 2015.

I dati prodotti hanno consentito infine di sviluppare collaborazione con altri ricercatori sia nell'ambito del Progetto Innovagen sia in ambito Internazionale. L'*Italian Goat Consortium* ha aderito a un progetto internazionale "ADAPTmap" che, con lo stesso spirito collaborativo del consorzio Italiano, riunisce i ricercatori di oltre 17 paesi di tutti i continenti, interessati allo studio dei dati genomici della specie caprina su tutte le razze per le quali sono disponibili informazioni genomiche.

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI E DELLE PARTECIPAZIONI A CONGRESSI INTERNAZIONALI E NAZIONALI

Presentazioni a congressi internazionali a invito

XI International Conference on Goat 2012: *The characterization of goat genetic diversity: towards a genomic approach*, Gran Canaria, Spain.

- XXII Plant and Animal genome 2013: *Molecular insight into goat diversity*, S. Diego, CA.
 XXIII Plant and Animal genome 2014: *Progress in genomic analysis of Italian goat populations*, S. Diego, CA.
 Livestock Genomic Resources in a Changing World Conference: *The coalition between Italian goats and Italian researchers: the Italian Goat Consortium*, Cardiff, 17-19 June 2014.

Pubblicazioni in riviste internazionali

- CREPALDI P., NICOLOSO L., COIZET B., MILANESI E., PAGNACCO G., FRESI P., DiMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Association of acetyl coenzyme A carboxylase alpha, stearyl coenzyme A desaturase and lipoprotein lipase genes with dairy traits in Alpine goats*, «J. Dairy Science», 96, pp. 1856-1864.
 AJMONE-MARSAN, P., COLLI, L., HAN, J. L., ACHILLI, A., LANCIONI, H., JOOST, S., CREPALDI, P., PILLA, F., STELLA, A., TABERLET, P., BOETTCHER, P., NEGRINI, R., LENSTRA, J. A., ITALIAN GOAT CONSORTIUM, ECONOGENE CONSORTIUM, GLOBALDIV CONSORTIUM (2014): *The characterization of goat genetic diversity: towards a genomic approach*, «Small Ruminant Research», 121, 1, pp. 58-72.
 NICOLOSO L., BOMBA L., COLLI L., NEGRINI R., MILANESI M., MAZZA R., SECHI T., FRATTINI S., TALENTI A., COIZET B., CHESSA S., MARLETTA D., D'ANDRA M., BORDONARO S., PTAK G., CARTA A., PAGNACCO G., VALENTINI A., PILLA F., AJMONE MARSAN P., CREPALDI P. AND THE ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2015): *Genetic diversity of italian goat breeds assessed with a medium density SNP chip*, «Genetic Selection Evolution», Near Accepted.

Convegni Nazionali

- CREPALDI P., BORDONARO B., CHESSA S., COIZET B., COLLI L., D'ANDREA MS., MAZZA R., MIARI S., MURRU S., NICOLOSO L., PAGNACCO G., PTAK G., PILLA F., SECHI T., VALENTINI A. ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2013): *A first overview of genetic variability using a medium density single nucleotide polymorphism array*, XX Congresso ASPA, Associazione per la Scienza e le Produzioni Animali Bologna, 11-13 Giugno.
 NICOLOSO L., PILLA F., CREPALDI P. AND ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2014): *Analisi genomica di 14 razze caprine Italiane*, XXI CONGRESSO NAZIONALE S.I.P.A.O.C. Società Italiana di Patologia e Allevamento degli Ovini e dei Caprini 9/12 settembre - Foggia.
 TALENTI A., NICOLAZZI E. L., NICOLOSO L., FRATTINI S., COIZET B., CHESSA S., PAGNACCO G., PILLA F., PAOLO AJMONE-MARSAN P., CREPALDI P. AND THE ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2015): *Parentage assessment with 200 single nucleotide polymorphisms on 15 Italian goat breeds*, XXI ASPA Congress, Milan, Italy, 9-12 June.
 SECHI T., USAI M.G., NICOLOSO L., TALENTI A., COIZET B., STEFANO F., PAGNACCO G., CASU S., CARTA A., CREPALDI P., AND THE ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2015): *Genetic variability of the Sardinian goat population assessed by the GoatSNP50 BeadChip*, XXI ASPA Congress, Milan, Italy, 9-12 June.
 TALENTI A., NICOLOSO L., FRATTINI S., COIZET B., D'ANDREA MS., PILLA F., AJMONE MARSAN P., PAGNACCO G., CREPALDI P., ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2015): *Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in Alpine Ibex using the GoatSNP50 Beadchip*, XXI ASPA Congress, Milan, Italy, 9-12 June.

Applicazione di tecniche di genomica strutturale e funzionale per la tipizzazione e selezione del cavallo

Responsabile scientifico:

Maurizio Silvestrelli, *Università di Perugia*

PREMESSA

L'attivazione del Progetto INNOVAGEN è avvenuta in concomitanza con le difficili vicissitudini del settore allevatorio equino che hanno coinvolto, in maniera irrimediabile, l'UNIRE (Unione Nazionale Incremento Razze Equine), Ente preposto alla tutela delle razze Purosangue, Trottatore Italiano e Sella Italiano.

La crisi del settore ha portato alla chiusura dell'Ente stesso e alla istituzione dell'ASSI con legge n.1011 del 15 luglio 2011 e immediata soppressione con legge 135 del 7 Agosto 2012, con passaggio delle competenze al MiPAAF.

Ai fini del progetto, questi cambi di *governance* e rimaneggiamento delle competenze hanno pesantemente e inaspettatamente ostacolato l'attività di campionamento, visto che l'Unità Operativa è strettamente legata al reperimento di materiale biologico e informazioni accessorie ottenibili solo attraverso gli enti sopracitati.

Nonostante ciò, le attività di prelievo e di analisi di laboratorio, per la quasi totalità degli obiettivi pianificati, sono state faticosamente realizzate.

In seguito, sono descritte le attività previste dal progetto originale e le attività aggiuntive che il gruppo ha realizzato nei tre anni di progetto.

Tutte le attività descritte, di seguito dettagliate come "MILESTONES" hanno portato o sono in procinto di portare questa Unità alla pubblicazione di articoli scientifici su riviste internazionali di pregio.

MILESTONE: ANALISI TRASCRITTOMICA
HIGH-THROUGHPUT (RNA-SEQ) IN GARE DA ENDURANCE

Obiettivi

Rispetto ai sistemi di analisi dell'espressione genica utilizzati fino a qualche anno fa, le analisi del trascrittoma attraverso sequenziamento (RNA-Seq) consentono di individuare, al massimo livello di risoluzione, tutti i trascritti presenti in un determinato comparto cellulare, laddove per trascritti si intende sia la parte conosciuta e annotata dei geni protein coding sia la parte inesplorata dei non coding RNA degli RNA antisenso.

L'esercizio strenuo sembrerebbe agire ad esempio, come evidenziato in precedenti indagini svolte dai membri di questa UO (Capomaccio et al., 2010), da innesco per la trascrizione di elementi mobili ripetuti, sequenze molto rappresentate nel genoma di mammiferi e naturalmente in quello equino. È ormai noto che le LINE-1 (tra i retroelementi più abbondanti nel genoma dei mammiferi) possono influenzare l'espressione dei geni che le contengono o delle sequenze a essi fiancheggianti, in vario modo: aumento della metilazione di geni vicini, creazione di splicing alternativi, immissione di segnali di poliadenilazione ecc. Il coinvolgimento dei retro-trasposoni in relazione a diversi tipi di stress è stato infatti oggetto di importanti studi medici che evidenziano una loro attivazione durante fenomeni riconducibili a "stress genotossico" quali esposizione a raggi UV, cancro e stress ossidativo che provoca il danno da ischemia-riperfusion e nell'infarto del miocardico.

Obiettivo del progetto è quindi la caratterizzazione del trascrittoma di PBMCs di cavalli sottoposti a esercizio strenuo al fine di evidenziare nuovi trascritti e modalità di espressione.

Materiali e Metodi

Campionamento

I campioni necessari allo svolgimento di questo esperimento sono costituiti da prelievi di sangue venoso da soggetti selezionati tra atleti top di gare da endurance (prima della gara a riposo, e immediatamente dopo la gara) per monitorare variazioni di espressione genica che sono dovute allo sforzo da esercizio (fig. 1). Nello specifico, due purosangue Arabi che hanno partecipato a una gara internazionale CEI 160Km. In breve, le gare di endurance sono

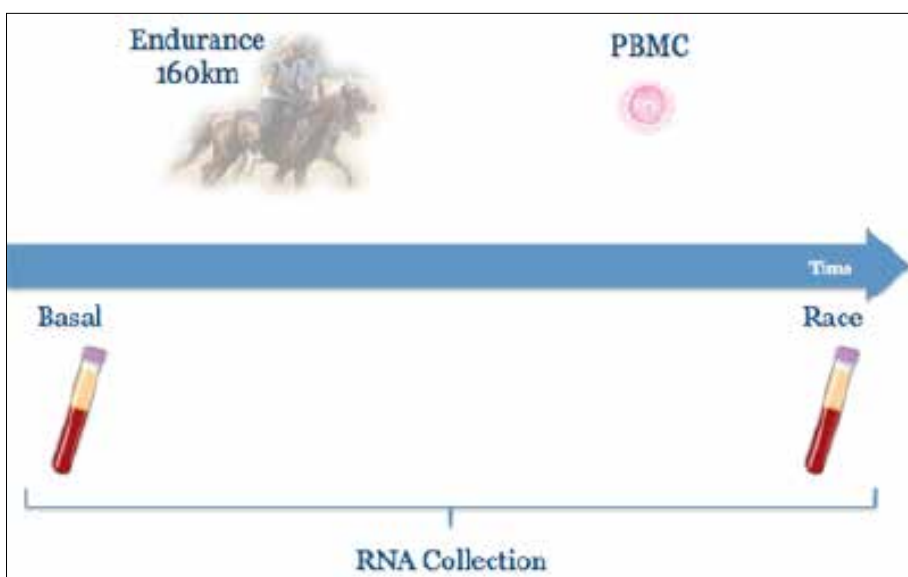


Fig. 1 *Disegno sperimentale*

gare di regolarità/velocità (esiste un'andatura minima) di lunga percorrenza suddivise in tappe (cancelli) volte a valutare lo stato di salute dell'animale che partecipa.

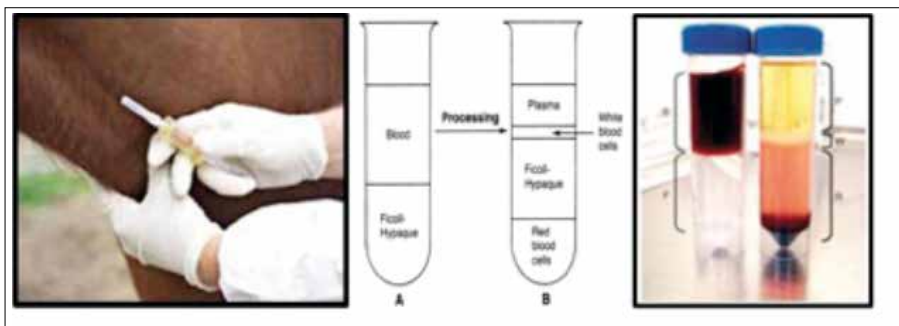


Fig. 2 Separazione dei PBMCs

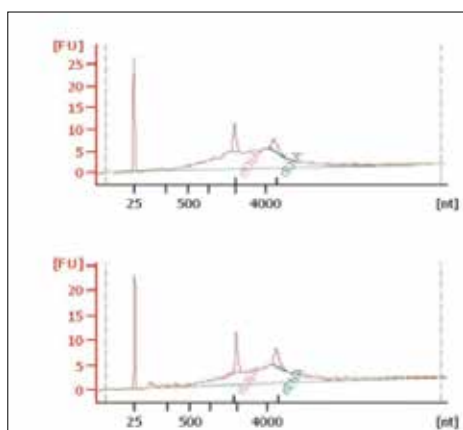


Fig. 3 Elettroforesi microfluidica

Immediatamente dopo il prelievo, i campioni dei due cavalli purosangue arabi (PSA) selezionati per l'esperimento, sono stati sottoposti *in loco* a separazione delle cellule mononucleate del sangue (PBMCs) attraverso centrifugazione su gradiente di Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Pollards Wood, United Kingdom, fig. 2) per evitare possibili *bias* nell'espressione genica dovuti all'eterogeneità delle cellule contenute nel tessuto sanguigno. Una volta ottenute, le cellule sono state immediatamente crioconservate sino allo step di estrazione dell'RNA.

Estrazione dell'RNA

Successivamente alla separazione delle cellule, i campioni sono stati sottoposti a estrazione dell'RNA messaggero con un kit commerciale al fine di ridurre la variabilità dell'estrazione stessa.

L'RNA messaggero è stato vagliato quali-quantitativamente mediante elettroforesi microfluidica (fig. 3). In tutti i campioni è stata riscontrata una

piccola contaminazione di rRNA che però non ha inficiato il risultato di sequenziamento.

Sequenziamento

Tra le piattaforme disponibili per il sequenziamento massivo parallelo è stata scelto il sistema SOLiD per il rapporto tra throughput e costo per sequenza nel momento in cui tale esperimento è stato effettuato. Lo step di sequenziamento, quindi, è stato effettuato sul sistema SOLiD 3 plus con librerie “fragment” direzionate che forniscono letture (reads) da 50 paia di basi (bp) dello stesso orientamento dell’RNA dal quale originano.

Questa strategia di sequenziamento permette l’analisi del trascritto che origina antisense rispetto all’annotazione di riferimento, perfezionando i dati di espressione differenziale e al tempo stesso rivelando nuove tipologie/modalità di trascrizione.

Analisi dei dati

Le letture grezze del sequenziatore sono state sottoposte a una serie di filtri per la qualità al fine di selezionare solo le reads affidabili e filtri per la specificità (es: sono state rimosse le reads che si allineavano con rRNA di cavallo).

Gli allineamenti delle sequenze ottenute sono stati effettuati con PASS (*Program for Aligning Short Sequences*) v 1.6.1 con parametri ottimizzati per genomi eucariotici di grandi dimensioni, usando come reference il genoma equino EquCab2.0 non mascherato. In via conservativa, per la caratterizzazione dei trascritti differenziali e per le successive “conte” delle reads sulle annotazioni di riferimento, sono state utilizzate solamente *reads unique* (sequenze che si allineano una sola volta nel genoma di cavallo).

Risultati

Il sequenziamento delle quattro librerie ha prodotto più di 260 milioni di reads che sono pubblicate in GenBank come “BioProject id: PRJNA196393. I risultati del mappaggio sono riportati in tabella 1.

Abbiamo trovato un forte decremento nella percentuale di reads che mappano nelle regioni esoniche passando dal riposo alla fase dopo lo stress (T1 vs T2 = 35.5% vs. 30%; *p-value* 2e-3), e un significativo aumento nella proporzione di reads nelle regioni introniche (circa 1.4 volte, *p-value* 3.7e-5). Inoltre è stato evidenziato un aumento, seppur meno marcato delle regioni intergeniche (circa 1.2 volte (*p* = 0.058).

Sono stati inoltre individuati 14.429 nuovi siti di splicing di cui 5.551

LIBRARY	PRODUCED READS	FILTERED (LOW QUALITY)	SUITABLE READS	ALIGNED READS	% ALIG- NED	SPLICED READS	UNIQUE READS	ALI- GNMENTS
A T1	85049611	19678362	65371249	25766232	39.42	1337871	22331445	36408516
A T2	74329898	15520649	58809249	24610147	41.85	1146753	22505061	32041310
B T1	55817371	8074602	47742769	20789902	43.55	1052474	17913219	29370920
B T2	53072584	8878519	44194065	18829992	42.61	879531	17198453	24211172

Tab. 1 *Principali risultati dell'esperimento suddivisi per librerie. A = Cavallo A; B = Cavallo B. T1 e T2 sono i tempi (1 a riposo; 2 dopo la gara).*

presenti in entrambi i prelievi, 4.718 solo nei T1 e 4.160 solo nel T2 come sotto riportato in figura 4.

In aggiunta a un importante cambiamento nella trascrizione delle regioni codificanti e non-codificanti, abbiamo anche rilevato un aumento delle L1 e L2 nel dopo gara. Questo sbilanciamento tra prima e dopo la gara è evidente soprattutto per la famiglia L1 e suggerisce il manifestarsi del fenomeno di “esonizzazione”.

Il 17.9% (T1) and 24.7% (T2) delle reads ricade sugli introni indicando che dopo lo stress c'è un cambiamento del 6,8% nella trascrizione di regioni non annotate ($p\text{-value} < 3.7e^{-5}$) come riportato nella figura 5.

Attraverso il pacchetto edgeR abbiamo calcolato i geni differenzialmente espressi tra le due condizioni (Basale e Gara). Rispetto alla prima descrizione indicata nella relazione del primo anno, è stata effettuata un'analisi più selettiva con risultati che vengono di seguito riportati nella tabella seguente.

L'analisi Gene Ontology effettuata con BinGO (plugin di Cytoscape per l'annotazione automatica di liste di geni) e i primi risultati sono coerenti con processi relativi a stress, immunodifesa, trasporto del segnale. L'analisi ha identificato alcuni processi biologici che possono essere riconducibili alla risposta allo stress da esercizio nel cavallo sportivo. Infatti i geni sovra-espressi indicano come più significativo il nodo “risposta allo stress” (146 geni su 457 annotati), seguito da “risposta di difesa”, risposta allo stimolo” e “risposta ai traumi”. I geni sotto-espressi ricadono nella “regolazione positiva dei processi biologici”, “regolazione dei processi del sistema immunitario” e nella “regolazione positiva dei processi cellulari”.

Mediante l'utilizzo della suite Cufflinks è stato possibile dettagliare in modo puntuale come e dove i trascritti si posizionino e a cosa diano vita (es: isoforme, nuovi trascritti etc.). Abbiamo ottenuto in totale 324.446 transfrags, con molti RNA presenti in regioni non codificanti. Nelle regioni intergeniche abbiamo identificato 47.194 elementi trascritti con una lunghezza media di 326 bp, mentre nella regione intronica sono stati evidenziati 80.184

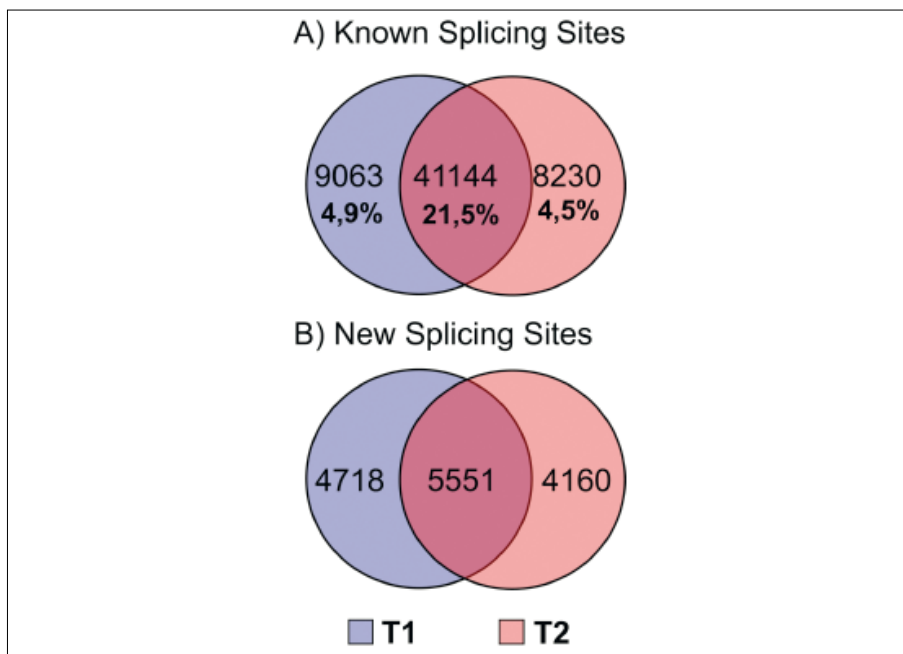


Fig. 4

nuovi trascritti con una lunghezza media di 260 bp. La maggior parte dei frammenti sono espressi a livelli molto bassi come si evince nella figura 6.

In aggiunta abbiamo trovato 779 trascritti intronici e 1.249 intergenici con significative similarità con le sequenze contenute in NONCODE database. Recenti studi dimostrerebbero che queste sequenze rappresentano una nuova classe di RNA non codificanti, tessuto specifiche, in grado di influenzare la trascrizione dei messaggeri. Poiché è complesso determinare se questi trascritti siano realmente non codificanti, e se abbiano funzioni biologiche, ci siamo focalizzati su trascritti che mostravano variazioni di espressione dopo la gara. Sono stati identificati 167 trascritti intergenici e 177 intronici sotto-espressi e 635 e 705 rispettivamente, sovra-espressi. La maggior parte di questi trascritti non aveva omologhi in banca dati, tuttavia 30 trascritti intronici e 39 intergenici hanno mostrato una significativa similarità con lunghe sequenze di RNA non codificante (lncRNA) conosciute. Molti studi dimostrano che gli lncRNA possono influenzare l'espressione genica e determinare stati epigenetici specifici come noi supponiamo realizzarsi in seguito a stress intensi come quelli oggetto del nostro studio.

Abbiamo anche utilizzato il software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) per l'identificazione dei meccanismi biologici, le vie metaboliche e le funzioni più

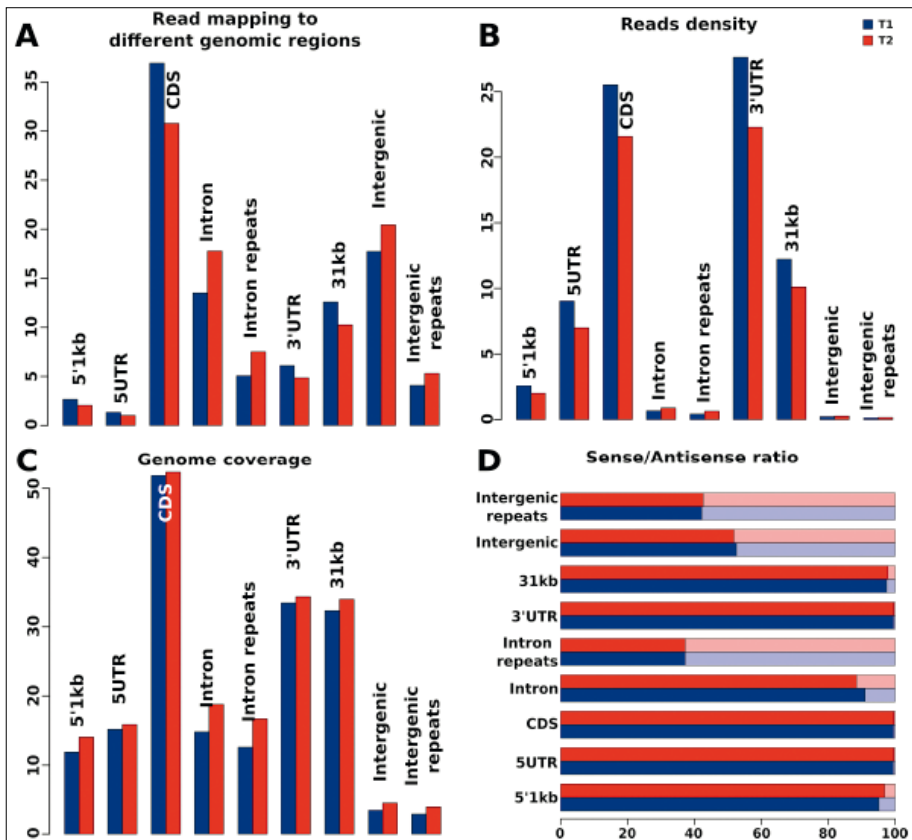


Fig. 5

rilevanti dei geni differenzialmente espressi. I due network più interessanti sono risultati il n°1 “Cellular Function and Maintenance, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function” (punteggio 76), e il n. 2, “Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function” (punteggio 27), focus molecules 43/70). Le due più importanti funzioni biologiche nella categoria “Diseases and Disorders” sono state “inflammatory response” ($1.54E-20 < p\text{-value} < 1.98E-02$) con 154 molecole, e “inflammatory diseases” ($8.92E-13 < p\text{-value} < 1.39E-02$) con 59 molecole. La più importante funzione per la categoria “Molecular and Cellular Functions” è stata “cell-to-cell signaling and interaction” ($1.54E-20 < p\text{-value} < 1.59E-02$) con 137 molecole.

I network e le bio-funzioni riflettono bene due fenomeni osservati durante lo stress da esercizio: l’infiammazione e la trasmissione del segnale tra cellule

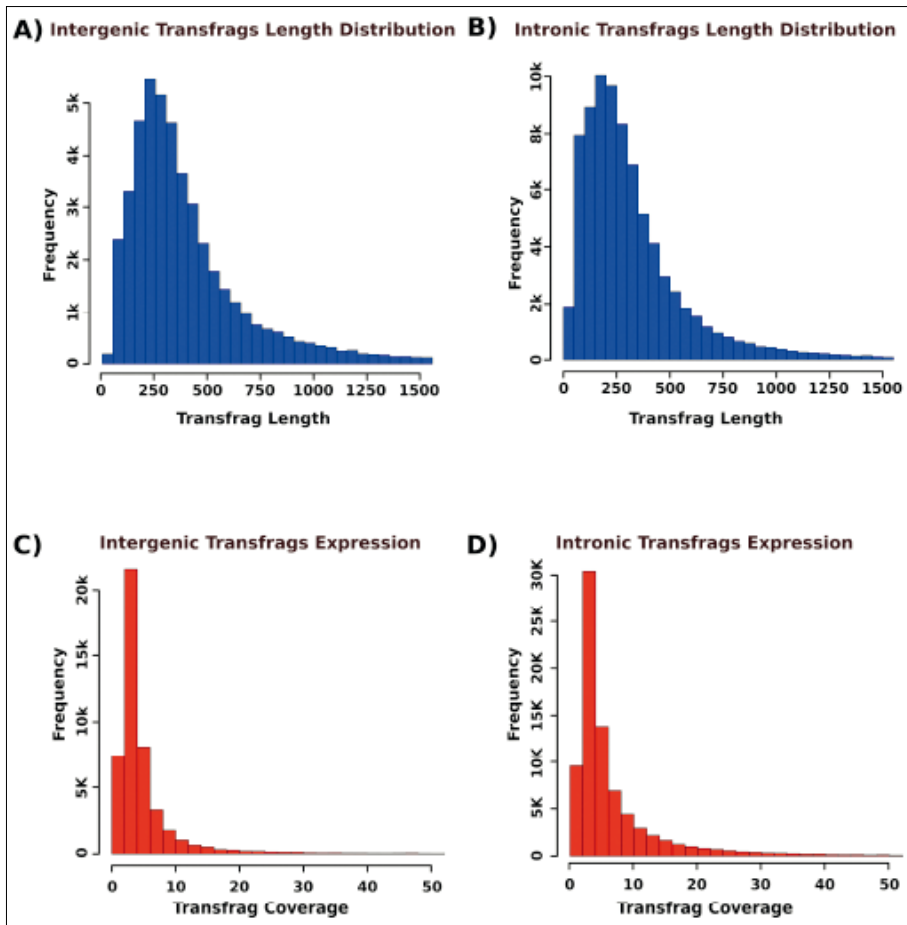


Fig. 6 Lunghezza dei frammenti intergenici e intronici (A e B) e distribuzione di espressione (C e D)

immunitarie. Il Network 1, è composto da geni correlati con la risposta immunitaria, la difesa cellulare, la mitosi, la differenziazione e l'attività delle cellule immunitarie. L'azione pro-infiammatoria di diverse chemiochine e la via metabolica e il pathway di segnale dei recettori di tipo Toll giocano un ruolo centrale e sembrano interagire con regolatori del ciclo cellulare.

I geni del Network 2 sono associate con la risposta infiammatoria, attività cellulare e malattie immunologiche. Questi includono fattori pro-infiammatori correlati al pathway dell'NF- κ B (es., CXCL1, IL1R1, CCR2, TLR1, CCL5) e molecole necessarie per la migrazione dei leucociti durante l'infiammazione (es. ITGAL e MARCO).

Le analisi effettuate evidenziano che il trascrittoma di cavallo sottoposto a sforzo da esercizio strenuo denota una risposta molto complessa in termini di comparti, direzione e rapporti tra trascritti.

Il grande numero di geni differenzialmente espressi, l'aumento dello splicing alternativo (isoforme), la trascrizione delle repeats e non ultimo il contributo della trascrizione antisenso, individuano un campo di indagine intrigante e complesso nella fisiologia dell'esercizio della risposta dell'organismo a esso.

Finalizzazione pubblicazione

Il lavoro preliminare è stato presentato come poster alla Plant & Animal Genome (PAG XX) Conference 2012 Jan 14-18, 2012 in San Diego, CA (United States) con il titolo "Analyses of exercise transcriptome: a next generation sequencing approach".

Il lavoro esteso è pubblicato sulla rivista internazionale PLoS One:

RNA Sequencing of the Exercise Transcriptome in Equine Athletes

Capomaccio S, Vitulo N, Verini-Supplizi A, Barcaccia G, Albiero A, et al. (2013) RNA Sequencing of the Exercise Transcriptome in Equine Athletes. PLoS ONE 8(12): e83504. doi: 10.1371/journal.pone.0083504

MILESTONE

ANALISI TRASCRITTOMICA DI CAVALLI IN GARA (GALOPPO /TROTTO)

TRAMITE QPCR ED RNASEQ

Obiettivi specifici

Il primo obiettivo di questa milestone è stato quello di analizzare l'espressione genica di cavalli trottatori in gara con un approccio "gene candidato" mediante qRT-PCR. La lista di geni prescelta era stata in precedenza individuata tramite esperimenti di microarray effettuati su PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) di cavalli dopo esercizio strenuo (gare di endurance) (Capomaccio et al., 2010); l'espressione di tali geni è stata quindi analizzata in cavalli purosangue subito dopo gare di galoppo allo scopo di confermare il reale coinvolgimento di tali geni nella risposta allo stress indotto da diversi tipi di esercizio e di analizzare come la modificazione nell'espressione degli stessi possa essere legata non solo allo stress acuto ma anche all'allenamento.

Dopo aver individuato una lista di geni differenzialmente espressi in una



specialità molto dispendiosa e che richieda sforzi prolungati come l'endurance, l'obiettivo è quello di confermare i nostri dati in una specialità che considerata molto distante prediligendo lo sprint e lo sforzo intenso ma rapido. In questo modo può essere verificato il reale coinvolgimento di geni e pathways nella più generale risposta dell'organismo a uno stress da esercizio. Inoltre, l'utilizzo di cavalli Purosangue ci ha permesso di effettuare le analisi su un campione maggiormente omogeneo in termini di background genetico e ambientale (allenamento, management).

Per il Purosangue Inglese (PSI), razza equina selezionata già dal 1700 per le corse al galoppo in velocità, è stato possibile sfruttare questa omogeneità del campione per un'ulteriore valutazione sulla differenza in termini di espressione genica dei geni candidati tra soggetti allenati e soggetti sedentari.

Nella parte finale del progetto abbiamo ritenuto possibile, anche grazie alla rilevante diminuzione del costo di servizi per le analisi genomiche (come il sequenziamento) rispetto al momento della stesura dello stesso, affiancare un'analisi genome wide di cavalli da galoppo; così facendo, oltre a ottenere indicazione sul landscape trascrizionale che è andato ben al di là di una lista di geni coinvolti, siamo riusciti a dare al progetto a dare al progetto un'ulteriore avanzamento tecnico utilizzando il gold standard della tecnologia di sequenziamento (Illumina HiSeq, TruSeq2 paired-end).

Campionamento

Purosangue Inglese

Atleti. I campioni di sangue sono stati prelevati da dieci cavalli di razza Purosangue Inglese (5 maschie 5 femmine, con età di 4.2 ± 2.44) scelti tra i partecipanti a gare nazionali di galoppo (1000-2400 m) all'ippodromo delle Capannelle di Roma. Il prelievo è stato effettuato dalla vena giugulare in tre differenti tempi: prima della gara (T0), subito dopo la gara (T1) e dopo 24 ore (T2).

Allenamento. Tutti i soggetti campionati effettuavano i loro allenamenti all'ippodromo delle Capannelle a Roma dove possono usufruire di svariati tipi di piste: tre in erba (una da 2600 m una da 1800 m e una in ostacoli da 1600 m) e tre in sabbia (due per i puledri da 2600 m e una da 1600 m), inoltre, in alcuni periodi dell'anno, quando per condizioni di maltempo non si possono utilizzare alcuni tracciati, si può sempre ricorrere alla pista in "All Weather" di 2000 m. I soggetti ogni giorno effettuano un riscaldamento al passo e al trotto nella pista circolare in sabbia adiacente alla scuderia dove trottano per circa 10-15 minuti. Successivamente nella pista in sabbia effettuano un tratto di galoppo da caccia di circa 800-1000 metri. Il lavoro poi si diversifica a seconda del soggetto: nel caso del lavoro di mantenimento viene effettuato un canter a velocità di circa 30-35 Km/h per circa 1600 metri. Una o due volte alla settimana vengono effettuati dei lavori di potenziamento nelle piste in sabbia: di solito si tratta di canter in progressione sui 1600 m. Nei giorni antecedenti la competizione viene effettuato un allenamento sulla pista in erba per simulare l'andatura della competizione per una distanza dipendente dal tipo di corsa che l'animale dovrà poi sostenere.

Sedentari. Campioni di sangue periferico sono stati prelevati a nove cavalli sedentari (fattrici Purosangue con età di 10.2 ± 2.4) tutte appartenenti allo stesso allevamento.

Anglo-Arabo Sardo

Atleti. I campioni di sangue sono stati prelevati da dieci cavalli di razza Anglo-Arabo Sarda (6 maschie 4 femmine di tre anni di età) che hanno partecipato a gare di galoppo di 2000m. Tutti i prelievi, per garantire omogeneità di campionamento sono stati effettuati lo stesso giorno, dallo stesso operatore veterinario autorizzato e, quindi, durante la stessa competizione svoltasi presso l'ippodromo Pinna di Sassari. Il prelievo è stato effettuato dalla vena

giugulare in tre differenti tempi: prima della gara (T0), subito dopo la gara (T1) e dopo 12 ore (T2).

Allenamento. Nel periodo delle corse i cavalli da noi campionati sono stati sottoposti a un allenamento quotidiano (6 giorni su 7) che si svolge in pista per circa un'ora. Generalmente vi è una fase iniziale di riscaldamento in cui il cavallo procede al passo (15-20 minuti) e al trotto (15-20 minuti); segue la fase di lavoro in aerobiosi che prevede un'andature crescenti fino al canter (da 1 a 3 minuti). Nei tre giorni prima della corsa, oltre al riscaldamento e al lavoro in aerobiosi, nell'ultima fase dell'allenamento, il cavallo viene spinto al galoppo per 100-200 metri (lavoro in anaerobiosi). Dopo ogni allenamento (come dopo la gara) viene fatta una doccia al cavallo e messo in box o paddock. Dopo la corsa è previsto un periodo di riposo di un giorno (max 2).

Processazione dei campioni

Per tutti i campionamenti effettuati, immediatamente dopo la raccolta, le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) sono state isolate *in loco* attraverso una separazione su gradiente di Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Pollards Wood, United Kingdom) per evitare possibili *bias* nell'espressione genica dovuti all'eterogenicità cellulare di un tessuto come il sangue. Una volta ottenute, le cellule sono state immediatamente crioconservate sino allo step di estrazione dell'RNA e del DNA genomico.

Estrazione dell'RNA e DNA

Successivamente alla separazione delle cellule, i campioni sono stati sottoposti a estrazione dell'RNA con un kit commerciale al fine di ridurre la variabilità qualitativa dell'estrazione stessa (Fatty and Fibrous RNA Kit, Bio-Rad).

L'RNA estratto è stato valutato quali-quantitativamente attraverso la misurazione al fluorimetro (VersaFluor-Bio-Rad- utilizzando il kit Quant-It RNA -Invitrogen, Dorset, United Kingdom) e la separazione elettroforetica in gel denaturante di agarosio. Prima di effettuare l'amplificazione dei geni di interesse è stata valutata l'effettiva rimozione di tutto il DNA genomico constatando l'assenza di amplificati per il gene del recettore 1 della melanocortina (MC1R).

Il DNA genomico, estratto attraverso l'utilizzo kit commerciali (Wizard Promega), è stato valutato dal punto di vista quali-quantitativo attraverso

lettura spettrofotometrica (Nanodrop) e separazione su gel di agarosio, e successivamente stoccato a -80.

RNAseq

Successivamente all'estrazione dell'RNA totale, i campioni derivanti da soggetti Anglo-Arabo Sardi sono stati inviati al service di sequenziamento dove è stata accertata la qualità attraverso elettroforesi microfluidica (Bioanalyzer) e successivamente realizzate le librerie mediante il kit TruSeq2 per ottenere reads Paired End 101 + 101 su strumento HiSeq 1500.

qRT-PCR

L'RNA totale (500 ng) è stato retrotrascritto utilizzando come inneschi per la reazione random esameri e l'enzima tra-scrittasi inversa Superscript III (Invitrogen). Per controllare l'avvenuta retrotrascrizione è stata effettuata una PCR sul gene della B-actina di cavallo utilizzando i seguenti primer (Forward 5'- GAGCAAGAGGGGCATCCTGA-3', Reverse 5'-GGTCATCTTCTCGCGTTGG-3', Gene ID: 100033878) e condizioni standard di amplificazione.

I geni di riferimento utilizzati sono stati quelli della succinato deidrogenasi subunità 1 (SDHA) e l'ipoxantina fosforibosil trasferasi (HPRT), impiegati per stimare correttamente i livelli di espressione genica dei geni d'interesse e da noi precedentemente scelti e testati (Cappelli et al., 2008).

I primer per l'amplificazione di tutti i geni presi in considerazione in questo lavoro sono stati disegnati su sequenze disponibili in banca dati e usando il software Primer3 e dove possibile su differenti esoni o sulla giunzione esone-esone. La lunghezza degli ampliconi è stata ottimizzata da 69 a 150 bp e la specificità dell'amplicato è stata confermata attraverso il sequenziamento dello stesso. Nella tabella seguente vengono elencate le sequenze di primer da noi utilizzate:

Cinque microlitri di template di cDNA (precedentemente diluite 1:10) sono stati aggiunti alla mater mix FastStart SYBR Green Master (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) utilizzando il fluorocromo ROX come controllo interno in un volume totale di 25 µl. La reazione è stata effettuata nello strumento MX3000P (Stratagene, La Jolla CA, USA) utilizzando lo stesso ciclo termico per tutte le coppie di primer: la denaturazione iniziale a

95°C per 10' seguita da 40 cicli di denaturazione a 95°C per 30", annealing a 58°C per 30" e polimerizzazione a 72°C per 30". La fluorescenza è stata rilevata alla fine di ogni fase polimerizzazione. Ogni reazione è stata effettuata in triplicato. Infine è calcolata una curva di melting in un range che va da 58° a 95°C, con incrementi di temperatura dello 0.01°C/sec.

Analisi dei dati

I valori di Cq (ciclo soglia) derivati dal software 3.21 MxPro (Stratagene) che hanno mostrato una deviazione standard minore di 0.2 nelle reazioni triplicate, sono state analizzate con Gene Expression Macro Professional (GenEx-Pro) (MultiD, Sweden) dopo l'appropriata formattazione. GenEx-Pro è un programma che calcola l'espressione relativa utilizzando funzioni derivati da algoritmi di Vandesompele e colleghi (Vandesompele et al., 2002).

I valori di Cq sono stati analizzati secondo due comparazioni: la "comparazione riposo" confrontando l'espressione dei geni di interesse con cavalli a riposo (atleti vs. sedentari) e la "comparazione gara" confrontando l'espressione dei geni d'interesse dei soli atleti (prima della gara = T0; immediatamente dopo la gara = T1; 12 ore dopo la gara = T2).

Innanzitutto i gruppi sono stati testati per verificarne la distribuzione parametrica utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov (KS). Per la "comparazione riposo" è stato successivamente effettuato un t-test a due code unpaired nel caso dei dati distribuiti normalmente altrimenti un test Mann-Whitney sempre per dati unpaired. Per la "comparazione gara" essendo un esperimento *time course* con tre tempi e dati che seguivano una distribuzione normale è stata effettuata una ANOVA (R Development Core Team, 2007).

Risultati

Purosangue Inglese

Il pannello di geni selezionati (CXCL2, TLR4, IL1B, IL8, IL1RII, IL18, IL6 and CEBPB) è stato estratto da una lista risultante dall'analisi di un esperimento microarray come si evince dall'articolo di Capomaccio et al., 2010.

La prima comparazione la "comparazione riposo", è stata ideata allo scopo di valutare l'effetto dell'allenamento sull'espressione di geni correlati allo stato infiammatorio e alla risposta immunitaria. Questo confronto mostra chiaramente (fig. A) che gli atleti mostrano un livello di espressione basale le

cui differenze nei due gruppi non sono statisticamente significative. Il t-test mostra invece significatività per TLR4 ($P < 0.05$), CEBPB ($P < 0.005$) and IL6 ($P < 0.005$) e il Mann-Whitney test per IL1B, IL1R e IL18 con p-values più bassi di 0.05.

La seconda comparazione cioè la “comparazione gara” investigata con l’A-NOVA mostra (fig. B) che tre geni sono sovra-espressi significativamente in conseguenza della gara ($P < 0.005$): CXCL2, IL8, and CEBPB, mentre gli altri non risultano essere modulati.

Nella “comparazione riposo” tutti i geni testati (eccetto CXCL2 e IL8) hanno un’espressione basale significativamente più alta di quella dei soggetti sedentari (fig.A) in maniera assolutamente opposta a ciò che avviene nella “comparazione gara” (fig.B) dove solo gli stessi due geni (con l’aggiunta di CEBP) sono significativamente sovra-espressi dalla gara. Da questi risultati si potrebbe ipotizzare che i geni che mostrano un livello basale di espressione più alto siano in qualche modo “più pronti” per fronteggiare i cambiamenti omeostatici indotti dallo sforzo fisico improvviso della gara cosicché non siano necessari ulteriori produzione di trascritto. Questo potrebbe essere uno dei vantaggi dell’allenamento ovviamente espletato in maniera tale da conservare un equilibrio ottimale tra sforzo e recupero.

Il trascritto codificante il CEBP è l’unico sovra espresso in entrambe le comparazioni. È noto che la sua regolazione sia richiesta in molte condizioni fisiopatologiche e indotta da numerosi fattori come citochine, mitogeni, ormoni e tutto ciò sia correlato a stress cellulare, quindi, potrebbe essere ragionevole assumere che, questo fattore di trascrizione chiave dello stress, debba comunque essere indotto durante l’esercizio.

I risultati di questi esperimenti potrebbero inoltre suggerire che i tessuti dei purosangue possano sensibilizzarsi all’allenamento, confortati anche dai risultati preliminari ottenuti in un precedente esperimento limitatamente a IL6 e IL6R (Capomaccio et al., 2011).

Anglo-Arabo Sardi

Le sequenze grezze ricevute dal service di sequenziamento sono state sottoposte a quality control con FastQC e a trimming mediante il software Trimmomatic per la rimozione di sequenze o parti di esse di bassa qualità o munite di adattatori. Nella tabella seguente sono riportati le grandezze di base dell’esperimento di sequenziamento.

Le reads “pulite” sono state allineate al genoma di riferimento (equCab2) con software “splice aware” [TopHat2]. La pipeline bioinformatica ha previsto l’impiego di software che misurano la profondità di sequenziamento

SAMPLE	RAW	TRIMMED	ALIGNED PAIRS
S10B	33503070	8513546	3600144
S10G	22394110	32458782	13703825
S11B	14008894	21712532	9204071
S11G	18986960	13605408	5793337
S5B	19209286	18373218	7686595
S5G	19143702	18626894	7869385
S6B	15681066	18476088	7931677
S6G	20252456	15219424	6391869
S8B	31767674	19639580	8250999
S8G	15724850	30822782	12881523
S9B	25053756	15224362	6378042
S9G	33503070	24333058	10259486

Tab. 1 *Numero di sequenze per campione nei vsri step del QC.*

all'interno dei geni presenti nell'ultima annotazione disponibile [Ensembl 79] per procedere poi alla valutazione dell'espressione differenziale tra T0 e T1.

Per caratterizzare al meglio la complessità della trascrizione all'interno di geni o trascritti abbiamo utilizzato ReadCounter, algoritmo che disgiunge le reads che cadono all'interno degli esoni da quelle che cadono all'interno degli introni. Questo approccio permette di identificare non solo geni differenzialmente espressi per una modulazione pertinente agli esoni, ma di osservare anche eventuali cambiamenti dovuti alla trascrizione di introni o pezzi di introni, che potrebbero risultare o esoni non annotati o regioni funzionali non caratterizzate.

L'espressione differenziale tra le condizioni (T0 e T1) e nei diversi compartimenti (esoni, introni, esoni + introni) è stata effettuata con il pacchetto R edgeR, riferimento nelle analisi "count-based" per esperimenti di RNA-Seq. Un campione tra i 6 sequenziati è stato escluso dall'analisi per un comportamento anomalo in sede di analisi dati.

I geni così ottenuti sono stati filtrati applicando un logFC (logaritmo del fold change) pari a $-1,5 < \log FC < 1,5$ e un FDR pari a $q < 0,05$ per evidenziare le modificazioni più rilevanti e statisticamente significative.

Le analisi hanno evidenziato: 229 geni per il comparto "Exon", 464 per "Intron" e 264 per "Exon+Intron".

Nella figura 1 viene riportato il grafico di Venn che esemplifica la sovrapposizione tra i risultati ottenuti per le analisi differenziali con i differenti dataset.

Come atteso, la totalità dei geni differenzialmente espressi nel dataset Exon + Intron è interamente contenuta dagli altri due dataset (Exon, Intron).

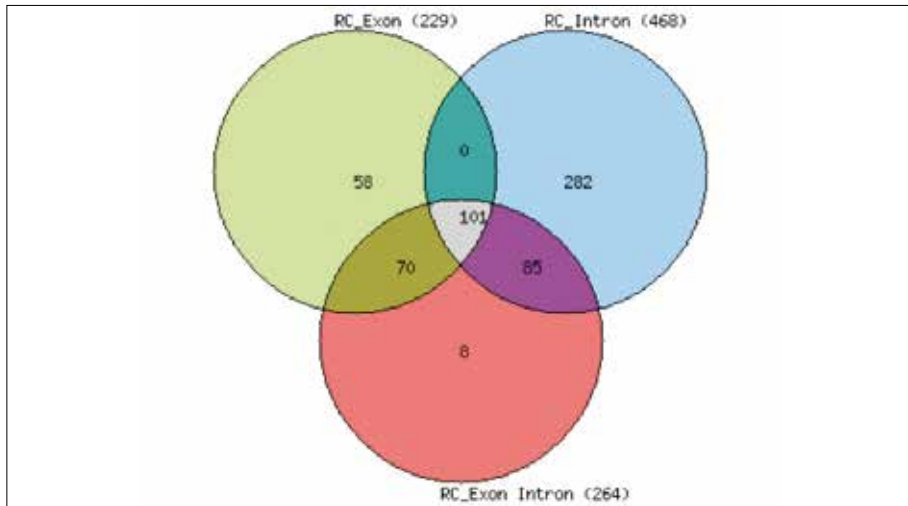


Fig. 1

Il dato interessante, e meno atteso, è il gran numero di geni che risulta modulato sia nel dataset Exon che nel dataset Intron (101). Da un'analisi preliminare, la gran parte di essi risulta essere pervasivamente espressa in tutti e due i comparti già al T0 come se fossero presenti trascritti non sottoposti a splicing, soprattutto quando si tratta di geni "corti".

A titolo esemplificativo, in figura 2, è mostrato il gene dell'Interleuchina 8 (*IL8*) dove è evidente questo fenomeno.

L'arricchimento secondo i vocabolari biologici della "Gene Ontology" è stato effettuato mediante i tool disponibili su STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins). L'analisi è stata effettuata sia sul comparto EXON che sulla lista di geni differenzialmente espressi comuni al comparto esoni e introni (EXON+INTRON). In entrambi i casi, il network prodotto, ha un numero elevato di geni altamente interconnessi. Per il comparto Exon composto da 229 geni differenzialmente espressi sono state individuate 214 proteine corrispondenti e 254 interazioni (p-value $2.77e-14$); i geni differenzialmente espressi in entrambi i comparti EXON e INTRON sono 101 e per tutti sono state individuate proteine corrispondenti costruendo 81 interazioni (P value $5.12e-12$). Dopo avere individuato il network altamente interconnesso sono stati identificate le pathways e processi biologici arricchiti per le molecole del network e significativi con $p < 0.005$ dopo correzione con Bonferroni; in entrambi i comparti analizzati tali processi riguardano la regolazione del sistema immunitario e la risposta infiammatoria attraverso l'attivazione di chemochine e citochine che riconducibili alla risposta allo stress. Per il comparto Exon,

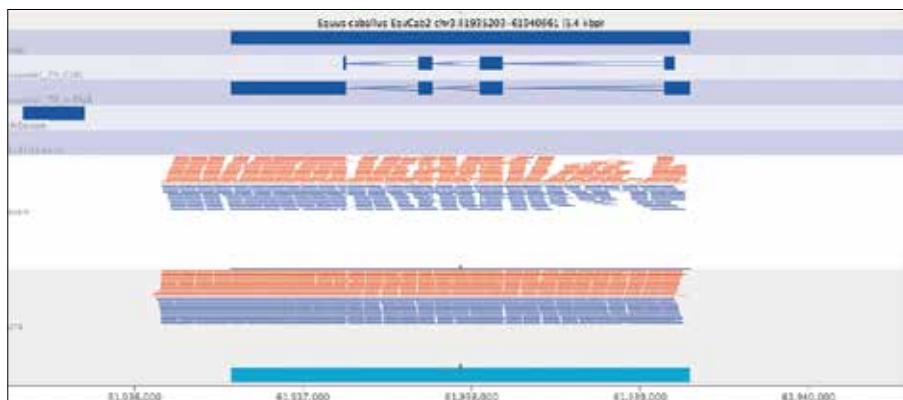


Fig. 2 In blu scuro la rappresentazione grafica del gene IL8 e dei suoi trascritti conosciuti e sotto di esso gli allineamenti per T0 (Basale in figura) e T1 (gara in figura).

infatti, le pathways KEGG sono “Chemokine signaling pathway” (12 molecole), “TNF signaling pathway” (9 molecole), “Cytokine-cytokine receptor interaction” (12 molecole), “Toll-like receptor signaling pathway” (8 molecole); mentre aggiungendo il comparto INTRON abbiamo “Chemokine signaling pathway” (10 molecole), “TNF signaling pathway” (8 molecole), “Cytokine-cytokine receptor interaction” (10 molecole).

L'arricchimento risulta ancora più evidente e interessante se andiamo a evidenziare i processi biologici e le funzioni molecolari della network creata: “immune system process” (n. 39/214), “response to external stimulus” (n. 35/214), “regulation of immune system process” (n. 27/214), “cellular response to chemical stimulus” (n. 34/214), comparto Exon; “response to external stimulus” (n. 27/101), “cell chemotaxis” (n. 10/101), “negative regulation of biological process” (n. 41/101), “negative regulation of cellular process” (n. 39/101), “response to stimulus” (n. 55/101), “regulation of cellular process” (n. 68/101), “regulation of primary metabolic process” (43/101), “negative regulation of cellular metabolic process” (n. 27/101), “regulation of response to stimulus” (n. 34/101) per il comparto EXON+INTRON.

Questi dati ci fanno riflettere su come alla regolazione infiammatoria e allo stress data dall'attivazione delle cellule del sistema immunitario (chemochine, citochine e loro regolazione) si aggiungono numerose molecole che regolano anche in maniera negativa i processi biologici (è noto infatti come diminuisca drasticamente la sintesi proteica in condizione di forte stress) e come questa regolazione induca l'espressione di larghe porzioni annotate come introniche del trascritto.

Elementi ripetuti

Come già era stato evidenziato con il precedente esperimento di RNA-Seq su cavalli da endurance, anche in questo caso lo “shift” trascrizionale tra T0 e T1 dal comparto codificante a quello non codificante è in parte dovuto a un aumento nella trascrizione di trasposable elements. Questo sbilanciamento tra prima e dopo la gara è evidente soprattutto per la famiglia L1 e suggerisce ancora una volta il manifestarsi del fenomeno di “esonizzazione”.

Il fenomeno è già noto in altri sistemi biologici e dovuto a come reazione genomica in momenti di particolare stress (citazione). L'ulteriore analisi che è stata effettuata in questo esperimento si basa su un'annotazione contenente elementi nucleari ripetuti interspersi (LINE1) full-length: in questo modo abbiamo potuto individuare non solo l'espressione di elementi probabilmente tronchi che possono comunque influenzare la trascrizione, ma saggiare l'eventuale trascrizione di questi particolari elementi, gli unici che hanno mantenuto la capacità di retrotrasposizione. Questo fenomeno potrebbe suggerire in linea di principio che lo stress da sforzo fisico estremo potrebbe attivare le LINE1 come già dimostrato in vitro per alcune cellule di mammifero (uomo, topo) e in alcuni tipi sporadici di cancro (Akagi et al., 2013; Wissing et al., 2012).

L'analisi, effettuata esattamente come quella precedente, ha evidenziato 9 LINE modulate significativamente nel tempo T1 come riportato nella tabella seguente.

Questi risultati rappresentano la prima evidenza che l'esercizio induca la trascrizione di LINE intere.

Un'ulteriore caratterizzazione dell'espressione di tutte le altre classi di repeats è attualmente in corso. Nella figura seguente, riportiamo un esempio di una LINE intera over espressa dopo l'esercizio.

Finalizzazione pubblicazione

Il lavoro effettuato durante il primo anno ha portato nel secondo anno alla pubblicazione di K. Cappelli, M. Felicetti, S. Capomaccio, C. Nocelli, M. Silvestrelli, A. Verini-Supplizi, sulla rivista internazionale *The Veterinary Journal* dal titolo: “Effect of training status on immune defence related gene expression in Thoroughbred: Are genes ready for the sprint? The Veterinary Journal (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.07.021>

Altri manoscritti riguardanti l'RNA-Seq e l'approccio “gene candidato” sono in fase di preparazione.

	CHR	START	END
LINE_L1	7	63128351	63134140
LINE_L1	8	40667748	40673240
LINE_L1	8	93965172	93970775
LINE_L1	15	71605223	71611052
LINE_L1	16	87227552	87233050
LINE_L1	19	32037546	32043145
LINE_L1	24	18814909	18820383
LINE_L1	24	21711223	21717131
LINE_L1	27	14217249	14222719

Tab. 2 Location della LINE1 differenzialmente espresse.



Fig. 3 In blu scuro e Rosso (in alto) la rappresentazione di una LINE full-length modulata positivamente durante l'esercizio. Sotto di essa gli allineamenti per T0 e T1.

In particolare, il lavoro sull'RNA-Sequencing è stato presentato al congresso Internazionale ISAFG (www.isafg2015.it).

Whole transcriptome analyses of Anglo-Arabian Races Horses reveals an activation of full length LINE1 retrotrasposons in immune system cells after competition. Capomaccio S., Giontella A., Verini-Supplizi A., Sorbolini S., Picciolini M., Crucianelli F., Biggio G. P., Cherchi R., Silvestrelli M., Cappelli K. 6th ISAFG, 27-29 July 2015, Piacenza, Italy.

MILESTONE: ANALISI DELL'EREDITÀ UNIPARENTALE PER
INVESTIGARE LA VARIABILITÀ PER LINEA MATERNA E PATERNA DELLE DIVERSE
RAZZE DI CAVALLI ITALIANI

Obiettivi. I Marcatori uniparentali

Nei mammiferi esistono due unici sistemi genetici non ricombinanti: il DNA mitocondriale (mtDNA), genoma extranucleare trasmesso solo per via mater-



na, e la regione maschio specifica del cromosoma Y (MSY). Dal momento che i marcatori uniparentali sono sistemi genetici ereditati senza andare incontro a fenomeni di ricombinazione, le variazioni nella sequenza mitocondriale e del cromosoma Y derivano soltanto dall'accumulo sequenziale di nuove mutazioni lungo linee di discendenza esclusivamente femminili (per l'mtDNA) o maschili (per l'MSY). Nel tempo questo processo di differenziamento molecolare ha dato origine a unità monofiletiche, chiamate cladi, o aplogruppi, cioè gruppi di mtDNA o MSY che condividono una simile combinazione di mutazioni (aplotipo) derivata per discesa da un antenato comune femminile o maschile, rispettivamente. Il DNA mitocondriale del cavallo è lungo 16,660 bp, di cui il 68% è codificante per proteine e il contenuto in GC è del 41%; la regione MSY equina invece è di circa 15Mb.

Il DNA mitocondriale (mtDNA) dei mammiferi rappresenta soltanto una minima parte dell'intero genoma. Esso è organizzato in una piccola molecola circolare di DNA di ~16-17 mila paia di basi (bp), presente in centinaia/migliaia di copie per cellula, caratterizzato da un tasso evolutivo superiore rispetto a quello nucleare e trasmesso senza eventi di ricombinazione esclusivamente per via materna. Di conseguenza, le variazioni nella sequenza mi-

tocondriale derivano soltanto dall'accumulo di nuove mutazioni lungo linee di radiazione femminile che nel tempo danno origine a unità monofiletiche, chiamate cladi, o aplogruppi (gruppo di mtDNA che condivide una simile combinazione di mutazioni - aplotipo - derivato per discesa da un antenato comune femminile). Mappando queste linee mitocondriali nel tempo e nello spazio (approccio "filogeografico") è possibile ricostruire la storia demografica delle popolazioni, definendone origine, espansione e modelli di dispersione. Nel caso degli animali domestici è possibile identificare sia le aree e le modalità di domesticazione che i processi di formazione e diffusione delle attuali razze [Clutton-Brock 1999]. Inoltre l'mtDNA, contiene geni coinvolti nella produzione di energia cellulare e importanti studi condotti sull'uomo hanno dimostrato che mutazioni mitocondriali possono avere effetti importanti non solo sulla salute e l'invecchiamento, ma anche sulle performance sportive.

Un primo obiettivo è stato quello di sequenziare completamente mtDNA di cavallo scegliendo i DNA da sequenziare non solo in base alla razza e/o all'origine geografica, ma soprattutto sulla base di una attenta analisi di dati molecolari preliminari ottenuti dallo studio di un cospicuo campione del quale preliminarmente è stata sequenziata la regione di controllo, D-loop. Da questo dato è stato possibile ottenere: (1) una valutazione sia della natura che del grado di variabilità dell'mtDNA nel cavallo a un livello di risoluzione mai raggiunto prima; (2) avere un'attenta definizione degli aplogruppi mitocondriali equini nel mondo, identificando i marcatori di ciascuna linea e fornendo precisi criteri di classificazione.

Il secondo obiettivo, rimodulato nel corso del progetto per l'impossibilità di campionamento di trottatori atleti, è stato quello di valutare, in base alla nuova classificazione degli aplogruppi mitocondriali, la variabilità genetica per linea materna delle popolazioni di cavalli italiani.

mtDNA

Primo obiettivo

Materiali e metodi

Le indagini preliminari sul D-loop sono state eseguite su più di trecento campioni di sangue appartenenti a 25 razze provenienti da Europa, Asia, America e Medio Oriente. Tra questi soggetti ne sono stati scelti 83 che presentavano il più ampio range mutazionale per il sequenziamento dell'intero genoma mitocondriale. Per questo è stato utilizzato l'approccio di Sanger precedentemente usato per il bovino da Achilli et. al. (2008). L'intero mtDNA di cavallo è stato amplificato generando 11 frammenti di PCR sovrapposti utilizzando un set

di oligonucleotidi con una temperatura di annealing di 55°C.

I primers sono stati controllati accuratamente mediante GenBank BLAST al fine di evitare amplificazioni accidentali di pseudogeni nucleari di origine mitocondriale (Numts). Dopo l'amplificazione i frammenti sono stati purificati utilizzando l'ExoSAP-IT® enzymatic system (Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare) e il sequenziamento realizzato con il metodo dei dideossi di Sanger utilizzando un set di 33 nested primers disegnati appositamente per questo protocollo. Un sequenziatore ABI 3730 con 96 capillari è stato impiegato per la separazione. Le sequenze complete sono state allineate, assemblate e comparate con il programma Sequencher 4.9 (Gene Codes). Le analisi filogenetiche sono state effettuate come descritto da Achilli et al. in precedenti lavori e confermate utilizzando l'mtPhyl 3.0. La divergenza molecolare è stata calcolata utilizzando i software PAML 4.4 e BEAST. Gli stessi software sono stati utilizzati per calcolare l'orologio molecolare del mtDNA di cavallo con un approccio di tipo bayesiano e di ML.

Secondo obiettivo

Materiali e metodi

In questa seconda parte del lavoro sono stati analizzati 408 campioni equini appartenenti a dieci razze italiane: 54 Anglo-Arabi sardi, 48 Bardigiani, 28 Esperia, 32 Murgesi, 39 Giara, 30 Lipizzani, 91 Maremmani, 30 Monterufolini, 30 Sarcidani e 26 Tolfetano. Per ciascun campione è stato estratto il DNA a partire da 1.2ml di sangue periferico e raccolti, ove possibile, i dati genealogici. Tutti i campioni, unitamente a un gruppo di 36 Arabi, usati come confronto, sono stati sottoposti alla caratterizzazione della regione di controllo del DNA mitocondriale.

1. Tutti i campioni sono stati amplificati mediante PCR nella regione del D-loop compresa tra le posizioni nucleotidiche 15364 e 563, quindi sequenziati mediante metodo Sanger dalla posizione nucleotidica 15491 alla posizione 16100.
2. Le sequenze così ottenute (610bp totali) sono state allineate e confrontate con la sequenza di riferimento (ERS, NC_001640), per l'annotazione delle varianti mutazionali.
3. Dalla definizione degli aplotipi è stato possibile eseguire la classificazione nei diversi aplogruppi.
4. Tramite l'uso del software DNAsp 5.10 sono state analizzate le sequenze per studiare la variabilità genetica della regione di controllo all'interno

delle razze prese in esame.

5. Il programma Network 4.51 (www.fluxus-engineering.com) ha permesso la costruzione della network a partire dagli aplotipi della regione di controllo. La network mostra le relazioni filogenetiche esistenti tra gli mtDNA delle razze considerate.

Risultati primo obiettivo

Dalle analisi di 83 interi genomi mitocondriali di numerose razze equine (incluso lo Przewalski) sono state identificate almeno 18 linee genetiche ancestrali (aplogruppi), definite ciascuna da uno specifico set di mutazioni e denominate con le lettere dell'alfabeto dalla A alla R (vedi figura sottostante).

Tutti questi aplogruppi fanno capo a una singola molecola ancestrale esistente circa 140.000 anni fa, durante il periodo glaciale cosiddetto Saale, e da cui derivano tutte le molecole di DNA mitocondriali attualmente presenti nelle razze moderne. Le 18 linee sono diffuse in tutte le attuali razze equine, tranne una, denominata F, che è tipica solo ed esclusivamente del cavallo di Przewalski, che di conseguenza, non rappresenta l'antenato dei moderni cavalli. Diverse specie domestiche, come bovini e pecore, hanno subito un unico evento di domesticazione avvenuto nel periodo neolitico (circa 10 mila anni fa) nell'area della Mezzaluna Fertile. Al contrario, i numerosi aplogruppi riscontrati nelle razze equine moderne indicano che la domesticazione del cavallo, pur essendo avvenuta anch'essa in tempi neolitici, abbia interessato un maggior numero di popolazioni selvatiche localizzate in molteplici aree geografiche di tutta l'Eurasia. Questo studio sembra perfino indicare un possibile sito di domesticazione in Europa e più precisamente nella penisola Iberica, dove i cavalli selvatici non solo sono sempre stati presenti sin dai tempi Paleolitici, ma sono anche sopravvissuti durante l'Ultimo Picco Glaciale - che interessò l'intero continente Europeo circa 20.000 anni fa - probabilmente rifugiandosi nella medesima area Franco Cantabrica (ai piedi dei Pirenei) abitata da molte specie animali, compreso l'Uomo.

La cosa più importante, ora che una ampio numero di aplogruppi di cavallo sono stati identificati, è la possibilità del loro utilizzo nella classificazione di reperti archeologici ben conservati, nella rideterminazione degli aplogruppi dei cavalli moderni, incluso il Purosangue Inglese, e nella valutazione delle possibili correlazioni con le performance sportive. Si sta quindi faticosamente, viste le sopracitate difficoltà dell'Ente preposto, continuando il campionamento e lo stoccaggio del materiale biologico dei trottatori per poter avere

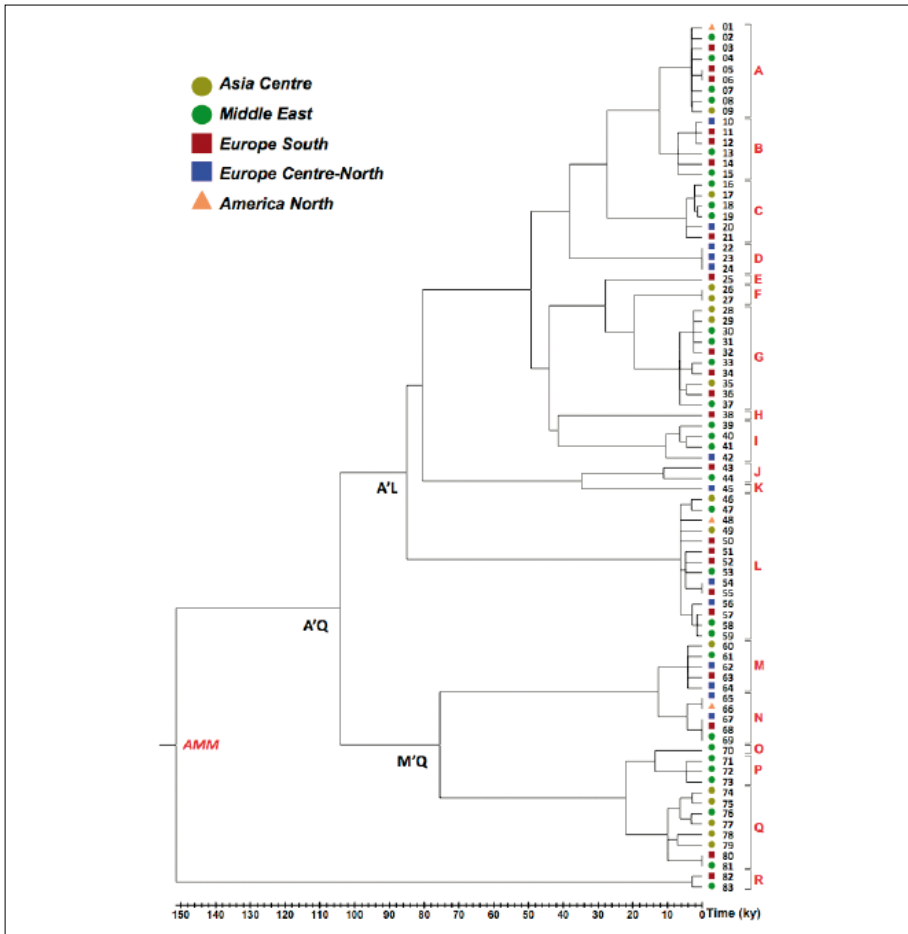


Fig. 1. *Albero degli aplotipi*

almeno la possibilità di iniziare il lavoro relativo allo studio delle possibili correlazioni tra mtDNA e performance.

Risultati secondo obiettivo

Dalla tabella 1 si evincono i dati di variabilità genetica delle dieci razze italiane analizzate.

L'intero allineamento ha rivelato un totale di 91 siti polimorfici (S), rappresentati da 90 transizioni e 3 indel (2 delezioni, np 15532 e 15867, e una inserzione, np 16063) con una diversità nucleotidica (π) totale stimata pari

RAZZA	SI-GLA	ORIGINE	CONSISTENZAB	REGISTRI GENEALOGICI	DIMEN- SIONI	N	π	NH	HD	S
Bardigiano Monterufolino	BA	Nord Italia	2571	Libro genealogico	Medio	48	0.0197	24	0.957	59
	MF	Centro Italia	261	Registro Anagrafico	Pony	30	0.0220	7	0.796	49
Marenmano	MA	Centro Italia	3515	Libro genealogico	Alto	91	0.0205	54	0.981	75
Tolfetano	TF	Centro Italia	1422	Registro Anagrafico	Medio	26	0.0202	18	0.966	46
Lipizzano	LI	Centro Italia	419	Registro Anagrafico	Alto	30	0.0214	11	0.916	46
Esperia	ES	Sud Italia	1171	Registro Anagrafico	Pony	28	0.0174	8	0.869	37
Murgese	MG	Sud Italia	5327	Libro genealogico	Alto	32	0.0219	21	0.968	55
Anglo-Arabo Sardo	AA	Sardegna	9606	Libro genealogico	Alto	54	0.0192	31	0.970	49
Giarà	GI	Sardegna	518	Registro Anagrafico	Pony	39	0.0166	9	0.888	33
Sarcidano	SC	Sardegna	110	Registro Anagrafico	Medio	30	0.0174	8	0.839	33
Razze Italiane						408	0.0199	117	0.979	91
Arabo	AR		12200	Libro genealogico	Alto	36	0.0175	14	0.881	44
Totale						444	0.0200	127	0.981	93

^a N= numero di campioni analizzati; π = diversità nucleotidica; nh= numero di aplotipi unici; Hd= diversità aplotipica; S= numero di siti polimorfici.

^b Consistenza della razza= numero di individui registrati nel Libro genealogico oppure nel Registro Anagrafico (FAO 2014).

Tab. 1 *Campioni analizzati delle dieci razze italiane e relative stime di diversità genetica.*

a 0.020. Il massimo valore di diversità aplotipica (H_d) è stato stimato pari a 0,981, nella razza maremmana, seguita dall'Anglo-Arabo Sardo ($H_d = 0.970$). Il valore più basso ($H_d = 0,796$) registrato nel Monterufolino può essere facilmente collegato alla storia della razza. La sua area di origine è limitata a poche migliaia di ettari che coincidono principalmente con l'attuale "Monterufoli-Caselli" Riserva Naturale (in Toscana); negli anni Novanta la sua popolazione contava meno di dieci individui (FAO 2014). Nel complesso, sono stati identificati 127 aplotipi distinti: 79 aplotipi unici e 34 condivisi tra le diverse razze italiane.

La diversità genetica tra e intra popolazione è evidenziata nella figura 2, dove, con confronti a coppie è possibile avere un quadro esaustivo della complessità dell'eredità materna nelle popolazioni equine italiane.

Da queste analisi si può evincere innanzitutto che la popolazione di cavalli di Monterufoli (MF) è significativamente distante da tutte le altre popolazioni.

Nel grafico si nota anche come popolazioni fenotipicamente diverse ma derivanti dalla stessa area geografica ben delimitata e isolata dalle altre, abbia portato a una bassa differenza genetica tra cavallino della Giara (**GI**) e Sarcidano (**SC**)

Anche per la popolazione di pony Esperia (**ES**) possiamo dire che la differenza intra razza è molto bassa come d'altronde atteso per via della selezione alla quale questi soggetti sono stati sottoposti nel corso dei secoli. Tra l'altro, è documentato che nel 1882 sono stati acquistati 4 fattrici e 2 stalloni arabi da una provincia della Turchia da immettere nella popolazione di Esperia. Questa introgressione è ancora evidente con il 25% di variabilità aplotipica che si può attribuire alle linee femminili dell'Arabo (per esempio due di questi campioni di Esperia ha lo stesso aplotipo due purosangue Arabi utilizzati per questa analisi, HT55 e HT52).

L'alta variabilità che ritroviamo nelle linee materne del Maremmano e dell'Anglo Arabo Sardo è dovuta a due eventi: l'impatto storico-geografico-culturale prima e la costituzione ed evoluzione del Cavallo da Sella moderno (Warmblood) dopo il 1791 (istituzione dello Stud Book del Puro Sangue inglese). Il primo periodo ha portato a sovrapposizione di soggetti di diverse origini dovute a invasioni, passaggi di eserciti e dominazioni straniere, il secondo a scelte oculate di riproduttori, spesso stranieri, per ottenere un cavallo nazionale da sella con performance superiori capace di confrontarsi con simili popolazioni estere. Le considerazioni che scaturiscono da questi risultati vengono rafforzate dall'analisi dell'MSY sotto riportata.

Per quanto riguarda il Lipizzano sono stati individuati solo 10 aplotipi in più di 38 campioni analizzati confermando l'esistenza di 10 linee materne per il Lipizzano italiano. Un'aplotipo, HT9 è stato individuato in un campione

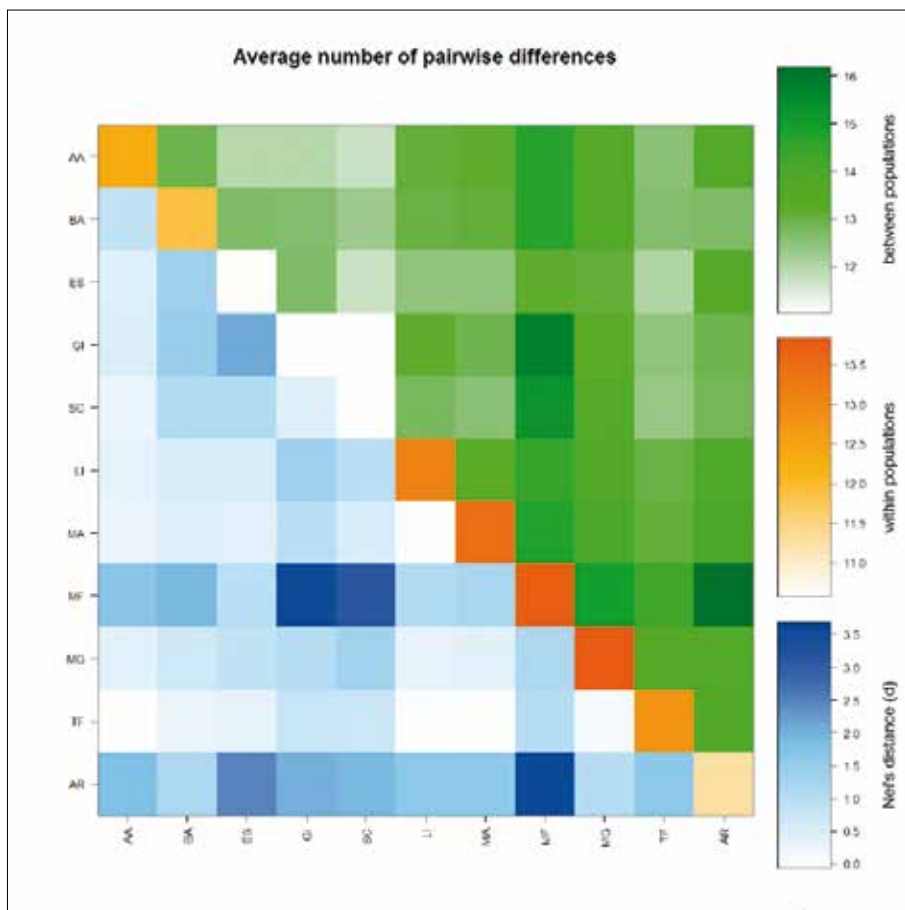


Fig. 2 plot del numero medio di differenze pairwise tra le popolazioni (sopra la diagonale), intra popolazione (diagonale) e distanza di Nei (sotto la diagonale). AA: Anglo Arabo; BA: Bardigiano; ES: Esperia; GI: Giara; SC: Sarcidano; LI: Lipizzano; MA: Maremmano; MF: Monterufoli; MG: Murgese; TF: Tolfetano; AR: Arabo.

di Lipizzano e uno Tolfetano a dimostrazione della vicinanza genetica tra Lipizzano e Maremmano sulla carta già evidente in quanto una linea femminile del maremmano (“Blanca”) è di origine Lipizzana.

Analisi filogenetica

In figura 3 è riportata la network ottenuta dai 444 campioni analizzati. I nodi della network rappresentano gli aplotipi, e la loro grandezza è proporziona-

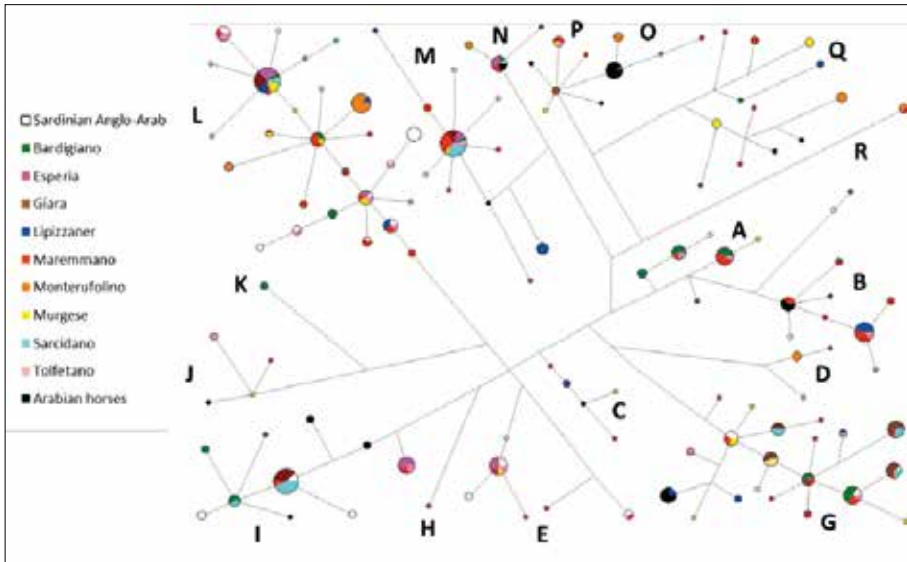


Fig. 3 *Network filogenetico*

le al numero di individui che condividono lo stesso aplotipo. I nodi interni (rappresentati da aplotipi reali o aplotipi ancestrali) permettono di evidenziare vari rami che rappresentano i vari aplogruppi (gruppi monofletici), riportati in nero vicino al ramo corrispondente. La lunghezza dei rami è proporzionale ai passi mutazionali che determinano la divergenza tra i vari aplotipi.

Dalla network ottenuta e seguendo lo schema di classificazione riportato in Achilli et al (2012), è stato possibile classificare i diversi aplotipi in aplogruppi.

La figura 4 descrivere la distribuzione totale degli aplogruppi mitocondriali nelle differenti aree geografiche d'Italia, mettendo in evidenza le relazioni filogenetiche e filogeografiche delle principali razze equine autoctone italiane.

MSY

Materiali e metodi

- Estrazione del DNA da sangue di 73 cavalli appartenenti a diverse razze italiane (6 Anglo-Arabi, 16 Bardigiani, 12 Giara, 12 Lipizzani, 10 Maremmani, 3 Monterufolini, 3 Murgesi, 1 Purosangue Inglese e 10 Sarcidani).
- Amplificazione PCR di 3 loci del cromosoma Y.
- Sequenziamento Sanger di circa 1000bp della regione MSY.

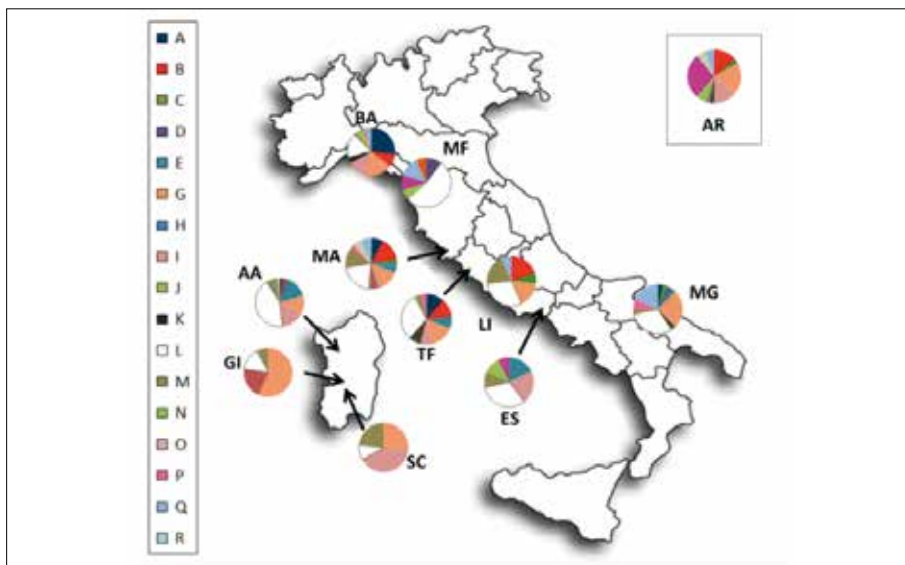


Fig. 4 Distribuzione degli aplotipi in Italia

- Annotazione delle mutazioni rispetto alle sequenze di riferimento dei tre loci (locus YE3, locus YE17 e locus YXX), pubblicate da Wallner et al (2013), e classificazione nei vari aplotipi.

Risultati MSY

A oggi non si dispone in banca dati dell'intera sequenza della regione MSY equina, in quanto l'unico esemplare il cui DNA è stato sequenziato completamente era una femmina. Facendo quindi riferimento ai pochi loci sequenziati, abbiamo potuto amplificare e sequenziare solo alcune paia di basi appartenenti ai tre loci, dei sei riportati in bibliografia.

HT1: campioni con sequenze identiche al riferimento in tutti e tre i loci;

HT2: campioni con sequenze identiche al riferimento nei loci YE3 e YXX e che presentano la trasversione 1277A nel locus YE17;

HT3: campioni con sequenza identica al riferimento nel locus YXX e che presentano la trasversione 1277A nel locus YE17 e la delezione 10594delT nel locus YE3.

La tabella 2 mostra l'elenco dei campioni e dei loci analizzati, con relativi range di lettura, e l'aplotipo ottenuto per ciascun campione

ID CAMPIONE	RAZZA	LOCUS YE3	DA	A	LOCUS YE17	DA	A	LOCUS YXX	DA	A	APLOTIPO
AA12	Anglo-Arabo	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
AA17	Anglo-Arabo	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
AA25	Anglo-Arabo	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
AA26	Anglo-Arabo	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
AA29	Anglo-Arabo	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
AA30	Anglo-Arabo	10594delT	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT3
B01	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B02	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B03	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B04	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B05	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B06	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B07	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B08	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B17	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B19	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B43	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B44	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B45	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B46	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B47	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
B48	Bardigiano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
G16	Giara	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
G17	Giara	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
G19	Giara	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
G20	Giara	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
G21	Giara	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
G22	Giara	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
G23	Giara	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
G24	Giara	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
G25	Giara	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
G26	Giara	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
G27	Giara	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
G37	Giara	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
L033	Lipizzano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
L100	Lipizzano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
L167	Lipizzano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1

L190	Lipizzano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
L249	Lipizzano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
L364	Lipizzano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
L385	Lipizzano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
L391	Lipizzano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
L395	Lipizzano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
L404	Lipizzano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
L898	Lipizzano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
L971	Lipizzano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
M127	Maremmano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
M365	Maremmano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
M632	Maremmano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
M688	Maremmano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
M690	Maremmano	10594delT	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT3
M693	Maremmano	10594delT	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT3
M694	Maremmano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
M695	Maremmano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
M697	Maremmano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
M698	Maremmano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
MF01	Monterufolino	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
MF62	Monterufolino	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
MF64	Monterufolino	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
MG06	Murgese	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
MG19	Murgese	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
MG20	Murgese	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
PS11	Purosangue Inglese	10594delT	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT3
SC16	Sarcidano	come ref	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT2
SC17	Sarcidano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
SC18	Sarcidano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
SC19	Sarcidano	10594delT	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT3
SC20	Sarcidano	10594delT	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT3
SC21	Sarcidano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
SC22	Sarcidano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1
SC23	Sarcidano	10594delT	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT3
SC24	Sarcidano	10594delT	10592	11330	1277A	1240	1410	come ref	25342	25480	HT3
SC25	Sarcidano	come ref	10592	11330	come ref	1240	1410	come ref	25342	25480	HT1

Tab. 2 Elenco dei campioni e dei loci analizzati

I dati ottenuti sono stati analizzati, raggruppandoli nelle diverse razze analizzate, riportando il numero di campioni ottenuti per ciascun aplotipo e relative frequenze (riportate in parentesi)

RAZZA	HT1	HT2	HT3	TOTALE
Anglo-Arabo	0	5 (83,33%)	1 (16,66%)	6
Bardigiano	16 (100,00%)	0	0	16
Giara	3 (25,00%)	9 (75,00%)	0	12
Lipizzano	3 (25,00%)	9 (75,00%)	0	12
Maremmano	0	8 (80,00%)	2 (20,00%)	10
Monterufolino	2 (66,66%)	1 (33,33%)	0	3
Murgese	0	3 (100,00%)	0	3
Purosangue Inglese	0	0	1 (100,00%)	1
Sarcidano	5 (50,00%)	1 (10,00%)	4 (40,00%)	10
Totale	29 (39,73%)	36 (49,32%)	8 (11,05%)	73

Tab. 3 Razze e frequenze degli aplotipi

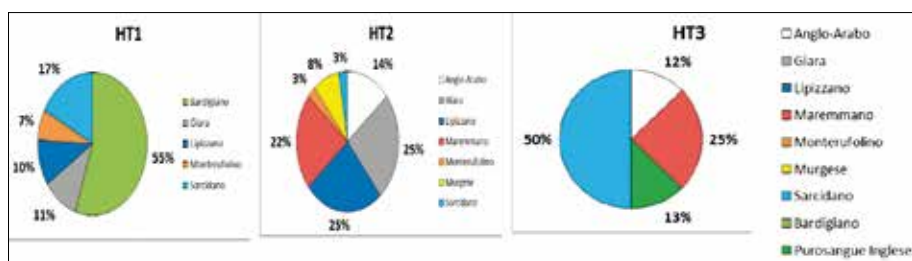


Fig. 5 Distribuzione delle razze italiane nei vari aplotipi MSY equini

1. tutti i campioni appartenenti alla razza Bardigiana presentano aplotipo HT1;
2. i campioni di razza Murgese sono tutti rappresentati dall'aplotipo HT2;
3. i campioni di razza Sarcidana presentano tutti e tre gli aplotipi, con una prevalenza di aplotipo HT1 (50%) e HT3 (40%).
4. più della metà dei campioni che presentano aplotipo HT1 sono Bardigiani (55%);
5. 72% dei campioni con aplotipo HT2 appartengono alle razze Lipizzano, Giara e Maremmano (rispettivamente 25%, 25% e 22%);
6. la metà dei campioni che presentano HT3 sono Sarcidani.

Ulteriori considerazioni che si possono estrarre considerando la variabilità riscontrata nell'MSY confermano le considerazioni fatte per l'mtDNA.

Dalla tabella riassuntiva e dalle torte riportate si evince anche che:

- l'Anglo Arabo Sardo e il Maremmano hanno simile distribuzione degli aplotipi:
 - a. HT1 è distribuito tra le varie popolazioni mondiali ma non è strettamente legato agli stalloni fondatori del Cavallo da Sella moderno;
 - b. HT2 ha maggior frequenza nei Cavalli da Sella moderni probabilmente a causa dell'utilizzo degli stalloni Arabi e dei Purosangue fondatori (Godolphin Arabian, Byerley Turk e Darley Arabian);
 - c. HT3 ha maggior frequenza nei Cavalli da Sella per l'ampio effetto fondatore dovuto a Darley Arabian.
- Bardigiano presenta solo l'aplotipo HT1, il più comune nei cavalli non considerati Warmblood.
- Giara, Monterufolino e Lipizzano presentano HT1 e HT2: queste infatti sono razze non Warmblood con forte componente araba e con scarsa influenza del Purosangue Inglese (soprattutto il Lipizzano).
- Murgesse presenta solo HT2 come era atteso essendo i tre fondatori di derivazione orientale.
- Sarcidano presenta HT1, HT2 e HT3. Quest'ultima è una popolazione di numero ridotto e con genealogie non accertate.

PUBBLICAZIONI

ACHILLI A., OLIVIERI A., SOARES P., LANCIONI H., HOOSHIAR KASHANI B., PEREGO U.A., NERGADZE S.G., CAROSSA V., SANTAGOSTINO M., CAPOMACCIO S., FELICETTI M., AL-ACHKAR W., PENEDO M.C., VERINI-SUPPLIZI A., HOUSHMAND M., WOODWARD S.R., SEMINO O., SILVESTRELLI M., GIULOTTO E., PEREIRA L., BANDELT H.J., TORRONI A. (2012): *Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication*, «Proc Natl Acad Sci», USA. Feb 14; 109(7):2449-54. Epub 2012 Jan 30.

CARDINALI I., LANCIONI H., CAPOMACCIO S., CAPPELLI K., GIONTELLA A., PEREGO U.A., CAPODIFERRO M.R., RIZZI E., OLIVIERI A., SILVESTRELLI M., ACHILLI A.: *The horse mitochondrial haplogroup variation in ten Italian local breeds*, XIII Congress of the Italian Federation of Life Sciences.

Studio sulla biodisponibilità di peptidi con effetti sulla salute umana

Responsabile Scientifico

Alessandro Nardone, *Università della Tuscia*

Unità di ricerca UNITUS: Alessandro Nardone, Umberto Bernabucci, Nicola Lacetera, Elisabetta Catalani, Patrizia Morera, Loredana Basiricò

Le proteine del latte stanno avendo molta attenzione come potenziali componenti nel promuovere la salute. Durante la digestione gastro-intestinale del latte, i processi fermentativi del latte e durante la stagionatura dei formaggi sono liberati dei biopeptidi. I biopeptidi del latte hanno mostrato avere numerose attività funzionali che positivamente influenzano i sistemi cardiovascolare, digestivo, endocrino, immunitario e nervoso. Tra i peptidi bioattivi del latte, meritano una attenzione particolare quelli con effetto ACE-inibitorio per il loro ruolo nella regolazione della pressione sanguigna e quelli correlati alle patologie di tipo metabolico (diabete di tipo 2).

Pertanto gli obbiettivi della ricerca di questa UO sono stati quelli di indagare:

- l'effetto ipotensivo di peptidi presenti nei formaggi, studio *in vitro* e *in vivo*;
- il meccanismo di trasporto attraverso il sistema epiteliale dell'intestino dei peptidi ipotensivi, studio *in vitro*;
- l'effetto inibitorio sulla proteasi DPP4 di peptidi derivanti dalla proteolisi delle due maggiori lattoproteine del siero, l' α -lattoalbumina (α -LA) e la β -lattoglobulina (β -LG) e sue varianti, studio *in vitro*;

Nel primo studio è stata valutata l'attività ACE-inibitoria e l'effetto ipotensivo dei peptidi bioattivi naturalmente presenti nel Parmigiano Reggiano (PR) e Grana Padano (GP), che si sono formati durante la fase di maturazione dei formaggi. Sono stati analizzati 3 campioni di PR e 3 campioni di GP a 32 mesi di stagionatura, i campioni di PR e GP sono stati reperiti da caseifici selezionati nelle rispettive zone geografiche di produzione, e per entrambi

è stata estratta la frazione solubile (WSE). La WSE è stata successivamente sottoposta a digestione enzimatica *in vitro* per simulare la digestione gastrointestinale. La digestione è stata eseguita utilizzando i principali enzimi digestivi: pepsina, tripsina e α -chimotripsina, rapporto enzima/proteina 1:100. La qualità di tutti i prodotti digeriti è stata valutata mediante SDS-PAGE. La frazione con peso molecolare < 3000 Da è stata ottenuta mediante ultrafiltrazione della WSE e della WSE digerita con Amicon Ultra (Millipore, USA). Il dosaggio delle proteine totali contenute nella WSE e nella WSE digerita è stato eseguito mediante il kit FluoroProfile Protein Quantification (Sigma, USA). L'attività ACE-inibitoria è stata testata sia sulla WSE non digerita che sulla WSE digerita *in vitro*. Tutte le analisi sono state eseguite in triplicato. Per quanto riguarda l'attività di ACE-inibizione, è stato utilizzato un test spettrofotometrico molto affidabile e veloce, che ci ha consentito di testare le miscele peptidiche a maggiore complessità estratte dai formaggi. I risultati del saggio enzimatico sono stati valutati in termini di IC₅₀ (50% inhibitory concentration) preparando per ogni campione una curva d'inibizione utilizzando la concentrazione di peptidi presenti nel campione (asse delle x) e l'attività inibitoria (% di inibizione, asse $\pm Y$).

I risultati hanno mostrato che entrambi i formaggi hanno una consistente attività ACE-inibitoria (tab. 1), infatti i valori di IC₅₀ ottenuti su PR e GP sono molto vicini a quelli di biopeptidi ritenuti a forte azione ACE-inibitoria.

Nella seconda parte dello studio per investigare l'effetto ipotensivo della WSE dei due formaggi è stata eseguita una prova *in vivo* utilizzando come modello sperimentale dei ratti SHR spontaneamente ipertesi. Sono stati utilizzati 20 ratti appartenenti alla specie *Rattus norvegicus* ceppo SHR (maschi di 10-13 settimane), stabulati con temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e luce controllata (12h luce/12h buio). L'alimentazione è stata ad libitum con mangime standard in pellet e acqua naturale sempre a disposizione. I ratti sono stati mantenuti nelle stesse condizioni per tutta la durata della sperimentazione. I ratti sono stati adattati alle nuove condizioni ambientali e alla manipolazione da parte degli sperimentatori per un minimo di 5 giorni. Per la sperimentazione gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi, ciascun gruppo era costituito da 5 animali, due gruppi sono stati trattati con la WSE di PR e GP 200 mg/ratto/giorno, rispettivamente, un gruppo di controllo negativo trattato con acqua e un gruppo di controllo positivo trattato con il captopril 50 mg/Kg. I trattamenti sono stati somministrati agli animali giornalmente per 10 settimane, la misurazione della pressione è stata effettuata settimanalmente, tramite un sistema non invasivo "tail cuff".

I risultati hanno mostrato che la somministrazione della WSE del PR e GP

CAMPIONI	IC ₅₀ (µg DI PEPTIDI/ml) WSE	IC ₅₀ (µg DI PEPTIDI/ml) WSE DIGERITA
PR	16.8±4.4	14.8±1.6
GP	10.8±1.1	15.5±5.0

Tab. 1 Attività ACE-inibitoria della frazione < 3000 Da della WSE e della WSE digerita da Parmigiano Reggiano (PR) e Grana Padano (GP) stagionati 32 mesi.

non ha indotto nessuna riduzione della pressione sistolica e diastolica dopo 10 settimane di trattamento. Infatti non sono state osservate differenze significative tra PR e GP vs acqua, invece il captopril è risultato significativamente diverso dagli altri trattamenti per $P < 0.01$ (fig. 1). Questo studio fornisce la prova che la consistente attività ACE-inibitoria *in vitro* dei peptidi bioattivi naturalmente presenti nella WSE dei due formaggi non ha prodotto alcun effetto anti-ipertensivo *in vivo*. Pertanto l'attività ACE-inibitoria *in vitro* non può essere utilizzata come criterio esclusivo per valutare le potenziali sostanze ipotensive, invece si rende necessario verificare gli effetti anti-ipertensivi benefici dei peptidi bioattivi *in vivo*, poiché *in vivo* si potrebbe verificare una riduzione della loro biodisponibilità, attribuibile a degradazione enzimatica e/o a un ridotto assorbimento.

Nella terza parte dello studio per ciascuno dei due formaggi è stato fatto un confronto fra l'attività ACE-inibitoria delle WSE di campioni di PR e GP con stagionatura di 12 e 32 mesi. Le analisi sono state eseguite sulla frazione <3000 Da, utilizzando le metodiche descritte precedentemente. Inoltre sono state eseguite le determinazioni dei contenuti di due tripeptidi Valina-prolina-prolina (VPP) e isoleucina-prolina-prolina (IPP) presenti nella WSE delle quattro tipologie di formaggio (PR 12 e 32 mesi, GP 12 e 32 mesi). Il contenuto dei tripeptidi è stato determinato tramite cromatografia liquida e spettrometria di massa ad alta risoluzione (LC/ESI-HRMS). La quantificazione è stata eseguita tramite taratura con standard esterno utilizzando i peptidi VPP e IPP sintetici (GenScript, Piscataway, NJ).

I risultati indicano per ambedue i formaggi una maggiore azione ACE-inibitoria e un maggiore contenuto di VPP e IPP nei campioni stagionati 12 mesi rispetto ai campioni stagionati 32 mesi (tab. 2). I valori riportati in tabella per ciascuna tipologia di formaggio si riferiscono alla media di sei campioni provenienti ciascuno da un caseificio diverso. Tutti i caseifici sono stati individuati nelle rispettive zone di produzione.

È stata effettuata un'analisi per confrontare la concentrazione di VPP e IPP e l'attività ACE-inibitoria (IC₅₀) della WSE di Grana Padano (a,b) e Parmigiano Reggiano (c,d) (fig. 2). I risultati mostrano che il tempo di maturazione

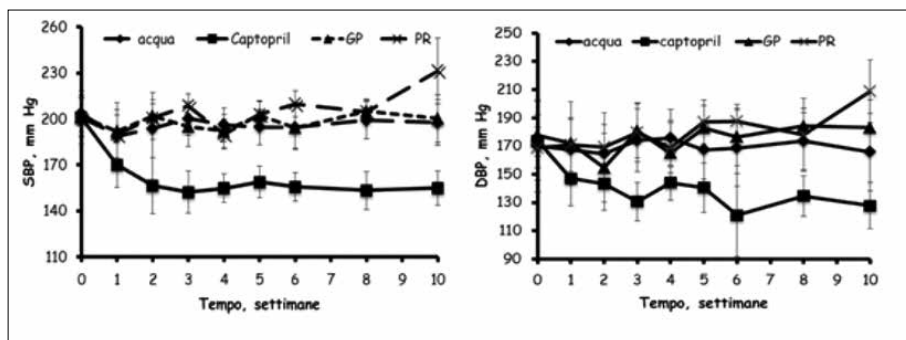


Fig. 1 Variazioni (A) della pressione sanguigna sistolica (SBP) e (B) della pressione diastolica (DBP) in ratti SHR prima (tempo 0) e dopo 10 settimane di trattamento con acqua, captopril, estratto solubile del Parmigiano Reggiano e Grana Padano.

è inversamente correlato con la concentrazione di IPP e VPP. Confrontando i risultati ottenuti da questo studio con i dati riportati in letteratura sul contenuto di VPP e IPP in altri formaggi è stato osservato che i formaggi GP e PR hanno un minore contenuto di IPP e VPP rispetto ad altri formaggi. La concentrazione di IPP e VPP non spiega i valori di IC₅₀, infatti la WSE di GP e PR ha mostrato una elevata attività ACE-inibitoria nonostante il minor contenuto di IPP e VPP rispetto ad altri formaggi, quindi nel GP e PR non vi è alcuna relazione tra il contenuto di IPP e VPP e i valori di IC₅₀.

Nel secondo studio è stata esaminato il meccanismo di trasporto attraverso il sistema epiteliale dell'intestino dei peptidi ipotensivi contenuti nel Parmigiano Reggiano stagionato 12 mesi. Sono stati utilizzati 6 campioni di PR a 12 mesi di stagionatura reperiti da caseifici selezionati nelle rispettive zone geografiche di produzione. Ciascun campione di Parmigiano Reggiano è stato sottoposto a digestione in vitro. Il protocollo che è stato utilizzato mima la digestione umana e quindi le tre principali fasi: orale, gastrica e duodenale di seguito descritte. In ognuna delle suddette fasi è stato riprodotto il fluido contenente gli opportuni enzimi digestivi. I campioni di formaggio (2,5 g) sono stati triturati in presenza di 5 ml di liquido salivare simulato (SSF) a pH 7,0 per 2 min per riprodurre la masticazione. Il bolo derivato è stato mescolato con 5 ml di fluido gastrico simulato (SGF) integrato con pepsina suina (1000 U / mL di SGF). La fase gastrica è stata eseguita a 37 °C per 2 ore a pH 3,0. Successivamente, 10 ml di fluido simulato duodenale (SDF) e sali biliari (10 mM, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) sono stati aggiunti al digerito. Gli enzimi per la digestione intestinale sono stati tripsina porcina (100 U / mL SDF), chimotripsina bovina (50 U / mL SDF), lipasi intestinali (2000 U / mL SDF) e co-lipasi suina (rapporto

Formaggio	Tempo di maturazione (mesi)	Numero di campioni	Tripeptidi (mg kg ⁻¹ formaggio)			IC ₅₀ (μg ml ⁻¹)
			VPP	IPP	VPP/IPP	
GP	12	6	6.21 B 1.94	3.40 B 1.41	1.89 b 0.27	7.57 b 1.82
	32	6	1.69 C 1.05	0.56 C 0.31	2.93 a 0.45	8.40 ab 1.74
PR	12	6	9.15 A 3.85	4.37 A 2.16	2.22 a 0.42	7.92 b 1.90
	32	6	1.44 C 0.62	0.69 C 0.44	2.31 a 0.49	9.61 a 1.96

A,B,C = P<0.01; a,b = P<0.05

Tab. 2 Attività ACE-inibitoria e contenuto di VPP e IPP della WSE (frazione < 3000 Da) di Parmigiano Reggiano e Grana Padano stagionati 12 e 32 mesi.

molare lipasi / colipasi: 1/2). La fase intestinale della digestione è stata eseguita a 37 °C per 2 ore a pH 7,0. Dopo la digestione, la frazione con peso molecolare < 3000 Da è stata ottenuta mediante ultrafiltrazione della WSE digerita con Amicon Ultra (Millipore, USA). Tutte le frazioni < 3000 Da delle WSE e delle WSE digerite sono state analizzate per valutare la concentrazione dei peptidi ACE-inibitori e per determinare l'attività ACE-inibitoria, utilizzando le metodiche descritte precedentemente.

Come modello sperimentale per lo studio dell'assorbimento intestinale è stata utilizzata la linea cellulare Caco-2 (clone C2BBel) isolata da un adenocarcinoma del colon umano. Per studiare il destino dei peptidi ACE-Inibitori presenti nei campioni di PR digeriti, sono state incubate le cellule Caco-2, coltivate in monostrato su una membrana semi-permeabile, con le frazioni < 3000 Da delle WSE dei campioni PR digeriti. Alla fine dell'esperimento di trasporto sono stati analizzati i peptidi presenti nella frazione apicale e nella frazione basolaterale della camera di coltura, tramite cromatografia liquida e spettrometria di massa ad alta risoluzione (LC/ESI-HRMS).

I risultati hanno mostrato che nella WSE e nella WSE digerita del PR sono stati identificati e quantificati otto peptidi ACE inibitori (ACE-I) derivati dalle α1 e β caseina bovina (VPP, IPP, RYLG, RYLG, AYFYPEL, AYFYPE, LHLPLP e HLPLP). Solo i peptidi ACE-I VPP, IPP, LHLPLP e HLPLP sono stati osservati nella WSE dei campioni non digeriti di PR. Dopo la digestione gastrointestinale *in vitro*, gli stessi peptidi ACE-I insieme ai peptidi AYFYPEL e AYFYPE di nuova formazione sono stati trovati nella

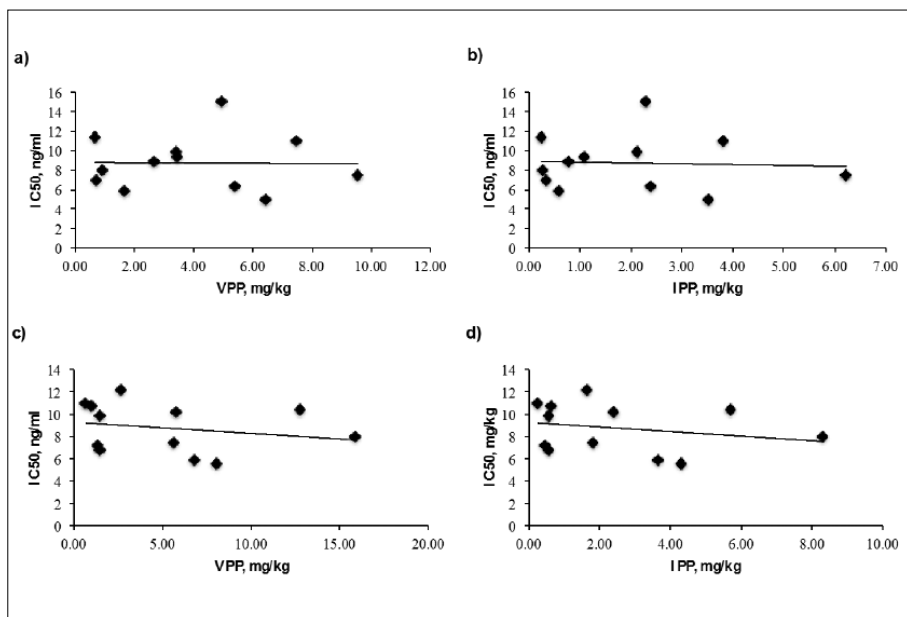


Fig. 2 Analisi della concentrazione di VPP e IPP e dell'attività ACE-inibitoria (IC₅₀) della WSE di Grana Padano (a,b) e Parmigiano Reggiano (c,d).

WSE digerita di PR (tab. 3). Il valore di IC₅₀ è risultato inferiore nella WSE digerita rispetto alla WSE non digerita, da 3.20 ± 1.69 a $7.92 \pm 2.08^{a-b}$ ($P < 0.05$), rispettivamente (tab. 4).

I risultati dopo l'esperimento di trasporto hanno evidenziato che nella frazione apicale è stata rilevata la presenza degli stessi peptidi presenti nella WSE digerita (VPP, IPP, AYFYPE, AYFYPEL, LHLPLP e HLPLP), ma in concentrazioni minori del 60-80% (tab. 5). È stato osservato un tasso di trasporto attraverso il monostrato cellulare dello 0,6% per il peptide LHLPLP, inoltre un tasso di trasporto superiore (2,9%) è stata accertato per il peptide HLPLP. Nessun altro peptide ACE-Inibitore è stato ritrovato nel compartimento basolaterale. Per la prima volta, questi risultati dimostrano che i peptidi ACE-Inibitori HLPLP e LHLPLP presenti nella WSE digerita di formaggio PR sono, attraverso un modello *in vitro*, parzialmente assorbiti dall'epitelio intestinale umano. Questo studio ha evidenziato che l'attività ACE-inibitoria di GP e PR osservata *in vitro* è principalmente dovuta alla maggiore concentrazione di LHLPLP e HLPLP rispetto all'azione di IPP e VPP come di solito indicato in letteratura per altri formaggi.

Campioni PR WSE <3000 Da		VPP	IPP	RYLG	RYLGY	AYFYPE	HLPLP	AYFYPEL	LHLPLP	peptidi ACE-I totali
1	Nodigerita	10.46	6.00	nd	nd	nd	1.15	nd	3.95	21.55
	Digerita	2.10	1.62	nd	nd	4.38	68.51	2.79	1,879.92	1,959.33
2	Nodigerita	3.92	2.58	nd	nd	nd	1.21	nd	5.51	13.23
	Digerita	5.35	2.02	nd	nd	17.32	42.59	13.39	2,750.26	2,830.94
3	Nodigerita	3.00	2.44	nd	nd	0.00	1.13	nd	3.70	10.27
	Digerita	5.46	3.57	nd	nd	4.26	49.39	6.57	3,053.28	3,122.52
4	Nodigerita	2.36	1.58	nd	nd	nd	1.32	nd	3.93	9.19
	Digerita	2.37	1.43	nd	nd	2.13	65.10	2.62	1,985.34	2,059.00
5	Nodigerita	6.33	4.33	nd	nd	nd	1.43	nd	8.77	20.85
	Digerita	5.50	3.75	nd	nd	nd	71.06	2.51	2,532.23	2,615.05
6	Nodigerita	1.97	1.55	nd	nd	nd	1.23	nd	3.72	8.46
	Digerita	3.04	1.53	nd	nd	8.62	57.16	10.85	2,702.68	2,783.87
1-6	Nodigerita	medi a DS	4.67 3.23	3.08 1.75			1.25 ^a 0.11		4.93 ^a 2.00	13.92 5.87
	Digerita	medi a DS	3.97 1.63	2.32 1.06		7.34 6.06	58.97 ^b 11.30	6.46 4.71	2,483.95 ^b 460.15	2,561.78 459.30

Tab. 3 *Concentrazione dei peptidi ACE-inibitori della WSE e della WSE digerita (frazione < 3000 Da) dei campioni di Parmigiano Reggiano stagionati 12 mesi. nd: non rilevato*

CONCLUSIONI

Questa ricerca ha mostrato per la prima volta che i formaggi Parmigiano Reggiano e Grana Padano hanno una elevata attività ACE-inibitoria, che diversamente da quanto indicato in letteratura per altri formaggi non è dovuta all'azione dei tripeptidi IPP e VPP, ma è principalmente determinata da altri peptidi a maggiore peso molecolare quali LHLPLP e HLPLP. Inoltre, questo studio ha dimostrato, utilizzando il modello cellulare Caco-2, che i peptidi ACE-Inibitori HLPLP e LHLPLP presenti nel formaggio Parmigiano Reggiano sono assorbiti dall'epitelio intestinale umano. Nonostante la consistente attività ACE-inibitoria dei biopeptidi presenti nei due formaggi PR e GP, la

CAMPIONI PR	FRAZIONE WSE	IC ₅₀ (µg PEPTIDI/ml)
1	Non digerita	5.94
	Digerita	1.13
2	Non digerita	10.44
	Digerita	3.07
3	Non digerita	5.51
	Digerita	3.32
4	Non digerita	7.44
	Digerita	1.63
5	Non digerita	7.95
	Digerita	4.35
6	Non digerita	10.21
	Digerita	5.68
1-6	Non digerita	media 7.92a
		DS 2.08
1-6	Digerita	media 3.20b
		DS 1.69

Tab. 4 Attività ACE-inibitoria della WSE e della WSE digerita (frazione < 3000 Da) dei campioni di Parmigiano Reggiano stagionati 12 mesi.

somministrazione in vivo a ratti SHR spontaneamente ipertesi della frazione solubile estratta dai formaggi, alle concentrazioni testate nel nostro studio, non ha prodotto alcun effetto ipotensivo o ipertensivo.

Nel terzo studio per valutare l'influenza delle proteine del siero del latte come fonte di peptidi bioattivi sull'attività del sistema endocrino intestinale sono stato eseguiti due studi *in vitro*.

Il siero del latte può avere proprietà nutraceutiche utili ai fini del trattamento dietetico di individui affetti da diabete mellito di tipo 2, patologia spesso correlata a obesità. I peptidi GIP e GLP-1 (incretine) sono ormoni prodotti da cellule dell'intestino tenue. Rilasciati in circolo subito dopo il pasto, potenziano la secrezione di insulina in modo glucosio-dipendente, contribuendo a un miglior controllo glicemico post-prandiale. Le incretine sono rapidamente inattivate da una proteasi specifica, la dipeptidil-peptidasi-4 (DPP-4). Gli alimenti possono essere fonte di inibitori di DPP-4, liberati a seguito della loro digestione.

Mediante studi *in vitro*, è stata confrontata la modulazione dell'attività di DPP-4 da parte delle due maggiori lattoproteine del siero, la β -lattoglobulina (β -LG) e l' α -lattoalbumina (α -LA). Le due proteine purificate sono state sottoposte a idrolisi enzimatica che simulasse la digestione gastrointestinale. I prodotti di basso peso molecolare derivati dall'idrolisi sono stati separati dalle proteine ancora intatte mediante microfiltrazione con dispositivi da centrifugazione.

CAMPIONI PR	FRAZIONE	VPP	IPP	RYLG	RYLGY	AYFYPE	HLPPLP	AYFYPEL	LHLPPLP
1	apicale	0.82±0.01	1.08±0.02	nd	nd	1.33±0.01	35.84±0.78	2.38±0.01	652.33±12.76
	basolaterale	nd	nd	nd	nd	nd	0.74±0.4	nd	2.52±0.27
2	apicale	nd	nd	nd	nd	0.46±0.00	1.59±0.01	2.18±0.00	632.50±10.16
	basolaterale	nd	nd	nd	nd	nd	0.72±0.03	nd	2.19±0.37
3	apicale	1.20±0.02	1.45±0.03	nd	nd	1.11±0.09	28.15±1.35	2.97±0.03	851.69±2.87
	basolaterale	nd	nd	nd	nd	nd	0.76±0.02	nd	3.50±0.51
4	apicale	0.92±0.01	1.04±0.01	nd	nd	0.92±0.00	33.76±0.60	2.39±0.02	772.22±0.07
	basolaterale	nd	nd	nd	nd	nd	0.85±0.01	nd	4.50±0.40
5	apicale	0.87±0.02	1.11±0.02	nd	nd	0.40±0.01	29.70±2.50	2.22±0.02	439.84±4.81
	basolaterale	nd	nd	nd	nd	nd	1.49±0.11	nd	7.39±0.34
6	apicale	0.71±0.2	0.83±0.01	nd	nd	1.40±0.00	28.15±1.66	3.20±0.01	546.63±5.69
	basolaterale	nd	nd	nd	nd	nd	0.79±0.02	nd	2.65±0.06
1-6	apicale	0.90	1.10			1.03	31.12a	2.63	649.20a
	me- dia								
	DS	0.18	0.22			0.40	3.50	0.43	148.85
1-6	basolaterale						0.89b		3.79a
	me- dia								
	DS						0.30		1.95

Tab. 5 Concentrazione (mg/kg) dei peptidi ACE-I presenti nelle frazioni apicali e basolaterali dopo (1h) trasporto transepitelliale attraverso il monostrato di cellule Caco-2 della WSE digerita in vitro dei campioni di formaggio PR.

ga. È stata valutata l'attività inibitoria dei permeati recuperati dalla microfiltrazione (peptidi a basso peso molecolare) nei confronti della proteasi DPP-4 *in vitro*, mediante saggio enzimatico. È stato, inoltre, valutato l'effetto dei prodotti di idrolisi delle due proteine sulla secrezione di un ormone gastrointestinale, la colecistochinina, che ha diverse funzioni a livello viscerale ma che rappresenta anche un importante segnale di sazietà diretto al sistema nervoso centrale, e la cui secrezione è già nota essere influenzata dalla frazione proteica degli alimenti.

I risultati ottenuti suggeriscono che i prodotti di digestione della β -LG siano più potenti nell'inibire DPP-4 rispetto a quelli derivati dall' α -LA e che pertanto il contenuto relativo di β -LG possa influenzare l'impatto del latte o di derivati contenenti la frazione del siero, sulla regolazione glicemica attraverso la modulazione dell'attività della proteasi DPP-4. Un diverso contenuto di β -LG, dovuto alla ben nota differente espressione delle due principali varianti genetiche (β -LG^{*A} > β -LG^{*B}), potrebbe determinare la quantità di piccoli peptidi inibitori della proteasi DPP-4 generati durante la digestione di diversi tipi di latte ottenuti da diverse razze bovine. Infine, alla dose più alta testata, i due idrolizzati stimolano *in vitro* la secrezione di colecistochinina da cellule enteroendocrine in coltura, senza differenze significative tra loro.

CONCLUSIONI

Questa ricerca ha evidenziato che le due maggiori sieroproteine del latte bovino possono entrambe, nel corso della digestione, liberare peptidi bioattivi in grado di inibire la proteasi DPP-4, prolungando in questo modo l'azione di ormoni peptidici importanti per il controllo glicemico post-prandiale e per la regolazione dell'appetito. I dati *in silico* e *in vitro* suggeriscono che la β -lattoglobulina sia potenzialmente fonte di un maggiore numero di peptidi inibitori di DPP-4 rispetto alla α -lattalbumina. Inoltre gli idrolizzati di entrambe le sieroproteine risultano *in vitro* altamente efficaci nell'inibire la proteasi DPP-4.

LAVORI PRODOTTI

BERNABUCCI U., MORERA P., CATALANI E., BASIRICÒ L. AND NARDONE A. (2013): *ACE-inhibitory activity and antihypertensive effect of biopeptides in aged hard cheeses*, 13th International Conference of FFC - First International Symposium of ASFFBC: Functional and Medical Foods with Bioactive Compounds: Science and Practical Ap-

- plication, 2013, Kyoto-Japan. Abstract Book; "Functional and Medical Foods with Bioactive Compounds - Science and Practical Application" Volume 13, pp. 160-162.
- CATALANI E., BASIRICÒ L., MORERA P., BERNABUCCI U., NARDONE A. (2013): *Angiotensin-Converting Enzyme inhibitory activity of water soluble extract of Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses*, XX CONGRESSO ASPA - Associazione per la Scienza e le Produzioni Animali, Bologna-Italia, «Italian Journal of Animal Science», 12, S1, 105.
- BERNABUCCI U., CATALANI E., BASIRICÒ L., MORERA P. AND NARDONE A. (2014): *In vitro ACE inhibitory activity and in vivo antihypertensive effects of water-soluble extract by Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses*, «Int. Dairy J.», 37, pp. 16-19.
- BASIRICÒ L., MORERA P., CATALANI E., BERNABUCCI U., NARDONE A. (2014): *ACE-inhibitory activity of two hard cheeses at different ripening stages*, EAAP Congress poster 15, session 48, p. 397.
- TULIPANO G., FAGGI L., NARDONE A., COCCHI D., CAROLI A. (2014): *Comparison of beta-lactoglobulin to alpha-lactalbumin as potential source of bioactive peptides affecting dipeptidyl peptidase-IV (DPPIV) activity and hormone release from enteroendocrine cells: in vitro studies*, VII International Whey Conference, Rotterdam, 7-9 Settembre 2014.
- TULIPANO G., FAGGI L., NARDONE A., COCCHI D., CAROLI A.M (2014): *Le proteine del siero del latte come fonte di peptidi bioattivi in grado di influenzare l'attività del sistema endocrino intestinale: studi in vitro*, 4° Congresso Lattiero-Caseario AITeL "Latte e Derivati: Ricerca, Innovazione e Valorizzazione", Padova, 12 settembre 2014.
- TULIPANO G., FAGGI A., NARDONE A., COCCHI D., CAROLI A.M. (2015): *Characterisation of the potential of β -lactoglobulin and α -lactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function: In silico and in vitro comparative studies*, «International Dairy Journal» <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.008>.
- TULIPANO G., FAGGI L., CACCIAMALI A., CAROLI A.M. (2015): *Whey proteins as functional food affecting metabolic health*, «Italian Journal of Animal Science», 14, S1, 100.
- BASIRICÒ L., CATALANI E., MORERA P., CATTANEO S., STUKNYTĖ M., BERNABUCCI U., DE NONI I., NARDONE A. (2015): *Release of ACE-inhibitor Peptides during in vitro Gastro-intestinal Digestion of Parmigiano Reggiano PDO Cheese and their Absorption through an in vitro Model of Intestinal Epithelium*, «J. Dairy Sci. J.», 98, pp. 7595-7601.

Aspetti genetici della suscettibilità ad alcune malattie nei bovini

Responsabile Scientifico

John L. Williams *Parco Tecnologico Padano, Lodi*

AREA DI STUDIO: BVD

Introduzione

La Diarrea virale bovina (BVD) è una malattia diffusa in tutto il mondo che causa importanti perdite all'industria casearia, dovute alla riduzione delle difese immunitarie degli animali e a una diminuzione della fertilità. [1] La malattia è causata da due specie di virus chiamate BVDV-1 e BVDV-2. Entrambi sono RNA virus a singolo filamento a polarità positiva appartenenti alla famiglia dei Flaviviridae. Esistono diversi ceppi del BVDV che sono raggruppati in due grandi categorie in base alla capacità o meno di sviluppare un effetto citopatico sulle cellule infettate (rispettivamente ncp e cp) [2]. Entrambi i biotipi possono provocare l'insorgenza della Mucosal Disease (MD) una manifestazione clinica a esito fatale dell'infezione [3], ma anche sindromi respiratorie, gastroenteriche e riproduttive [4]. La trasmissione del virus ncp da madri infette al feto nel primo trimestre di gestazione provoca nella maggior parte dei casi uno stato di immuno tolleranza nel feto che porta l'animale a essere persistentemente infetti (PI) e a diffondere il virus per molti anni [5]. Dopo molti anni gli animali PI sviluppano la MD a causa di una successiva infezione con virus cp [6]. Mentre l'instaurarsi di una infezione persistente con virus ncp nel feto è correlata con la mancata produzione di IFN α/β , l'infezione acuta con virus cp è accompagnata dalla produzione di IFN α/β endogeno [6]. Il BVDV infetta prevalentemente le cellule del sistema immunitario e in particolare i Monociti, i Macrofagi e le Cellule Dendritiche (DC) sono coinvolti nell'iniziale riconoscimento del virus e nella presentazione degli antigeni virali al sistema immunitario [7]. Fra le diverse

Antigen Presenting Cells (APC) le cellule dendritiche sono le uniche a essere in grado di generare una risposta immunitaria primaria in animali naive [8]. L'infezione delle APC da parte del virus può avere un effetto importante sulle cellule e conseguenze nella successiva risposta immunitaria come ad esempio il rilascio di molecole co-stimolatorie e una variazione nel livello di espressione di diverse citochine [8]. Il livello di espressione delle proteine di fase acuta e delle molecole di adesione aumenta in seguito all'infezione, ad esempio il livello di CD14 (coinvolto nella produzione di TLR-4 IFN1) e di proteine Mx aumenta in modo significativo in monociti infetti [9]. L'infezione con ceppi cp promuove l'attivazione dei monociti e il loro differenziamento ma inibisce la capacità di presentazione dell'antigene alle cellule T immunocompetenti, il che può compromettere i meccanismi di difesa antivirale dell'ospite e favorire la diffusione del virus [10]. L'effetto dell'infezione virale sulla presentazione degli antigeni da parte delle APC sembra dipendere fortemente dal ceppo virale e dalla maturità delle APC stesse. Studi in vitro hanno dimostrato che la capacità di presentazione dell'antigene alle cellule T Helper (Th) in seguito all'infezione si riduce molto nei monociti mentre non sembra variare nelle DC [11]. Anche l'effetto sulle popolazioni di cellule T sembra dipendere fortemente dal tipo di ceppo virale infettante. Le cellule Th CD4⁺ giocano un ruolo chiave nel coordinare la risposta cellulo-mediata alle prime fasi dell'infezione. Questa risposta, diretta principalmente alle proteine virali NS3 ed E2 [12], è stata misurata mediante saggi di proliferazione che rappresentano una misura indiretta della memoria immunitaria agli antigeni virali. La risposta proliferativa delle cellule T avviene più velocemente in presenza di ceppi cp e gli animali infettati con questi ceppi generano una risposta cellulo-mediata di tipo Th1 fra le 2 e le 5 volte più elevata rispetto ai ceppi ncp [13].

Numerosi studi condotti sull'uomo e sul topo hanno dimostrato che i meccanismi della risposta immunitaria innata e adattativa sono regolati dai microRNA [14], ma il ruolo di queste molecole in specie importanti per l'agricoltura, come ad esempio le vacche, è stato poco analizzato. Alcuni studi indicano che l'espressione di alcuni miRNAs è specifica in diversi tipi cellulari del sistema immunitario nei quali regolano il differenziamento, lo sviluppo e le funzioni di questi tipi cellulari, ad esempio è stato dimostrato che miR-1792, miR-150 e miR-155 svolgono un ruolo importante nello sviluppo delle cellule B [15]. Nell'uomo miR-146a ha come target il Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 (TRAF6) e l'interleuchina 1 (IL1), geni chiave per il controllo della segnalazione del sistema immunitario innato in risposta al Lipopolisaccaride (LPS) [16]. È stato anche dimostrato che i microRNA svolgono un ruolo importante nella risposta alle infezioni, in particolare sono

stati identificati numerosi miRNA con funzioni regolative nella risposta immune alle infezioni da micobatteri [14]. I microRNA sono molto conservati da un punto di vista evolutivo e molti miRNA identificati in uomo o topo hanno degli ortologhi nel bovino. È quindi ipotizzabile che anche le funzioni di questi miRNA siano conservate e gli studi sull'uomo e sul topo possono rappresentare una buona base di partenza per lo studio dei microRNA nelle infezioni dei bovini e più in generale degli animali d'interesse agricolo. Numerosi studi hanno analizzato se l'espressione di microRNA è alterata in seguito a infezioni con batteri G+ o G- e ad esempio è stato dimostrato che miR-93 e miR-20B sono coinvolti nella risposta immunitaria nelle cellule epiteliali del tessuto mammario in presenza d'infezione da *Streptococcus uberis* [17].

L'elemento chiave per il controllo e l'eradicazione della malattia è la rapida identificazione ed eliminazione degli animali PI in quanto questi contribuiscono fortemente alla diffusione della malattia e rappresentano la principale fonte d'infezione delle nuove mandrie [18]. I programmi di controllo ed eradicazione di diversi paesi sono basati sull'identificazione ed eliminazione degli animali PI, sull'applicazione di misure per prevenire l'introduzione di questi animali nelle mandrie e sulla messa in atto di strategie di sorveglianza per monitorare l'esposizione al BVDV [18]. Questi programmi possono anche includere la vaccinazione in base all'incidenza della malattia nella regione. La possibilità di utilizzare test diagnostici in grado di individuare rapidamente e in fasi precoci gli animali infetti, è cruciale per la buona riuscita dei piani di eradicazione.

Lo scopo di questo lavoro è stato l'identificazione di miRNA differenzialmente espressi in animali sottoposti a vaccinazione con vaccino vivo attenuato per chiarire i meccanismi della risposta immunitaria degli animali alla vaccinazione ed eventualmente individuare potenziali marcatori delle fasi precoci dell'infezione. A questo scopo sono state selezionate sei vacche di razza Frisona, da un allevamento certificato BVD free, cui è stato somministrato il vaccino vivo attenuato allo scopo di mimare la risposta, seppur attenuata, all'infezione virale. È stato prelevato il sangue prima della vaccinazione e a diversi time point dopo la vaccinazione. Il sangue è stato analizzato al citofluorimetro per individuare la risposta cellulare di alcune specifiche popolazioni (cellule T Helper, Cellule T Citotossiche e Monociti). I dati di citofluorimetria hanno permesso di scegliere i time point più rappresentativi per l'analisi molecolare dei microRNA allo scopo di individuare dei miRNA differenzialmente espressi mediante qPCR, rispetto al controllo pre vaccino, da validare come potenziali biomarcatori per le fasi precoci dell'infezione.

T0	Controllo pre vaccino
T1	6 h
T2	24 h
T3	5 giorni
T4	12 giorni
T5	15 giorni
T6	35 giorni

Tab. 1 *Time point dei prelievi di sangue*

ANTIGENE	FLUOROFORO	SPECIE TARGET	CODICE	CLONE	ISOTIPO	PRODUTTORE
CD4	RPE	BOVINE	MCA-1653PE	CC8	IgG2a	Abd Serotec
CD8	RPE	BOVINE	MCA837PE	CC63	IgG2a	Abd Serotec
CD14	FITC	BOVINE	MCA2678F	CC-G33	IgG1	Abd Serotec
CD172a	RPE-Cy5	BOVINE	MCA2041C	CC149	IgG2b	Abd Serotec

Tab. 2 *Anticorpi utilizzati per le analisi di citofluorimetria*

Materiali e metodi

Sei manze Frisone di circa 10 mesi indenni da BVD sono state vaccinate con vaccino vivo attenuate Mucosiffa (Merial). Il sangue è stato prelevato in provette con anticoagulante (EDTA) a diversi time point dopo la vaccinazione (tab. 1) invece il sangue da usare come controllo è stato prelevato dagli stessi animali prima della vaccinazione.

Per le analisi di citofluorimetria sono stati isolati i PBMC utilizzando l'Histopaque 1077 (Sigma) seguendo le istruzioni del fornitore. In breve, diluire 10 ml di sangue con 25 ml di D-PBS e stratificare delicatamente su 15 ml di Histopaque 1077 e centrifugare a 400 g per 30 minuti. Dopo la centrifugazione si formeranno diversi strati: un pellet di globuli rossi, uno strato trasparente di Histopaque, uno strato bianco di PBMC (monociti e linfociti) e il surnatante contenente plasma diluito e piastrine. Prelevare i PBMC lavare e trattare con 10 ml di RBC (5Prime) per eliminare eventuali globuli rossi contaminanti. Centrifugare a 200 g per 5 minuti e risospendere in D-PBS. Le cellule (un milione per staining) sono state marcate per individuare le seguenti popolazioni: Th, Tc e Monociti (tab. 2). Tutti gli anticorpi sono stati diluiti 1:10 e i campioni sono stati analizzati su un FACS Aria III (BD Biosciences) e software FACSDiva 7. I risultati sono espressi come normalized median fluorescence intensity (nMFI).

L'analisi dei microRNA è stata eseguita mediante qPCR sui campioni di sangue di tre animali ai time point T0, T2 e T3. Dal sangue in EDTA sono stati isolati i buffy coat mediante centrifugazione e l'RNA è stato estratto

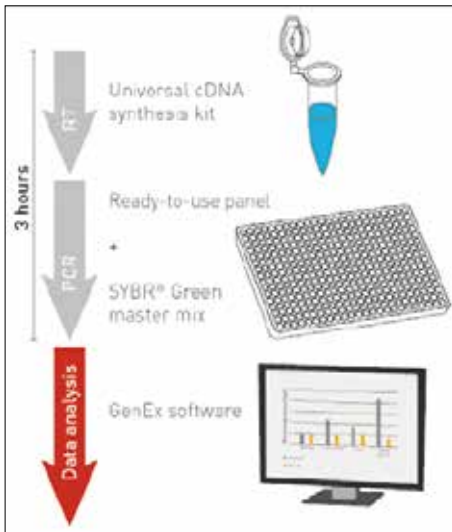


Fig. 1 *miRCURY LNA™ Universal RT-PCR workflow*

utilizzando il kit Nucleospin miRNA (Macherey Nagel) seguendo le istruzioni del fornitore. I campioni sono stati retrotrascritti e analizzati in real time PCR utilizzando il miRCURY LNA Universal RT Human miRNome Panel (Exiqon) (fig. 1). Ogni campione è stato analizzato in duplicato. I miRNA differenzialmente espressi nei bovini sono stati successivamente analizzati mediante miRBase. I Valori di Ct ottenuti mediante RT-qPCR sono stati importati nel software Genex (Exiqon). Il workflow di analisi ha compreso: (i) QC di RT, (ii) inter-plate calibration, (iii) selezione di geni di riferimento mediante NormFinder, e infine (iv) normalizzazione e trasformazione logaritmica (\log_2).

I dati di espressione sono stati analizzati utilizzando il software GenExqPCR e normalizzati con Normfinder. Sono stati utilizzati panel predefiniti per microRNA umani quindi l'omologia tra miRNA differenzialmente espressi e miRNA bovini è stata analizzata tramite mirBASE. I potenziali pathway che coinvolgono i target dei miRNA identificati sono stati ottenuti utilizzando i tools presenti su DIANA e i network sono stati ottenuti con Cytoscape (ClueGO plugin).

Risultati

1) Citofluorimetria

Le analisi di citofluorimetria hanno permesso di analizzare l'andamento delle

popolazioni cellulari di Monociti, Th e Tc a diversi time point dopo l'inoculazione del vaccino, fino a 35 giorni dal trattamento. La marcatura dei monociti con entrambi gli anticorpi con gli anticorpi anti CD14-CD172a ha consentito di individuare 2 distinte popolazioni cellulari che potrebbero rappresentare i Monociti classici CD14⁺CD172a⁺⁺ (cM), e i Monociti non classici CD14⁺CD172a⁺ (ncM). La componente dei ncM a differenza delle altre due popolazioni non ha un ruolo infiammatorio [19]. Precedenti studi hanno mostrato come i ncM in risposta a danni tissutali o infezioni migrano rapidamente al di fuori del circolo sanguigno e invadono i tessuti danneggiati [20].

Per quanto riguarda le popolazioni linfocitarie sono state analizzate le popolazioni di cellule T helper (Th) CD4⁺ e di cellule T citotossiche (Tc) CD8⁺ lungo i diversi time point.

I dati di nMFI indicano un incremento di entrambe le popolazioni linfocitarie dopo 24h (T2) dalla vaccinazione, per poi tornare a livelli paragonabili a prima del trattamento.

2) miRNAs

I dati di citofluorimetria ci hanno permesso di scegliere 3 time point per le analisi dei microRNA con il Pannello predefinito della Exiqon Human miRNome. L'elevata conservazione evolutiva dei microRNA ha permesso l'utilizzo di panel contenenti sonde per miRNA umani e di eseguire quindi un primo screening per valutare i microRNA differenzialmente espressi lungo i time point. Per questo screening sono stati scelti i campioni di tre animali al T0 che rappresenta il nostro controllo, T2 in cui è stato osservato il picco delle popolazioni di linfociti Th e Tc, e il T3 in cui si è manifestato il maggior incremento della popolazione monocitaria. Sono stati identificati 8 microRNA differenzialmente espressi (tab. 3), questi sono tutti implicati nella regolazione del pathway PI3K-Akt, e la maggior parte dei quali (6) è coinvolto nella regolazione del pathway delle MAPK e della produzione di chemochine. Di questi 5 sono down regolati e 3 up regolati (fig. 2).

Discussione

Ormai da anni è stato dimostrato che i microRNA svolgono un ruolo importante nella regolazione e nel funzionamento del sistema immunitario nell'uomo [21], e recenti studi hanno dimostrato che un ruolo simile è svolto anche nei bovini [14]. In questo lavoro abbiamo individuato tre miRNA up regolati

ID MIRNA	LIVELLO DI REGOLAZIONE	PATHWAY
bta-miR-7	Down regolato	PI3K-Akt, MAPK, Chemokine
bta-miR-141	Down regolato	PI3K-Akt, MAPK, Chemokine
bta-miR-660	Down regolato	PI3K-Akt
bta-miR-335	Down regolato	PI3K-Akt, MAPK, Chemokine
bta-let-7a	Down regolato	PI3K-Akt, MAPK, Chemokine
bta-miR-93	Up regolato	PI3K-Akt, MAPK, Chemokine
bta-miR-139	Up regolato	PI3K-Akt
bta-miR-1248	Up regolato	PI3K-Akt, MAPK, Chemokine

Tab. 3 *Elenco dei miRNA differenzialmente espressi e dei principali pathway in cui sono coinvolti.*

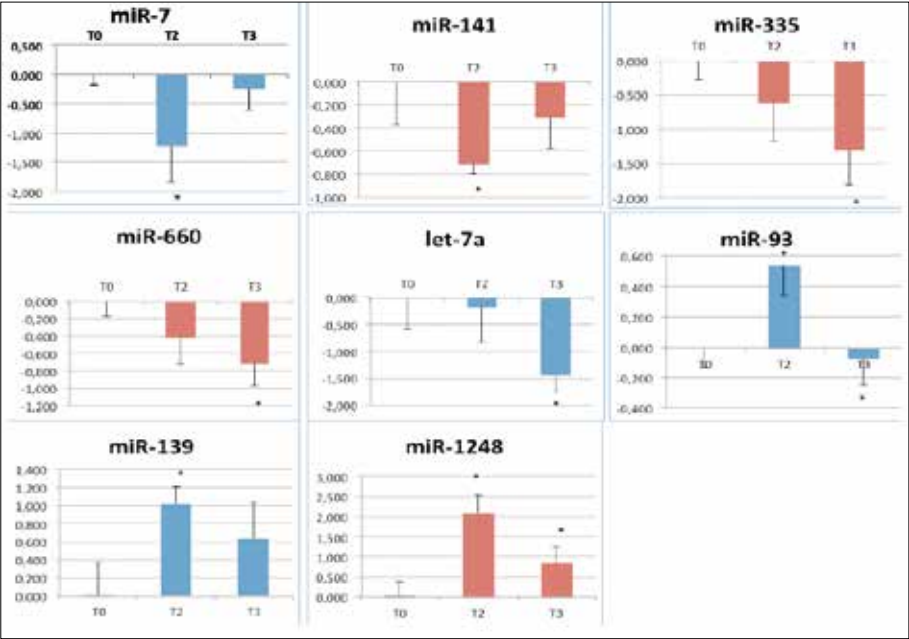


Fig. 2 *Livelli di espressione dei microRNA analizzati con qPCR. In grafico i livelli di espressione dei miRNA analizzati con Human miRNome Panel (Exiqon). L'asterisco indica che la differenza è statisticamente significativa con valori di $p < 0,05$ a eccezione del miR-1248 in cui $p < 0,001$.*

al T2 ($p < 0,05$). In particolare l'aumento di espressione di miR-93 è coerente con altri dati di letteratura in cui è stato dimostrato come questo microRNA sia legato a meccanismi di regolazione della proliferazione cellulare in uomo e topo [22,23]. Esperimenti di RNA sequencing hanno dimostrato che miR-139 è espresso nelle cellule T citotossiche CD8+ e ha un ruolo nell'inibizione

della produzione di perforine[24], inoltre può svolgere sia il ruolo di oncosoppressore che di oncomir in base al tipo di tumore analizzato, regolando quindi in modo diverso i pathway di proliferazione in base al tipo cellulare in cui è espresso[25]. Panganiban e collaboratori, attraverso esperimenti di miRNA mimic e trasfezione in PBMC di soggetti asmatici, hanno dimostrato la capacità di miR-1248 di regolare positivamente l'espressione dell'IL-5, un importante mediatore della risposta Th2 e strettamente legata alla sopravvivenza dei granulociti eosinofili [26]. Altri studi hanno invece indicato che questo miRNA funge da regolatore negativo di altre interleuchine quali IL-6 e IL-8 [27].

Tra i miRNA downregolati miR-7 e miR-141 sono significativamente meno espressi rispetto ai controlli al T2 ($p < 0,05$) per poi tornare a valori simili al controllo. miR-335, miR-660 e miR-let-7a mostrano una tendenza alla diminuzione dell'espressione al T2 che diventa statisticamente significativa al T3. I livelli di espressione di miR-335 sono paragonabili a quelli riscontrati in letteratura, in cui questo miRNA è downregolato in risposta a infezioni di tipo virale [23]. miR-7 è legato invece ai meccanismi di proliferazione cellulare avendo come bersaglio il pathway delle MAPK e in particolare il recettore EGFR [28,29]. Dalle nostre analisi si evince che miR-7 è downregolato al T2 ($p < 0,05$) potendo quindi essere correlato a un aumento della proliferazione cellulare. Anche miR-141 è down regolato 24h dopo la somministrazione del vaccino e anche in questo caso numerosi studi hanno dimostrato un coinvolgimento di questo miRNA nella regolazione del pathway delle MAPK e di altre vie di segnalazione come il pathway PI3K-Akt [30,31,32]. Inoltre esperimenti in vitro hanno dimostrato che l'espressione di questo microRNA sopprime le capacità proliferative di linee cellulari di osteosarcoma attraverso l'inibizione della proteina chinasi AKT in modo AUF-1 dipendente [33]. Il profilo di espressione dei microRNA in risposta alle infezioni batteriche che causano la mastite nei bovini è stato analizzato nelle cellule epiteliali mammarie ed è stata osservata una risposta di tipo specifico in base al tipo di agente patogeno interessato. Ad esempio è stato osservato che mir-let-7a (che nel nostro studio è downregolato al T3) è espresso unicamente in risposta all'infezione da E.coli ma non in quella da S.Uberis il che indica una specificità della risposta cellulare in funzione del tipo di agente infettante [34]. È stato dimostrato che questo miRNA è coinvolto nella regolazione di diversi pathway legati al sistema immunitario come ad esempio la via di segnalazione del BCR e del TCR, la via di segnalazione delle chemochine e la fagocitosi mediata da recettore [34].

I microRNA differenzialmente espressi sono stati inseriti nel database di DIANA, un sito web per l'identificazione dei potenziali target dei microRNA.

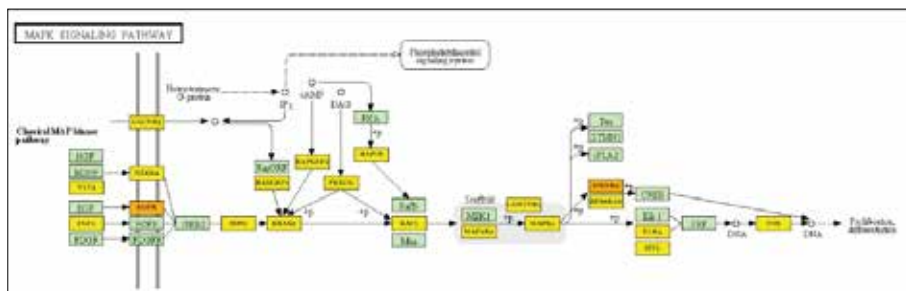


Fig. 3 Parte del pathway di segnalazione delle MAPK correlato ai microRNA d'interesse. In giallo i geni regolati da un solo miRNA, in arancione i geni target di due o più microRNA, in verde i geni che non sono bersaglio di alcun miRNA del nostro studio. La figura è tratta dal database KEGG.

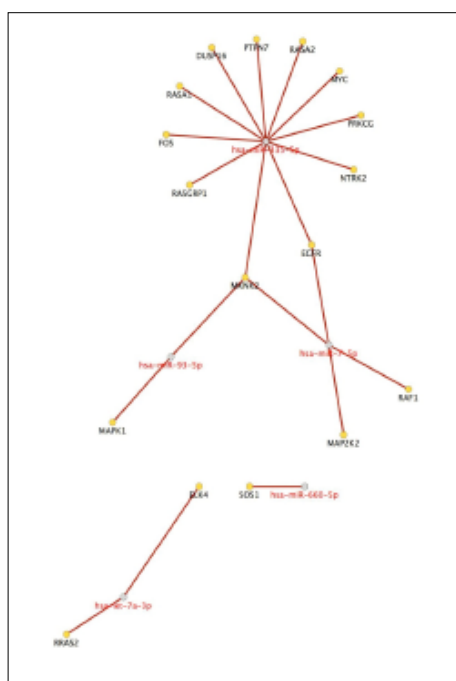


Fig. 4 Network Cytoscape. In giallo i geni regolati dai miRNA, le linee rosse rappresentano le interazioni fra miRNA e geni target coinvolti nella cascata di attivazione del fattore trascrizionale FOS.

L'analisi è stata fatta attraverso due applicazioni: Tarbase v7 che contiene i dati di tutte le interazioni miRNA- target validate sperimentalmente e microT-CDS che permette, attraverso un apposito algoritmo, di individuare i potenziali geni target di un determinato miRNA. I pathway coinvolti in questo processo sono stati identificati utilizzando un'altra applicazione del sito web Diana chiamata mirPath. Il pathway maggiormente colpito dai miRNA di nostro interesse

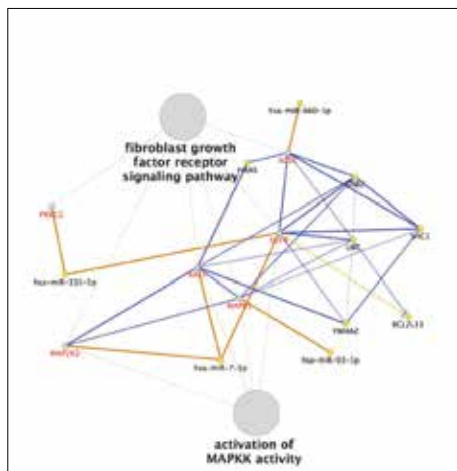


Fig. 5 *enriched network con i geni del pathway del TGFB, le interazioni tra i geni e i miRNAs signiificativi sono state costruite utilizzando Cytoscape e il plugin ClueGO*

è quello delle MAPK che porta all'attivazione del fattore trascrizionale FOS, coinvolto nell'attivazione dei meccanismi di proliferazione e differenziamento delle cellule del sistema immunitario, e questa è proprio il tipo di risposta che si osserva nelle prime fasi della risposta all'infezione da BVDV (fig. 3). Per identificare meglio le relazioni fra microRNA e geni target è stata eseguita un'analisi con il software Cytoscape che ha permesso di visualizzare le interazioni fra i geni della cascata delle MAPK e i miRNA differenzialmente espressi (fig. 4).

I risultati di questo lavoro hanno permesso di identificare alcuni miRNAs come potenziali biomarcatori delle fasi precoci dell'infezione. Per un loro potenziale futuro utilizzo in ambito commerciale e veterinario sarà necessario validare i dati ottenuti su un numero più ampio di campioni ed eventualmente in uno studio di campo. Questo potrebbe consentirci di individuare ulteriori miRNA che potrebbero avere un ruolo chiave nella risposta immunitaria nelle fasi precoci dell'infezione da BVDV.

BIBLIOGRAFIA

1. PETERHANS E., JUNGI T.W., SCHWEIZER M. (2003): *BVDV and Innate Immunity*, «Biologicals», 31, pp. 107-111.
2. McCLURKIN A.W., CORIA M.F., BOLIN S.R. (1985): *Isolation of cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea*, «J. Am. Vet. Med. Assoc.», 186, pp. 568-569.
3. BALINT A., BAULE C., PALFI V., BELAK S. (2005): *Retrospective genome analysis of a live vaccine strain of bovine viral diarrhea virus*, «Vet. Res.», 36, pp. 89-99.
4. BAKER J.C. (1995): *The clinical manifestations of bovine viral diarrhea virus infection*, «Vet Clin North Am», 11, pp. 425-445.

5. SWASDIPAN S., MCGOWAN M., PHILLIPS N., AND. BIELEFELDT-OHMANN H. (2002): *Pathogenesis of transplacental virus infection: pestivirus replication in the placenta and fetus following respiratory infection*, «Microb. Pathog.», 32, pp. 49-60.
6. MULLER-DOBLIES D., ARQUINT A., SCHALLER P., HEEGAARD M.H., HILBE M., ALBINI S., ABRIL C., TOBLER K., EHRENSPERGER F., PETERHANS E., ACKERMANN M., METZLER A. (2004): *Innate Immune Responses of Calves during Transient Infection with a Noncytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus*, «Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology», Mar., pp. 302-312.
7. GLEW E.J., CARR B.V., BRACKENBURY L.S., HOPE J.C., CHARLESTON B. AND HOWARD C.J. (2003): *Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells*, «Journal of General Virology», 84, pp. 1771-1780.
8. BANCHEREAU J., BRIERE F., CAUX C., DAVOUST J., LEBECQUE S., LIU Y.J., PULENDRAN B., PALUCKA K. (2000): *Immunobiology of dendritic cells*, «Annu Rev Immunol.», 18, pp. 767-811.
9. KELLING C.L., TOPLIFF C.L. (2013): *Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhoea virus infections*, «Biologicals», 41, 20e25.
10. LEE S.-R., NANDURI B., PHARR G.T., STOKES J.V., PINCHUK L.M. (2009): *Bovine viral diarrhoea virus infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes*, «Biochim Biophys Acta», 1794:14e22.
11. CHASE C.C.L. (2013): *The impact of BVDV infection on adaptive immunity*, «Biologicals», 41 52e60.
12. COLLEN T., MORRISON W.I. (2000): *CD4+ T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle*, «Virus Res», 67:67e80.
13. LAMBOT M., DOUART A., JORIS E., LETESSON J.J., PASTORET P.P. (1997): *Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus*, «J Gen Virol», 78, 1041e7.
14. LAWLESS N., VEGH P., O'FARRELY C. AND LYNN D.J. (2014): *The role of microRNAs in bovine infection and immunity*, «Frontiers in Immunology», November, Volume 5, Article 611.
15. XIAO C., RAJEWSKY K. (2009): *MicroRNA control in the immune system: basic principles*, «Cell», 136, 26-36.doi:10.1016/j.cell.12.027.
16. SUNG T.L., RICE A.P. (2009): *miR-198 inhibits HIV-1 gene expression and replication in Monocytes and its mechanism of action appears to involve repression of cyclin T1*, «PLoSPathog», 5.
17. LAWLESS N., FOROUSHANI A.B., MCCABE M.S., O'FARRELY C., LYNN D.J. (2013): *Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a Gram positive bacterial infection*, «PLoSOne», 8, e57543.
18. BAUERMANN F.V., FLORES E.F., RIDPATH J.F. (2012): *Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: Possible impacts on diagnosis and control*, «J VET Diagn Invest», 24, p. 253.
19. HUSSEN J., DÜVEL A., SANDRA O., SMITH D., SHELDON I.M., ZIEGER P., SCHUBERTH H.J. (2013): *Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes*, «PLoS One», Aug 14; 8(8):e71502.
20. KRYCHTIUK K.A., KASTL S.P., PFAFFENBERGER S., PONGRATZ T., HOFBAUER S.L., WONNERTH A., KATSAROS K.M., GOLIASCH G., GASPAR L., HUBER K., MAURER G., DOSTAL E., ORAVEC S., WOJTA J., SPEIDL W.S. (2014): *Small high-density lipoprotein is associated with monocyte subsets in stable coronary artery disease*, «Atherosclerosis», Dec., 237 (2), pp. 589-96.

21. SMYTH L.A., BOARDMAN D.A., TUNG S.L., LECHLER R., LOMBARDI G. (2015): *MiRNAs affect dendritic cell function and phenotype*, «Immunology», Feb; 144 (2), pp. 197-205.
22. FANG L., DU W.W., YANG W., RUTNAM Z.J., PENG C., LI H., O'MALLEY Y.Q. (2012): *MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2*, «Cell Cycle», 11, 23, December 1, pp. 4352-4365.
23. YEUNG M.L., YASUNAGA J., BENNASSER Y., DUSETTI N., HARRIS D., AHMAD N., MATSUOKA M., JEANG K.T. (2008): *Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and TP53INP1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by HTLV-1*, «Cancer Res.», November 1, 68 (21), pp. 8976-8985.
24. TRIFARIA S., PIPKINA M.E., BANDUKWALAA H.S., ÅIJÖA T., BASSEINA J., CHENA R., MARTINEZA G.J., RAOA A. (2013): *MicroRNA-directed program of cytotoxic CD8+ T-cell differentiation*, 18608-18613 PNAS November 12, vol. 110, no. 46.
25. KRISHNAN K., STEPTOE A.L., MARTIN H.C., PATTABIRAMAN R.D., NONES K., WADDELL N., MARIASEGARAM M., SIMPSON P.T., LAKHAN S.R., VLASSOV A., GRIMMOND S.M., CLOONAN N. (2015): *miR-139-5p is a regulator of metastatic pathways in breast cancer*, «RNA», 19, pp. 1767-1780.
26. PANGANIBAN R.P.L., PINKERTON M.H., SAUMYA Y.M., JEFFERSON S.J., ROFF A.N., ISHMAEL F.T. (2012): *Differential microRNA expression in asthma and the role of miR-1248 in regulation of IL-5*, «Am J Clin Exp Immunol»; 1 (2), pp. 154-165.
27. HOOTEN N.N., FITZPATRICK M., WOOD W.H., DE S., EJIUGU N., ZHANG Y., MATTISON J.A., BECKER K.G., ZONDERMAN A.B., EVANS M.K. (2013): *Age-related changes in microRNA levels in serum*, AGING, October, Vol. 5 N 10.
28. HUYNH F.C., JONES F.E.: *MicroRNA-7 Inhibits Multiple Oncogenic Pathways to Suppress HER2D16 Mediated Breast Tumorigenesis and Reverse Trastuzumab Resistance*, «PLOS ONE», 9 (12), e114419.
29. LIU H., HUANG J., PENG J., WU X., ZHANG Y., ZHU, GUO W.L. (2015): *Upregulation of the inwardly rectifying potassium channel Kir2.1 (KCNJ2) modulates multidrug resistance of small-cell lung cancer under the regulation of miR-7 and the Ras/MAPK pathway*, «Molecular Cancer», 14, 59.
30. QI X., XU W., HE X., GUO M., DWEED H., CHENG W.H., LUO Y., XIA K., GRETZ N., HUANG K. (2014): *MicroRNA profiling of rats with ochratoxin A nephrotoxicity*, BMC Genomics, 15, p. 333.
31. LV J., XIA K., XU P., SUN E., MA J., GAO S., ZHOU Q., ZHANG M., WANG F., CHEN F., ZHOU P., FU Z., XIE H. (2014): *miRNA expression patterns in chemoresistant breast cancer tissues*, «Biomed Pharmacother», Oct., 68 (8), pp. 935-42.
32. ZHANG L., DENG T., LI X., LIU H., ZHOU H., MA J., WU M., ZHOU M., SHEN S., LI X., NIU Z., ZHANG W., SHI L., XIANG B., LU J., WANG L., LI D., TANG H., LI G. (2010): *microRNA-141 is involved in a nasopharyngeal carcinoma-related genes network*, «Carcinogenesis», Apr., 31 (4), pp. 559-66.
33. AL-KHALAF H.H., ABOUSSEKHRA A. (2014): *MicroRNA-141 and microRNA-146b-5p inhibit the prometastatic mesenchymal characteristics through the RNA-binding protein AUF1 targeting the transcription factor ZEB1 and the protein kinase AKT*, «J Biol Chem.», Nov 7, 289 (45), pp. 31433-47.
34. JIN W., IBEAGHA-AWEMU E.M., LIANG G., BEAUDOIN F., ZHAO X. AND GUAN L.L. (2014): *Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with Escherichia coli or Staphylococcus aureus bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles*, «BMC Genomics», 15, p. 181.

AREA DI STUDIO: MASTITI

Introduzione

La mastite è una tra le malattie con più alta incidenza e perdita economica, sia diretta che indiretta, nelle stalle italiane. Le cause della malattia sono molteplici e il decorso dipende da una serie di fattori in gran parte debellati e riconoscibile. A ogni modo, negli ultimi anni, è nota una certa componente genetica di resistenza alla malattia (Barillet et al., 2001; Rupp and Boichard, 2003). Infatti, negli ultimi c.a. 10 anni, la mastite è stata inserita nella maggior parte degli indici di selezione nazionali e internazionali. Fino a poco tempo dopo il progetto SELMOL, il tipo di indici genetici della valutazione genetica di questo carattere si basava su modelli “tradizionali” (e.g. test day model in Frisone Italiana, ad esempio), utilizzando come fenotipo i dati di SCC (Somatic Cell Count), rilevati nei campioni di latte durante il controllo funzionale. I progetti SELMOL e PROZOO hanno permesso, per la prima volta, di entrare nella cosiddetta “scatola nera” di questo carattere. Non solo, anche grazie a questo progetto, oggi questo tipo di valutazione è di tipo “genomico”, ovvero, utilizza le informazioni del genoma per ottenere un indice genetico più accurato in un minor tempo.

La collaborazione dei progetti SELMOL e PROZOO nello studio dei caratteri relativi alla mastite ha permesso di studiare non solo la malattia in se, ma anche la correlazione e interazione della mastite con i caratteri funzionali (Minozzi et al., 2011). Basandosi sui risultati ottenuti, l'obiettivo di questa UO relativa alla mastite nel progetto INNOVAGEN è stato quello di A) validare i risultati ottenuti nel progetto SELMOL/PROZOO; B) migliorare la definizione dei segnali noti (grazie all'utilizzo di genotipi ad alta densità; Illumina BovineHD BeadChip); C) se possibile, trovare nuove regioni coinvolte con la resistenza alla mastite, e D) spiegare dal punto di vista biologico i ritrovamenti.

È importante sottolineare che questa ricerca è stata svolta in stretta collaborazione con l'U.O. Latte Bovino (UNICATT) e l'U.O. Gestione rapporti con le ANA (CRSA).

Materiali e metodi

La descrizione delle attività di genotipizzazione e raccolta di dati fenotipici da parte delle ANA, è descritta nelle UO Latte Bovino e Gestione rapporti con le

ANA. In totale, c.a. 1000 tori di Frisone Italiana genotipizzati con l'Illumina BovineHD Beadchip (c.a. 777.000 SNPs) e i relativi indici genetici ufficiali per SCS (Somatic Cell Score) sono stati resi disponibili a questa UO. La presenza di un maggior numero di marcatori aumenta la capacità di individuare regioni specifiche coinvolte nell'espressione del carattere, e permette anche di applicare metodologie alternative alla classica GWAS.

Per rispondere agli obiettivi prefissati, si è seguita una tripla strategia:

- a. una validazione "semplice" utilizzando 1000 individui genotipizzati in alta densità, per trovare picchi corrispondenti a quelli trovati con il chip a minore densità (Illumina BovineSNP50 BeadChip, utilizzato per i progetti SELMOL e PROZOO). Il modello utilizzato è stato quello lineare, del tutto simile a quello utilizzato precedentemente.
- b. una "auto-validazione" (e.g. una nuova GWAS) utilizzando tutti i dati a disposizione: SLEMOL+PROZOO+INNOVAGEN. In questo caso, è necessario uno step intermedio di imputazione (per ottenere le informazioni mancanti dalle informazioni di Linkage Disequilibrium). L'imputazione è stata eseguita dall'UO Latte Bovino, usando il software Beagle v.3. Il numero finale di individui utilizzati per questo lavoro, è stato di 2752 individui genotipizzati e con fenotipi disponibili.
- c. un approccio innovativo, sviluppato nell'ambito del progetto INNOVAGEN e chiamato MUGBAS (Capomaccio et al., 2015). Questo tipo di approccio permetterà di partire dal punto di vista opposto dalla classica associazione genotipo-fenotipo. Di fatto, in questo approccio si integrano le informazioni di annotazione genica nelle analisi.

Risultati e discussione

La prima operazione eseguita sui dati è stata un'accurata pulizia dei dati genetici. A tal proposito le soglie utilizzate sono state: assenza di individui repliche, numero di genotipi mancanti per individuo minore al 10%, assenza di marcatori non mappati o nei cromosomi sessuali, numero di genotipi mancanti per marcatore maggiore al 95%, frequenza dell'allele minore maggiore al 1%.

Il modello utilizzato (semplificato): è stato: $EBV(scs) = media + parentela + genotipo + errore$.

La presenza dell'introduzione della parentela nel modello è stata necessaria per correggere l'elevata struttura di popolazione presente nel campione, come evidenziato dai QQ-plot in fig.6.

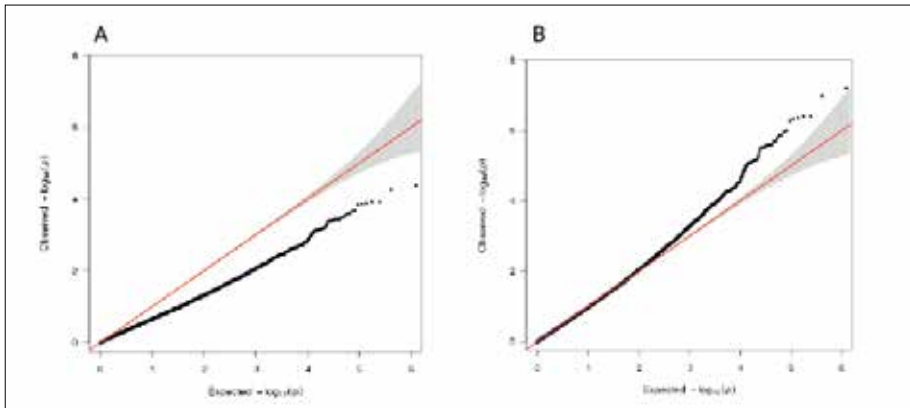


Fig. 6 QQ-Plot della distribuzione dei segnali (Attesi sull'asse X, Osservati sull'asse Y), prima della correzione di parentela (A) e dopo (B)

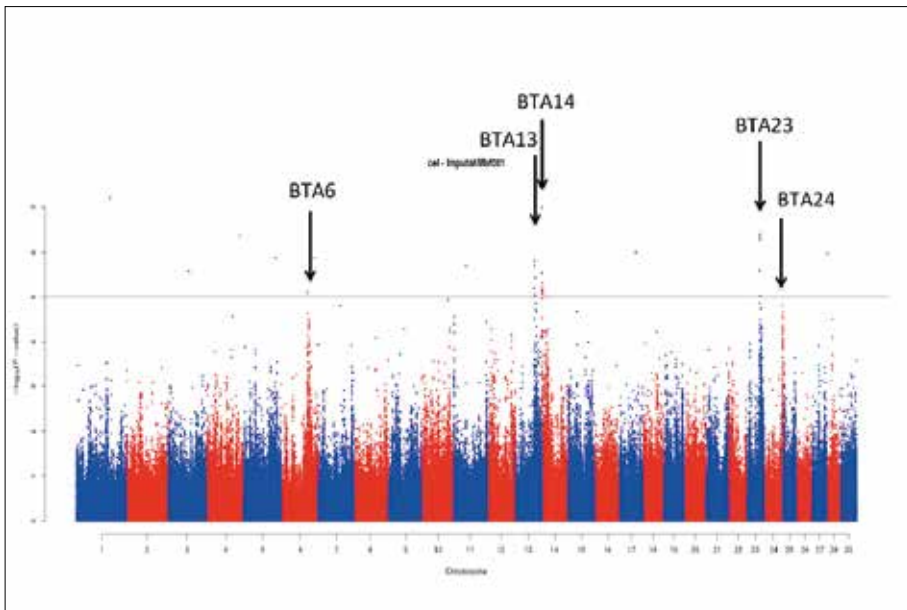


Fig. 7 Manhattan plot della GWAS su SCS utilizzando c.a. 3000 campioni genotipizzati (imputati) ad alta densità

La validazione “semplice” non ha prodotto nessun riscontro in comune tra i due dataset. La spiegazione di questi risultati può essere triplice. In primo luogo, il progetto SELMOL e PROZOO avevano individuato dei picchi di significatività deboli. In aggiunta, il numero di individui utilizzati nella vali-

SNP	CHROM.	POSITION	A1	A2	N	EFFETTO	PROB.
BovineHD1400000262	14	1967325	G	A	2752	4.826e-01	1.021e-07
BovineHD2300011772	23	40795364	A	G	2752	4.158e-01	3.971e-07
BovineHD0600030044	6	106890956	A	G	2752	-7.040e-01	1.354e-06
BovineHD1300017482	13	60968974	G	A	2752	-4.197e-01	1.613e-06
BovineHD2400017743	24	61209926	A	G	2752	-3.420e-01	1.559e-05

Tab. 4 *Informazione sui marcatori piu significativi in figura 7*

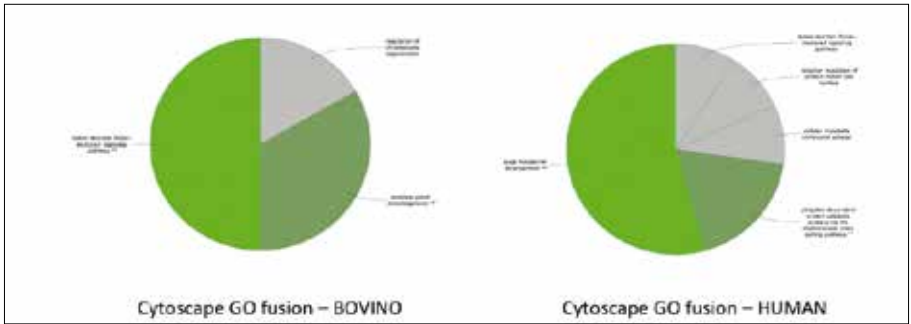


Fig. 8 *Pathway analysis usando Gene Ontology (GO) su bovino e umano*

dazione è meno della metà degli individui utilizzati in SELMOL e PROZOO. Infine, il numero di variabili indipendenti (e.g. SNP) utilizzate nel modello di validazione è piu di 15 volte più elevato del primo modello, riducendo di molto la potenza statistica del modello (il cosiddetto problema di $p \gg n$).

Queste ipotesi sono supportate dai risultati ottenuti con l’approccio di “auto-validazione”. Utilizzando lo stesso modello, ma triplicando il numero di individui, una serie di segnali fino a ora non osservati nelle popolazioni italiane sono stati ottenuti (fig. 7). Almeno 5 punti di interesse, supportati dal punto di vista statistico dalla distribuzione di significatività nei marcatori circostanti (e.g. in linkage-disequilibrium) sono stati trovati e utilizzati per una ricerca successiva. I 5 segnali corrispondono a segnali nel cromosoma 6, 13,14,23 e 24 (tab. 4).

Una volta individuati i picchi, è stata effettuata un’analisi di pathway per studiare la biologia dei segnali coinvolti. Il software utilizzato è stato Cytoscape, e sono state utilizzate le gene ontologie (GO) del bovino e dell’umano. Le ontologie in umana sono state esplorate perché il numero di geni annotati nel genoma bovino è molto minore rispetto a quello umano. Infatti, come evidenziato in figura 8, mentre nel genoma bovino solo 3 pathway (e poco collegati con la produzione di cellule somatiche) sono stati ritrovati. Passando all’annotazione del genoma umano, sono stati trovati una serie di pathway

interessanti che riguardano: il sistema nervoso, i meccanismi di regolazione cellulare e il metabolismo.

Per quanto riguarda l'approccio MUGBAS, 99 geni sono risultati significativi a una soglia GeneWise di 1×10^{-04} , 53 dei quali risultano attorno al gene maggiore noto DGAT1 (Grisart et al., 2002). Siccome la varianza spiegata da questo gene nei caratteri di produzione raggiunge oltre il 30%, esiste una possibile ridondanza del segnale attorno a questo gene. Per quanto riguarda gli altri segnali, sono stati trovate significatività attorno ai cromosomi 6,13,14,15,19,22,23,24,27. Da notare che tutti e 5 segnali trovati nella seconda analisi sono ritrovati anche su questa analisi. In particolare, le significatività interessano: il cluster delle caseine (BTA6), l'ormone della crescita GHRH (BTA13), DGAT1 (BTA14), il gene Apoptosis-related cysteine peptidase (CASP4; BTA15), e altri ancora.

BIBLIOGRAFIA

- BARILLET F., RUPP R., MIGNON-GRASTEAU S., ASTRUC J.M., AND JACQUIN M.: *Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep*, «Genet. Sel. Evol.», 33, pp. 397-415. doi:10.1051/gse:2001124.
- CAPOMACCIO S., MILANESI M., BOMBA L., VAJANA E., AND AJMONE-MARSAN P. (2015): *MUGBAS: a species free gene-based programme suite for post-GWAS analysis*, «Bioinformatics», 31, pp. 2380-1. doi:10.1093/bioinformatics/btv144.
- GRISART B., COPPIETERS W., FARNIR F., KARIM L., FORD C., BERZI P., CAMBISANO N., MNI M., REID S., SIMON P., SPELMAN R., GEORGES M., AND SNELL R. (2002): *Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition*, «Genome Res.», 12, pp. 222-231. doi:10.1101/gr.224202.
- MINOZZI G., NICOLAZZI E.L., STROZZI F., STELLA A., NEGRINI R., AJMONE-MARSAN P., AND WILLIAMS J.L. (2011): *Genome wide scan for somatic cell counts in holstein bulls*, «BMC Proc.», 5, Suppl 4, S17. doi:10.1186/1753-6561-5-S4-S17.
- RUPP R. AND BOICHARD D.: *Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle*, «Vet. Res.», 34, pp. 671-88. doi:10.1051/vetres:2003020.

La rintracciabilità quale strumento per la salvaguardia delle produzioni animali di qualità e per la sostenibilità del sistema zootecnico italiano

Responsabile Scientifico:
Donato Matassino *ConSDABI*

Università con cui l'U.O. ConSDABI ha collaborato:

- prof. Luca Fontanesi del Dipartimento DIPROVAL dell'Alma Mater Studiorum dell'Università di Bologna relativamente alla attività di cui al WP1;
- prof. Aldo Di Luccia del Dipartimento SAFE dell'Università degli Studi di Foggia relativamente alle attività di cui ai WP2 e del WP3.

ORGANIZZAZIONE E OBIETTIVO DELLA RICERCA

L'U.O. ConSDABI ha sviluppato un piano interessante le seguenti specie:

- bovina
- bufalina
- caprina
- ovina
- suina

al fine di identificare marcatori '*genetici*' e '*proteici*' da impiegare per la messa a punto di modelli che ben rispondono alla necessità di aumentare la credibilità del sistema produttivo nazionale e la sostenibilità salustistica di prodotti di origine animale (latte, carne e loro derivati) '*Made in Italy*'.

Tale attività si articola in tre Work Packages (WP):

- WP1 - Utilizzazione di marcatori molecolari di natura *genetica* per l'autenticazione di *prodotti monorazza* di origine animale (in collaborazione con il prof. L. Fontanesi);
- WP2 - Utilizzazione di marcatori molecolari *proteici* per la rintracciabilità

della *freschezza* o *età* di un latte e dei prodotti da esso derivati (in collaborazione con il prof. A. Di Luccia);

- WP3 - Individuazione e caratterizzazione di marcatori molecolari *proteici* specie specifici (razza specifici?) per la rintracciabilità di carne e derivati (in collaborazione con il prof. A. Di Luccia).

WPI - UTILIZZAZIONE DI MARCATORI MOLECOLARI DI NATURA GENETICA PER L'AUTENTICAZIONE DI PRODOTTI MONORAZZA DI ORIGINE ANIMALE

Specie bovina

Materiale e metodi

La ricerca ha interessato:

- 1.1 analisi del polimorfismo nel *'gene'* MITF (*microphthalmia-associated transcription factor* – fattore di trascrizione associato alla microftalmia) e nel *'gene'* KIT (*Mast/stem cell growth factor receptor precursor* – precursore del recettore del fattore di crescita delle cellule mast/stem), entrambi coinvolti nel determinismo della pigmentazione del mantello;
- 1.2 elaborazione e validazione dei dati SNP50K per migliorare i protocolli di autenticazione del Parmigiano Reggiano.

Relativamente al **p.to 1.1.**, è stata eseguita l'analisi di SNP nei geni candidati (KIT e MITF) per la pezzatura in bovini da latte allo scopo di mettere a punto protocolli di autenticazione idonei a distinguere prodotti lattiero-caseari ottenuti da razze *'pezzate'* da quelli ottenuti da razze *'non pezzate'*.

'Gene MITF': su un campione di 40 soggetti appartenenti a 4 diverse razze (10 di Frisona e 10 di Pezzata Rossa, *pezzate*; 10 di Bruna e 10 di Reggiana, *non pezzate*) è stato condotto il sequenziamento di un segmento di DNA complessivamente costituito da 7.258 bp, comprendente regioni *'codificanti'* (1.668 bp) e regioni *'intriniche'* (5.590 bp); tale sequenziamento ha permesso di identificare 17 SNPs (distribuiti in 21 aplotipi), di cui solo 2 presenti nella *'regione codificante'* (in media 1 SNP ogni 834 bp) e 15 presenti nella *'regione non codificante'* (in media 1 SNP ogni 373 bp). Mediante *PCR-RFLP*, il DNA dei suddetti soggetti è stato genotipizzato per due di questi 17 SNPs identificati:

1. (g.32386957A>T) dell'introne 1
2. (g.32387099A>G) dell'esone 1

Relativamente allo SNP (**g.32386957A>T**), la frequenza degli alleli A e T è risultata differente fra gli animali *'pezzati'* (A = 0,875; T = 0,125) e quelli *'non pezzati'* (A = 0,125; T = 0,875) ($P = 8,2E-12$) (pubblicazione 1). Questo

risultato è stato confermato anche in un campione più numeroso; infatti, sono state genotipizzate mediante PCR-RFLP ulteriori 9 razze per un totale di 856 soggetti così ripartiti:

- 59 di Bruna;
- 58 di Chianina;
- 58 di Frisona;
- 61 di Jersey;
- 58 di Marchigiana;
- 47 di Maremmana;
- 55 di Modenese;
- 76 di Pezzata Rossa;
- 64 di Piemontese;
- 67 di Podolica;
- 55 di Rendena;
- 128 di Reggiana;
- 68 di Romagnola.

Risultati

I risultati ottenuti:

(a) permettono di confermare ancora l'associazione tra questo '*marcatore*' e la pezzatura nei bovini, essendo gli alleli A e T diversamente frequenti nei due gruppi di bovini presi in esame ('*pezzati*' e '*non pezzati*');

(b) escludono la possibilità di applicare questo unico SNP nella definizione di protocolli di autenticazione di prodotti lattiero-caseari dal momento che tale SNP non presenta alleli '*privati*' o '*esclusivi*' o '*discriminanti*' nel confronto tra animali '*pezzati*' e '*non pezzati*'; infatti, i due alleli si ritrovano sia in soggetti '*pezzati*' che in quelli '*non pezzati*' sebbene con una diversa frequenza nei due gruppi.

Per esplorare ulteriormente il possibile utilizzo pratico di marcatori nel gene MITF per la tracciabilità di razza nei bovini, gli stessi animali sono stati genotipizzati mediante PCR-RFLP al secondo SNP (g.32387099A>G); trattasi di una mutazione *missense* che almeno dalla letteratura consultata non è responsabile di alterazioni funzionali della proteina.

Anche per questo polimorfismo si confermano, in generale, i risultati relativi al primo polimorfismo.

Materiale e metodi

'**Gene KIT**': il sequenziamento di un segmento di DNA complessivamente costituito da 4.850 bp, comprendente 21 regioni '*codificanti*' e regioni '*intro-*

niche' condotto su un campione di 48 soggetti appartenenti a 3 diverse razze (Angus, Hereford e Holstein) ha permesso di identificare 103 SNPs (Fontanesi et al., 2011).

Mediante *PCR-RFLP*, il DNA dei predetti 856 soggetti appartenenti a 13 razze è stato genotipizzato per due di questi 103 SNPs identificati:

- 1.(g.72779776C>T) dell'esone 2
- 2.(g.72783182A>G) dell'esone 3

È stata effettuata l'elaborazione combinata dei predetti 4 SNP (2 nel gene MITF + 2 nel gene KIT) per valutare la '*potenzialità del genotipo globale*' nell'attribuire gli animali ai due gruppi (bovini '*pezzati*' e '*non pezzati*'), nell'ottica di mettere a punto idonei protocolli di autenticazione di prodotti lattiero-caseari.

Risultati

La corretta attribuzione ai due gruppi (bovini '*pezzati*' e '*non pezzati*') va dal 98 al 100%.

Materiale e metodi

La sperimentazione di cui al **p.to 1.2.** ha interessato l'analisi dei dati di genotipizzazione ottenuti con il pannello BovineSNP50 BeadChip nell'ambito del precedente progetto Selmol.

Le razze coinvolte in questo studio sono:

- Frisona (N=2.093) (dati Selmol);
- Bruna (N=749) (dati Selmol);
- Pezzata Rossa (N=479) (dati Selmol);
- Marchigiana (N=410);
- Piemontese (dati Selmol), dati scartati per problemi legati alla corrispondenza degli SNP nei file ricevuti;
- Cinisara (N=68) (dati messi a disposizione dall'Università di Palermo);
- Modicana (N=72) (dati messi a disposizione dall'Università di Palermo).

Preliminarmente, è stata condotta la valutazione della qualità dei dati ovvero sono state definite le frequenze alleliche di tutti gli SNPs del pannello e sono stati identificati gli alleli fissati nelle varie razze.

In particolare, è stata condotta:

- analisi di PCA (*Principal component analysis*) utilizzando solo i dati delle razze Frisona, Bruna, Pezzata Rossa e Marchigiana e gli SNP di ciascun cromosoma autosomico;
- analisi di PCA su tutte le razze coinvolte con scelta degli SNP più informativi;
- identificazione degli SNP fissati o con MAF >0,3 nei confronti a due tra

le razze aventi dataset con un elevato numero di animali con da (Frisona, Bruna, Pezzata Rossa e Marchigiana); selezione degli SNP più informativi per singolo cromosoma e analisi PCA.

Risultati

I dati ottenuti in entrambi gli approcci hanno permesso di identificare un pannello di circa 300 SNP il quale permette di discriminare tutte le razze considerate nello studio (abstract n. 1).

Inoltre, è stato messo a punto un metodo per l'attribuzione di un bovino a una razza utilizzando un approccio combinato di PCA e Random Forest (RF). Questo metodo è basato sulla preselezione di 20 SNP per cromosoma sulla base delle prime 2 PCA. Poi, su questi SNP è stato implementato l'approccio di RF.

L'utilizzo di 96 o 48 SNP (tra i migliori selezionati da PCA) permette la corretta attribuzione nel 100% dei casi. Il tutto è stato validato separando la training dalla test population (pubblicazione 2).

Specie suina

Materiale e metodi

La sperimentazione, finalizzata all'identificazione di marcatori utilizzabili per la tracciabilità di razza, ha interessato:

- 1.3 l'analisi dei dati del PorcineSNP60 BeadChip;
- 1.4 lo studio del polimorfismo a *loci* sede di segmenti di DNA o *geni* candidati indicatori della domesticazione [MC1R (*melanocortin 1 receptor* – recettore 1 della melanocortina) associato al colore del mantello e NR6A1 (*Nuclear Receptor Subfamily 6, Group A, Member 1* – recettore nucleare sottofamiglia 6, gruppo A, membro 1) associato al numero di vertebre).

Relativamente al **p.to 1.3** è stato preso in considerazione il pannello SNP60K dell'Illumina messo a disposizione dalla subunità di ricerca UNI-BO (Large White Italiana, N=2000; Apulo Calabrese, N=96; Nero Siciliano, N=48), e si è proceduto con l'ampliamento delle analisi di genotipizzazione includendo un campione di soggetti così ripartito per tipo genetico:

- a. Duroc Italiana (N=48);
- b. Landrace Italiana (N=48);
- c. Cinta Senese (N=36);
- d. Casertana (N=96).

Questi dati sono stati analizzati per l'identificazione di possibili marcatori fissati nella razza, partendo dagli SNP monomorfici.

Risultati

Una preliminare elaborazione effettuata mediante analisi PCA ha permesso di identificare marcatori in grado di discriminare le razze considerate (abstract n. 2).

Successivamente è stata adottata l'analisi combinata PCA e RF precedentemente sviluppata nei bovini la quale ha permesso di assegnare con il 100% di accuratezza tutti i soggetti alla razza corrispondente (abstract n. 4).

Materiale e metodi

Relativamente al **p.to 1.4** si è proceduto a genotipizzare con la metodica PCR-RFLP

- razze locali italiane (Cinta Senese, Nero Siciliano, Apulo-Calabrese, Casertana, Mora Romagnola);
- popolazioni commerciali (Large White Italiana, Landrace Italiana, Duroc Italiana, Pietrain, Hampshire e Landrace Belga);
- popolazioni di cinghiali.

Risultati

I risultati ottenuti hanno permesso di mettere a punto un sistema per la distinzione di carne di cinghiale da quella di suini domestici (pubblicazione n. 3).

Per l'identificazione di un marcatore di razza da utilizzare per discriminare la carne di Cinta Senese da quella di altre razze è stato analizzato il gene KIT, responsabile della cinghiatura del mantello. Un SNP identificato nell'esone 18 è risultato un marcatore della cinghiatura. Per verificare l'informatività dello SNP, è stata condotta l'analisi PCR-RFLP del DNA di 600 suini appartenenti a diverse razze. I risultati confermano il potenziale utilizzo di questo marcatore ai fini della tracciabilità della carne di Cinta Senese (brevetto n. 1).

Il sistema di identificazione di marcatori monorazza è stato combinato insieme a un sistema di identificazione della specie di provenienza di prodotti a base di carne utilizzando un approccio di *next generation sequencing* con la piattaforma Ion Torrent e sequenziamento di frammenti di mtDNA preamplificati oltre ad altri nucleari (pubblicazione n. 4).

Specie ovicaprina

Materiale e metodi

L'attività è stata focalizzata su:

- 1.5 analisi di *Copy Number Variation* (CNV) nel genoma ovino per l'identificazione di marcatori utili per la tracciabilità di razza;

1.6 analisi di *Copy Number Variation* (CNV) nella specie caprina per l'identificazione del duplication breakpoint.

L'attività di cui al **p.to 1.5.**, in via preliminare si è basata sull'identificazione di informazioni relativamente a questa tipologia di marcatori, utilizzando i dati di genotipizzazione già disponibili per quanto riguarda l'OvineSNP50 BeadChip. Inoltre, sono stati analizzati i dati ottenuti da circa 24 animali per ciascuna delle seguenti 15 razze: Altamurana, Appenninica, Bagnolese, Bergamasca, Biellese, Delle Langhe, Fabrianese, Gentile di Puglia, Istrian Pramenka, Laticauda, Massese, Pinzirita, Sambucana, Sopravissana e Valle del Belice. Gli SNPs del pannello Illumina OvineSNP50 BeadChip sono stati rimappati sulla versione del genoma ovino Oar_v3.1. Utilizzando elevati parametri di stringenza, necessari per ridurre il numero di falsi positivi, sono stati identificati in totale 656 eventi CNV che coprono circa 2.62 Mb del genoma ovino e corrispondenti a 24 CNV regions (CNVRs). Queste CNVRs sono state annotate per identificare i geni coinvolti che a loro volta sono stati utilizzati in sistemi di *Gene Ontology*.

Risultati

I dati ottenuti non hanno permesso di identificare CNV razza specifici (abstract n. 3).

Materiale e metodi

L'attività di cui al **p.to 1.5.** ha interessato la regione comprendente il gene ASIP (associato al colore del mantello) delle razze Girgentana e Saanen. Un CNV in questa regione è stato precedentemente identificato da Fontanesi et al. (2009, *Cytogenetic and Genome Research* 126, 333-347). Una prima strategia è stata adottata sulla base del fatto che fino a pochi mesi fa non era disponibile il sequenziamento completo del genoma caprino. Questa strategia è volta ad amplificare sul DNA di diversi animali di diverse razze caprine frammenti genomici sovrapposti mediante *long PCR* con primer disegnati sul genoma bovino e corrispondenti alla regione caprina nella quale è stato identificato il CNV oggetto di studio. Per questo scopo sono state disegnate 20 coppie di primers. Dieci di queste sono state testate e i prodotti ottenuti su 4 di queste sono disponibili per il risequenziamento. Tuttavia, sulla base del fatto che il sequenziamento del genoma caprino è stato effettuato un cambio di strategia per l'identificazione della *duplication breakpoint* di questo CNV. Da un altro progetto sono stati sequenziati i genomi completi con tecnologia Illumina di capre di diverse razze in pool (Girgentana, Camosciata, Saanen e Maltese). I dati genomici sono stati analizzati preventivamente per identificare il CNV nella regione corrispondente.

Risultati

Al momento, le analisi bioinformatiche hanno permesso di identificare la regione di interesse.

WP2 - UTILIZZAZIONE DI MARCATORI MOLECOLARI PROTEICI PER LA RINTRACCIABILITÀ DELLA 'FRESCHEZZA' O 'ETÀ' DI UN LATTE E DEI PRODOTTI DA ESSO DERIVATI

Organizzazione e obiettivo della ricerca

La ricerca è rivolta alla “Identificazione di un ‘marcatore molecolare’ per valutare il grado di freschezza del latte di bufala nella produzione della mozzarella DOP”.

La mozzarella è un formaggio fresco tipico mediterraneo a pasta filata, a coagulo presamico, ricavato da latte di bufala e commercializzato in diverse pezzature e forme. È un prodotto caratterizzato da una notevole rilevanza economica nell’ambito del mercato dei prodotti lattiero-caseari, in seguito alla sempre crescente produzione, conseguenza di un continuo incremento della domanda. La tendenza a produzioni e profitti maggiori ha portato negli ultimi anni allo sviluppo di una “industria parallela”: quella dei semilavorati. I semilavorati sono riconducibili a tre tipologie diverse di prodotto:

- a. cagliate pressate e refrigerate normalmente conservabili fino a tre mesi;
- b. cagliate congelate;
- c. preparati alimentari, che stanno diventando sempre più la materia prima del processo produttivo della mozzarella, sostituendo di fatto il latte fresco.

Tali prodotti hanno in comune la convenienza economica (si evita tutta la fase della coagulazione del latte) e la facilità d’uso. Con questi semilavorati si può arrivare ad abbattere i costi di produzione di oltre il 50%; per contro, è impossibile dare origine a formaggi di qualità. È sempre più diffuso, infatti, nel ciclo di produzione dei formaggi a pasta filata, l’utilizzo di latte ‘*non fresco*’ o di ‘*cagliate refrigerate*’ o ‘*congelate*’.

La mozzarella di bufala Campana DOP, pur essendo un prodotto sottoposto a disciplinare di produzione, non è tutelata sotto l’aspetto della freschezza della materia prima; freschezza che può essere indagata mediante determinazione del profilo oligopeptidico in quanto i livelli di frammentazione e la formazione di specifici frammenti ‘*segnano il tempo*’ di conservazione del latte e delle cagliate.

Tale metodica ha permesso di distinguere i campioni di mozzarella di bufala Campana DOP ‘*adulterati*’ da quelli prodotti secondo il disciplinare.

Materiale e metodi

La sperimentazione ha previsto l'analisi di 10 campioni di latte di bufala e di 130 campioni di mozzarella di bufala forniti dall'Istituto Sperimentale Zooprofilattico di Portici (NA), di cui 80 provenienti dalla vendita al minuto all'interno dei caseifici e 50 provenienti dalla grande distribuzione.

L'attività di ricerca ha individuato come marcatori molecolari i frammenti derivanti dalle frazioni α 1- e β -CN con l'impiego di diverse metodiche della proteomica al fine di determinare il grado di 'freschezza' della mozzarella di bufala. Tali frammenti a basso peso molecolare della α 1-CN e delle β -CN che si formano sono dovuti all'azione enzimatica della chimosina e catepsina sulla frazione α 1-CN e della plasmina sulla frazione β -CN. L'azione proteolitica di questi enzimi è stata determinata mediante:

- a. analisi elettroforetica monodimensionali (SDS-PAGE) della frazione caseinica del latte e della mozzarella di bufala
- b. analisi elettroforetica bidimensionale (2DGE) della frazione caseinica della mozzarella di bufala.
- c. analisi elettroforetica UREA-PAGE della frazione caseinica e delle sieroproteine del latte e della mozzarella di bufala.
- d. test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) su latte fresco e congelato.

Risultati

L'elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE) permette di determinare il profilo oligopeptidico della frazione caseinica del latte e della mozzarella di bufala. Dalla stessa è scaturita la presenza del frammento γ 4 (fr. 69-209) della β -CN in tutti i campioni indagati anche se in differente quantità; diversità evidenziabile da una differente intensità di colorazione delle bande elettroforetiche (fig. 1). Il frammento in questione ha un peso molecolare di circa 15,3 kDa, è il primo a essere generato dall'azione della plasmina e si forma in quantità maggiori rispetto agli altri conosciuti come: γ 1 (fr. 29-209), γ 2 (fr. 107-209) e γ 3 (fr. 109-209).

Per valutare l'intensità di colorazione delle bande elettroforetiche è stata calcolata la quantità esatta di proteina da 'caricare' su gel (400 μ g). Superando tale concentrazione, si osserva una saturazione di colorazione delle bande che non permette di discriminare un campione dall'altro. La quantità ottimale di proteina da 'caricare' su gel ha reso possibile una prima classificazione dei campioni indagati come mostrato nella figura 1.

L'elettroferogramma riassuntivo (fig. 1) delle varie tipologie di latte e mozzarelle analizzate riporta:

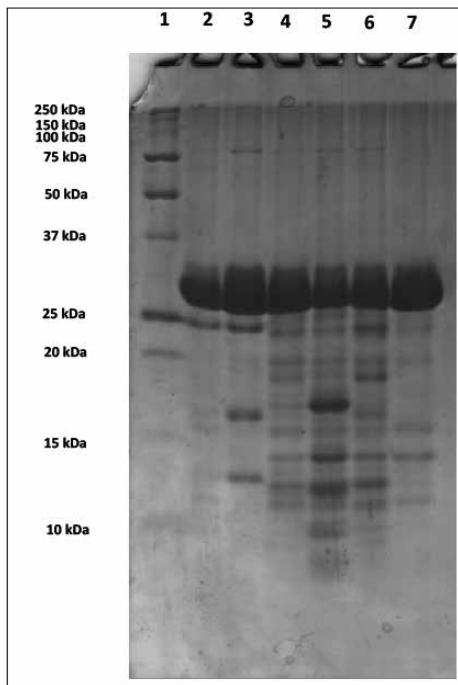


Fig. 1 *Elettroferogramma della frazione caseinica del latte e della mozzarella di bufala*

- a. profilo 1: standard di pesi molecolari;
- b. profilo 2: latte bufalino fresco;
- c. profilo 3: latte bufalino congelato per oltre tre mesi;
- d. profili 4, 5 e 6: campioni di mozzarella di bufala con vario grado di proteolisi trovati nel corso dell'indagine elettroforetica.

Dalla stessa emerge che i campioni provenienti dalla grande distribuzione (profili 4, 5 e 6) presentano un'intensità di colorazione maggiore rispetto a quello proveniente dalla vendita al minuto all'interno dei caseifici (profilo 7); la maggiore quantità del marcatore nei campioni dei profili 4, 5 e 6 lascerebbe ipotizzare l'utilizzo di semilavorati scongelati nella produzione di mozzarella per la grande distribuzione dal momento che con lo scongelamento riprende l'attività enzimatica della plasmina responsabile della formazione di tale marcatore.

Ciò sta a indicare che la mozzarella prodotta, come già succede per il bovino, è manifatta con semilavorati a basso costo per abbattere i costi di produzione e promuovere sconti sulla merce venduta.

L'analisi elettroforetica mono-dimensionale ha portato alla conclusione che la tecnica SDS-PAGE è in grado di rivelare il grado di proteolisi della mozzarella e, quindi, lo stato di conservabilità della mozzarella, che può essere così riassunto:

N. SPOT	PI/MWEXP	N. DI PEPTIDI IDENTIFICATI MEDIANTE MS/MS	SCORE	N. DI ACCESSO E NOME SWISSPROT
1	5.12/30000	4 (2)	155	P02663 CASA2_BUBBU
2	4.9/27000	4 (4)	130	O62824 CASB_BUBBU
3	4.5/29000	6 (3)	198	O62823 CASA1_BUBBU
4	4.00/22000	4 (2)	143	O62823 CASA1_BUBBU
5	3.5/18000	1 (1)	47	O62823 CASA1_BUBBU
6	4.3/18000	1 (1)	49	O62823 CASA1_BUBBU
7	3.7/15000	2 (2)	52	O62823 CASA1_BUBBU
8	3.7/14000	2 (2)	109	O62823 CASA1_BUBBU
9	4.7/18000	3 (2)	116	O62823 CASA1_BUBBU
10	4.9/18000	4 (2)	350	O62822 LACB_BUBBU
11	4.6/14000	3 (2)	318	O62823 CASA1_BUBBU
12	4.9/15000	2 (1)	165	O62823 CASA1_BUBBU
13	5.0/15000	2 (1)	141	O62823 CASA1_BUBBU
14	4.4/10000	2 (2)	70	O62823 CASA1_BUBBU
15	4.8/10000	1 (1)	55	O62823 CASA1_BUBBU

Tab. 1

- mozzarella di bufala Campana DOP fresca distinguibile per il previsto processo di proteolisi;
- mozzarella di bufala Campana DOP prodotta con ingredienti non freschi, distinguibile per effetto di una proteolisi primaria più pronunciata dovuta all'azione di enzimi endogeni e del caglio, e per l'utilizzo di cagliate pressate e refrigerate probabilmente provenienti dall'estero;
- mozzarella di bufala Campana DOP con marcata proteolisi dovuta o all'utilizzo di latte non conservato nella maniera più idonea (non refrigerato), o dovuta a una cattiva conservazione del prodotto o dovuta all'uso di mozzarelle invendute.

L'elettroforesi bidimensionale (2DGE) mediante spettrometria di massa tandem ESI-Q/ToF (fig. II) eseguita sulla frazione caseinica di mozzarella di bufala 'adulterata' ha permesso di identificare gli stessi frammenti precedentemente individuati con l'elettroforesi SDS-PAGE.

L'identificazione degli spot sono riportati nella tabella 1.

I frammenti della β -CN sono stati identificati successivamente come $\gamma 2$ f(106-209), $\gamma 3$ f(108-209)-, $\gamma 4$ f(69-209) -CN, f(49-209) e f(98-209) (fig. 2).

L'elettroferogramma riassuntivo (fig. 3) scaturito dall'analisi UREA-PAGE della frazione caseinica e delle sieroproteine del latte vaccino e della mozzarella di bufala riporta:

- la frazione caseinica del latte vaccino (lane 1) e di bufala (lane 2);
- la frazione delle sieroproteine del latte vaccino (lane 3) e di bufala (lane 4);

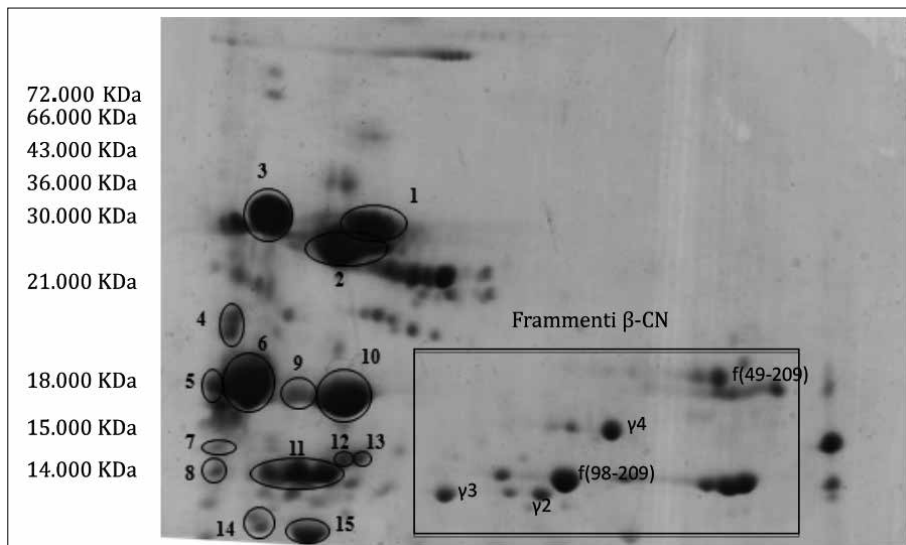


Fig. 2 Mappa elettroforetica bidimensionale della frazione caseinica di mozzarella di bufala 'adulterata'.

- c. la frazione caseinica della mozzarella di bufala 'adulterata' (lane 5) la quale presenta una marcata proteolisi che determina la formazione di frammenti α 1-I-CN (racchiusi nel quadrato rosso);
- d. la frazione caseinica della mozzarella di bufala prodotta con latte fresco (lane 6);
- e. la frazione caseinica della mozzarella vaccina 'adulterata' acquistata al dettaglio (lane 7).

Pertanto, è possibile ritenere i frammenti α 1-CN individuati quali marcatori in grado di discriminare una mozzarella di bufala 'adulterata' da una mozzarella di bufala prodotta con latte fresco; inoltre, tale metodica, per i ridotti costi e per i tempi brevi di esecuzione, è da ritenere una metodica di analisi da applicare routinariamente per riscontrare possibili frodi alimentari nella produzione di mozzarella di bufala DOP.

Il test ELISA è una metodologia immunochimica di elevata sensibilità che ha condotto a risultati promettenti seppur preliminari.

La capacità di discriminare un latte congelato da uno fresco, come si può immaginare, è abbastanza difficile in quanto il congelamento tende a bloccare o a rallentare significativamente le reazioni enzimatiche. Nel corso della sperimentazione, nell'allestire la metodologia più idonea per sviluppare l'ELISA indiretta su campioni di latte si è potuto appurare che la preparazione del

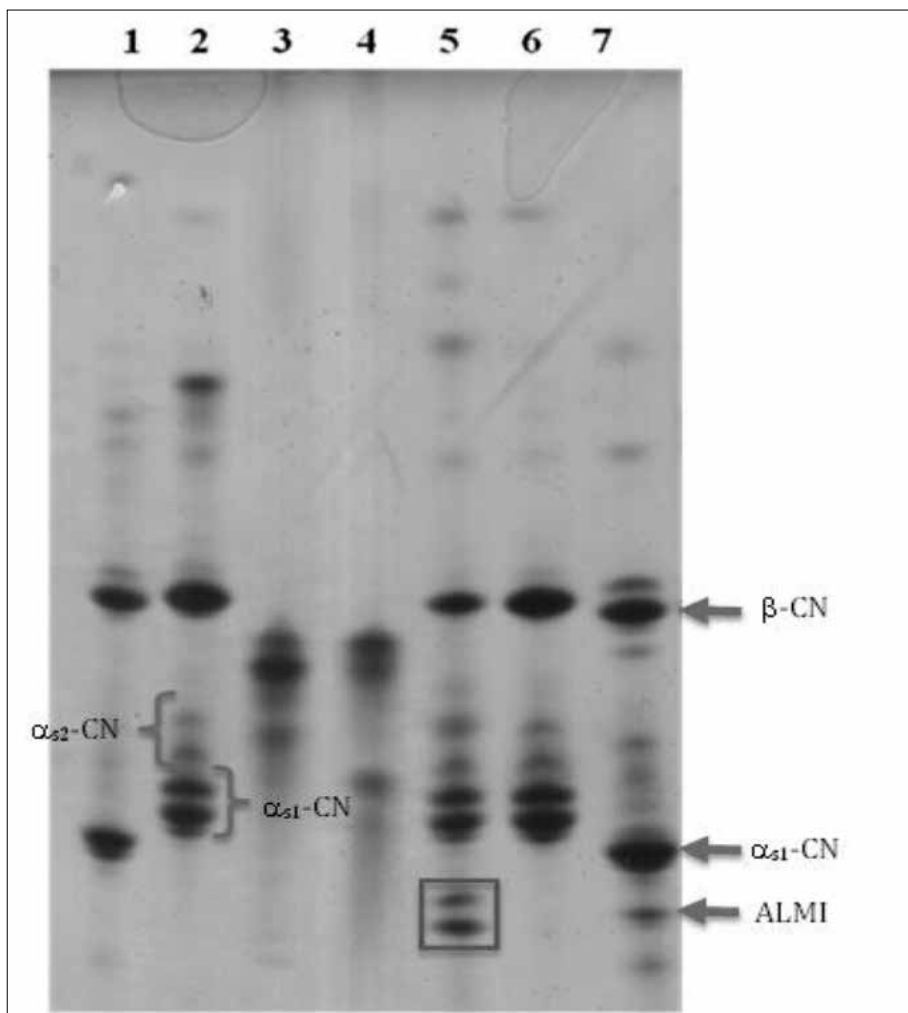


Fig. 3 Elettroferogramma su gel di poliacrilammide dell'UREA-PAGE al 8%.

campione è molto critica. Di fatto, i campioni si devono dializzare e liofilizzare per eliminare ogni interferenza. L'analisi ELISA indiretta ha dimostrato che la percentuale della frazione ponderale media di β -CN contenuta nel latte diminuisce significativamente con l'aumentare del tempo di conservazione del latte a -20°C . Nell'indagine preliminare sono stati valutati 4 intervalli di tempo di conservazione (0, 2 mesi, 24 mesi e 48 mesi).

Il Grafico 1 evidenzia che la percentuale della frazione ponderale media di β -CN risulta:

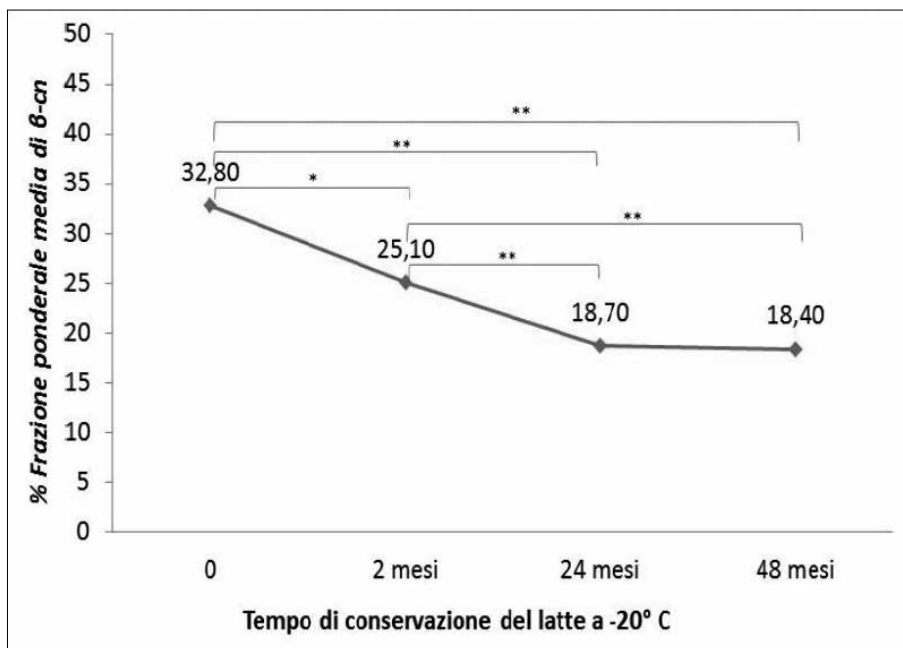


Grafico 1 Percentuale di β -CN 'intatta' con l'aumentare del tempo di conservazione del latte a -20 °C.

- 32,80% nel latte fresco;
- 25,10% nel latte conservato a -20 °C per circa due mesi;
- 18,70% nel latte conservato a -20 °C per circa 24 mesi;
- 18,40% nel latte conservato a -20 °C per circa 48 mesi.
- statisticamente significativa la differenza tra le percentuali tra i diversi intervalli considerati, eccetto per 24 mesi *vs* 48 mesi.

I risultati di questa prima indagine mostrano che l'enzima endogeno del latte (la plasmina) agisce sui campioni anche durante il congelamento. In un precedente lavoro Gagliardi et al. (2009) hanno dimostrato che questa metodica consente di rivelare variazione della concentrazione della β -CN dopo un mese, lavoro complementare a codesto. Pertanto, l'ELISA è da ritenere idonea e si propone come valido strumento quantitativo per la distinzione di un latte fresco da uno conservato a -20 °C; sono in corso ulteriori indagini per mettere a punto un protocollo *ad hoc* al fine di riuscire a 'rintracciare' il tempo di conservazione del latte conoscendo la percentuale della frazione ponderale media di β -CN.

Le tecniche elettroforetiche si sono dimostrate ottimi strumenti analitici qualitativi che ci consentono di avere informazioni sulla qualità delle mozza-

relle che si trovano in commercio e a volte difficili da avere con le preparazioni fatte in laboratorio. Infine, la tecnica immunochimica è un promettente strumento di analisi per rivelare il congelamento del latte.

Con questo progetto abbiamo raggiunto interessanti risultati che sicuramente rappresentano le basi per lo sviluppo di strumenti che tutelano la “Mozzarella di Bufala Campana” DOP e tutta la produzione italiana di formaggi freschi, soprattutto in questo momento dove una politica di globalizzazione tende a appiattire le diversità che sono invece la forza del nostro patrimonio culturale ed economico.

WP3 - INDIVIDUAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MARCATORI MOLECOLARI *PROTEICI* SPECIE SPECIFICI (RAZZA SPECIFICI?) RESPONSABILI DI DIFFERENZE TRA LE SPECIE ‘BOVINA’ E ‘BUFALINA’ PER LA RINTRACCIABILITÀ DI CARNE E DERIVATI.

Organizzazione e obiettivo della ricerca

La ricerca è rivolta alla individuazione e caratterizzazione di marcatori molecolari *proteici* responsabili di differenze tra le specie ‘bovina’ e ‘bufalina’ nell’ottica di evidenziare ‘presenza di carne’ di specie diversa da quella ‘dichiarata’.

Materiale e metodi

La sperimentazione ha previsto l’analisi elettroforetica bidimensionale in gradiente di pH stretto (intervallo 4,2 -5,4) della frazione miofibrillare di 10 campioni di carne appartenente a soggetti bovini e bufalini. I campioni di carne sono stati omogenizzati in tampone fosfato 10 mM a pH 7,0 e le proteine sono state frazionate in base alla loro diversa solubilità. La parte solubile costituita dalle proteine sarcoplasmatiche è stata allontanata; quella insolubile costituita dalle proteine miofibrillari e dalla frazione minore delle proteine del collagene è stata disciolta in un opportuno tampone denaturante e riducente costituito da urea, NP40 e DTT. Le mappe bidimensionali sono state acquisite per essere sottoposte ad analisi dell’immagine con software Image Master 2D-Platinum che permette di valutare il diverso grado di fosforilazione delle isoforme delle catene leggere della miosina MLC1 e MLC2 nell’ottica di differenziare le 2 specie animali.

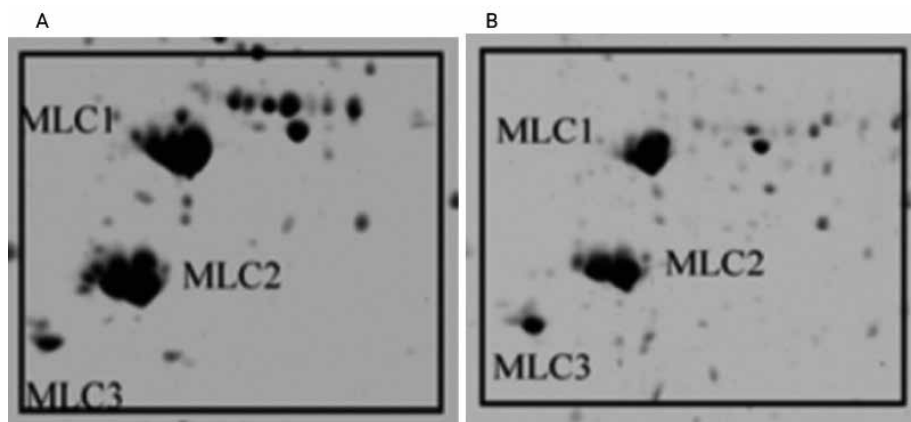


Fig. 4 *Mappa elettroforetica bidimensionale della frazione miofibrillare di carne bovina (A) e bufalina (B).*

(A) *Frazione miofibrillare di carne bovina* (B) *Frazione miofibrillare di carne bufalina*

Risultati

Le mappe bidimensionali relative alla frazione miofibrillare di campioni di carne bovina e bufalina hanno rivelato una maggiore eterogeneità a carico delle catene leggere della miosina nel muscolo bovino (fig. 4). Tale eterogeneità è dovuta a un maggior grado di fosforilazione che costituisce elemento discriminante per le due specie.

Successivamente si è ricorso all'elettroforesi in prima dimensione: la focalizzazione isoelettrica, la quale è in grado di separare i peptidi in base al loro punto isoelettrico (pI: valore di pH al quale la carica netta di una proteina è nulla); pertanto, è stata eseguita una focalizzazione isoelettrica convenzionale con l'uso di "carrier ampholites" nell'intervallo di pH 4,2-5,4, miscelando carrier ampholites con intervallo di pH 4,2-4,9 e 4,5-5,4 nelle proporzioni percentuali di 50:50.

Dalla figura V è possibile osservare come il profilo proteico della carne bovina (tracciato 1) si differenzia da quello della carne bufalina (tracciato 2); inoltre, i tracciati 3, 4, 5 e 6 rappresentano campioni di carne bovina miscelata al 5, 10, 15 e 30% in carne di bufalo; pertanto, tale metodica permette di differenziare le due specie in base alle proteine miofibrillari.

Le proteine miofibrillari della carne bovina e bufalina frazionate mediante focalizzazione isoelettrica nel gradiente stretto di pH 4,2-5,4 in tempi brevissimi ci consente di distinguere le carni delle due specie.

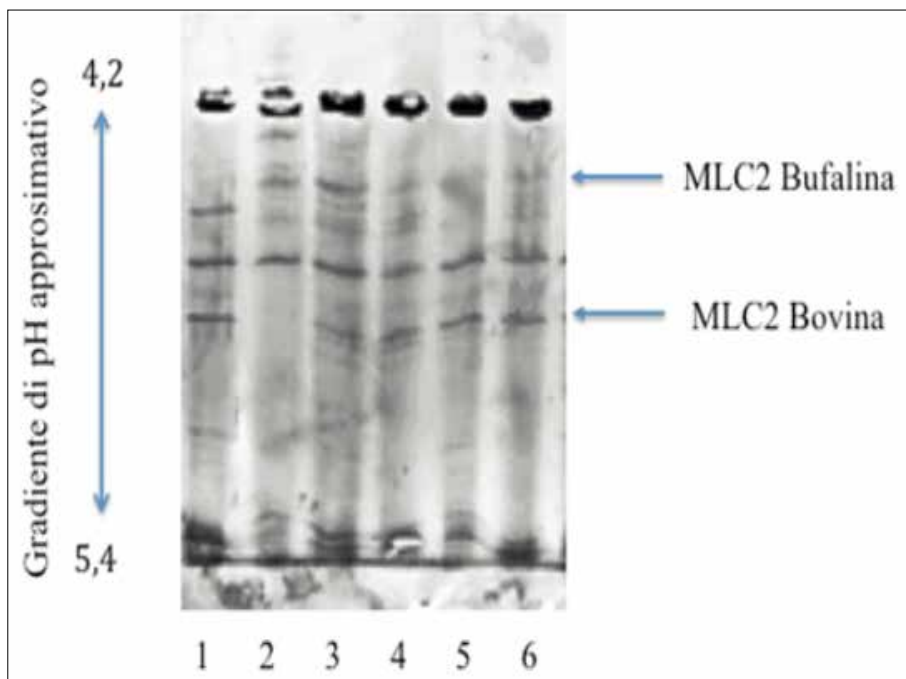


Fig. 5 Focalizzazione isoelettrica con Phast-system (GE-Healthcare) di miscele di carne bovina e bufalina.

CONCLUSIONI GENERALI

I risultati raggiunti nell'ambito di questo progetto sono da considerare dei punti di partenza fondamentali per l'elaborazione e la messa a punto di test molecolari ai fini dell'autenticazione di prodotti 'monorazza' volti a tutelare le produzioni animali di qualità 'Made in Italy' e la sostenibilità del sistema zootecnico italiano.

BIBLIOGRAFIA

Pubblicazioni su riviste referizzate

- 1) FONTANESI L., SCOTTI E., RUSSO V. (2012): *Haplotype variability in the bovine MITF gene and association with piebaldism in Holstein and Simmental cattle breeds*, «Animal Genetics», 43, pp. 250-256.
- 2) BERTOLINI F., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCHIAVO G., MATASSINO D., FONTANESI L. (2015): *Combined use of principal component analysis and random forests identi-*

- fy population-informative single nucleotide polymorphisms: application in cattle breeds*, «Journal of Animal Breeding and Genetics», in press. doi: 10.1111/jbg.12155.
- 3) FONTANESI L., RIBANI A., SCOTTI E., UTZERI V.J., VELIČKOVIĆ N., DALL'OLIO S. (2014): *Differentiation of meat from European wild boars and domestic pigs using polymorphisms in the MC1R and NR6A1 genes*, «Meat Science», 98, pp. 781-784.
 - 4) BERTOLINI F., GHIONDA M.C., D'ALESSANDRO E., GERACI C., CHIOFALO V., FONTANESI L. (2015): *A next generation semiconductor based sequencing approach for the identification of meat species in DNA mixtures*, «PLoS One», 10, e0121701.

Brevetti

- 1) FONTANESI L., DALL'OLIO S., SCOTTI E. (2015): *Marcatore del DNA per l'identificazione dei suini di razza Cinta Senese e relative metodi e kit di identificazione*, Domanda n. 102015000011082.

Abstract e presentazione a convegni

- 1) BERTOLINI F., SARDINA M.T., SCHIAVO G., MATASSINO D., RUSSO V., PORTOLANO B., FONTANESI L. (2013): *Analysis of Illumina BovineSNP50 BeadChip data in different Italian cattle breeds to identify useful markers for breed authentication of dairy and beef products*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13, June 2013.
- 2) SCHIAVO G., SCOTTI E., NANNI COSTA L., DALL'OLIO S., D'ALESSANDRO E., RUSSO V., FONTANESI L. (2013): *Genetic diversity in different Italian pig breeds evaluated using Illumina PorcineSNP60 BeadChip data*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13, June 2013.
- 3) SCHIAVO G., NOSRATI M., CIANI E., D'ANDREA M., MATASSINO D., FONTANESI F. (2013): *The BIOVITA (Biodiversità Ovina Italiana) Consortium (2013) Analysis of copy number variations in Italian sheep breeds using the Illumina OvineSNP50 BeadChip array*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13, June.
- 4) SCHIAVO G., BERTOLINI F., GALIMBERTI G., GIOVANNA CALÒ D., SCOTTI E., MATASSINO D., RUSSO V., DALL'OLIO S., NANNI COSTA L., FONTANESI L. (2015): *Combined principal component analysis and random forest approaches identified population informative SNPs in several Italian pig breeds*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), Abstract n. P-070.
- 5) GAGLIARDI R., PROROGA Y.T.R., BARBATO A., TRANI A., FACCIA M., DI LUCCIA A. (2009): *ELISA for monitoring the freshness of river buffalo curd*, Atti del convegno "Micheese-AS-Methods and. Issues in Cheese Authenticity Studies", Avellino 3-5/09, p. 44.

Studio e implementazione di sistemi su base bio-molecolare per il controllo delle dinamiche di diffusione di agenti patogeni potenzialmente presenti nelle popolazioni animali a tutela della salute umana, della sicurezza alimentare e a difesa del patrimonio zootecnico

Responsabile Scientifico:

Antonia Ricci, *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*

Gli obiettivi di questo progetto sono articolati nei seguenti Workpackages e dettagliati di seguito:

WP1: effettuare uno studio di fattibilità finalizzato alla definizione e ottimizzazione delle diverse fasi metodologiche propedeutiche allo sviluppo di metodi molecolari innovativi per la determinazione e caratterizzazione di patogeni alimentari da diverse matrici alimentari; in particolare verrà effettuato

- uno studio bibliografico preliminare e quindi una serie di prove sperimentali finalizzate a definire un protocollo ottimale di estrazione dell'acido nucleico dei target selezionati a partire da una matrice definita.

WP2: definire un protocollo innovativo bio-molecolare che rappresenti uno strumento di facile accessibilità, automatizzabile, veloce e in grado di discriminare simultaneamente e con accuratezza i diversi target definiti in base alla incidenza nell'ambito produttivo stabilito. Tale protocollo potrebbe basarsi su approcci molecolari quali real time PCR o un bead suspension array.

WP1: La fase iniziale del progetto ha previsto un approfondito studio della bibliografia finalizzato:

- a definire i microrganismi da identificare;
- a definire i potenziali geni target comuni a tali microrganismi.

Sulla base delle sequenze note dei geni *housekeeping* (p.e. rRNA, tmRNA), nell'ambito del progetto sono stati sviluppati metodi molecolari per caratterizzare i principali batteri patogeni a trasmissione alimentare come *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria spp.*, *Escherichia coli*, *Yersinia spp.*, *Bacillus Cereus*, *Staphylococcus aureus*. Nello specifico è stato effettuato uno studio

delle sequenze altamente conservate a carico di ciascun microrganismo target tramite software che consentono il multi-allineamento di sequenze geniche. Tale approccio ha permesso di individuare regioni amplificabili, di dimensioni discrete (200-500bp), che avessero elevata omologia tra i diversi organismi pur conservando poliformismi interni alle regioni di allineamento dei *primer*. La presenza di polimorfismi consente la determinazione successiva sull'amplificato tramite una sonda opportunamente marcata in grado di riconoscere tramite sistema *bead suspension array* il microrganismo specifico.

Allo scopo di individuare un protocollo di pre-arricchimento comune per il maggior numero di patogeni alimentari, si è proceduto con la selezione di materiale certificato a concentrazione nota per i diversi microrganismi.

Sono stati, dunque, individuati terreni di pre-arricchimento "aspecifici", descritti in letteratura, in grado di consentire la crescita di microrganismi diversi ovvero MEUM (Multipathogen enrichment Universal medium - Diatheva) e UPB (Universal Pre enrichment Broth - Difco).

Tali terreni sono stati contaminati con materiale certificato ("*lenticules*"), acquistato presso l'Health Protection Agency a titolo noto (< 50 CFU).

Ciascun terreno di pre-arricchimento è stato contaminato con i microrganismi selezionati singolarmente, in condizioni di incubazione diverse, ovvero: 25°C, 30°C, 37°C; per 24h e 48h; in agitazione e non (\pm 300 rpm), in presenza della matrice latte crudo, selezionata come rappresentativa dei prodotti lattiero-caseari. Inoltre, tale matrice rappresenta un modello di studio esemplare in quanto particolarmente ricco di flora microbica di background. La presenza del microrganismo utilizzato in ciascuna sessione sperimentale è stata verificata sia qualitativamente tramite metodo microbiologico di riferimento e tramite saggio real time PCR specifico per l'identificazione di ciascun patogeno, sia quantitativamente tramite enumerazione delle unità formanti colonia.

L'esito di tali prove ha consentito di identificare le condizioni ottimali di pre-arricchimento ovvero:

- terreno ottimale: UPB;
- temperatura pari a 30°C;
- tempo di incubazione pari a 48 ore;
- agitazione pari a 300 rpm durante l'incubazione.

Il pannello di microrganismi da studiare è stato ampliato allo scopo di identificare un saggio avente un ampio spettro di applicazione e tali condizioni di pre-arricchimento sono state valutate sui seguenti microrganismi di seguito riportati:

- *Salmonella* Typhimurium;
- *Listeria monocytogenes*;
- *Escherichia coli* O157;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Yersinia enterocolitica*.

In tutti i casi, a seguito di pre-arricchimento nelle condizioni stabilite è stata confermata la presenza del microrganismo inoculato artificialmente tramite metodo qualitativo microbiologico e molecolare (real time PCR).

Tuttavia, la verifica quantitativa non ha permesso di effettuare una conta dei singoli microrganismi, a causa dell'elevata presenza di flora microbica background.

Inoltre, l'amplificazione del gene target 16S ha evidenziato la presenza di lattobacilli, compatibili con la flora tipica della matrice in esame, ma prevalenti rispetto al microrganismo inoculato artificialmente, la cui crescita è stata inibita dalla flora background prevalente.

WP2: In una fase preliminare è stato sviluppato un saggio mirato alla caratterizzazione di un tratto genomico codificante per l'rRNA 16S. Sono stati identificati i *primer* per l'amplificazione di due potenziali regioni target, quindi sono state messe a punto le rispettive PCR (amplificati rispettivamente di 232 e 472 bp). In particolare, tramite il software *Genamics Expression*, è stato disegnato 1 primer forward in corrispondenza della regione 315-361 e 2 *primer* reverse in corrispondenza delle regioni 501-556 e 766-813. Si riportano di seguito le sequenze dei *primer* disegnati e le relative caratteristiche

16S for: 5' CTG AGA CAC GGT CCA GAC TCC TAC G 3' 25bp

Tm: 60°C GC%: 60%

16S rev: 5' TAA CGC TTG CAC CCT CCG TAT TAC C 3' 25bp

Tm: 61°C GC%: 52°C

16S rev II: 5' ATC TAA TCC TGT TTG CTC CCC ACG 3' 24bp

Tm: 59°C GC%: 50%

La specificità degli amplificati ottenuti per un primo pannello di microrganismi: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp è stata verificata tramite sequenziamento Sanger di una selezione di ceppi di campo appartenenti alle differenti specie. Quindi, sono state disegnate delle sonde, all'interno del target individuato, specifiche per tali patogeni.

Dalle prove effettuate l'amplificato caratterizzato dalle migliori performances è risultato quello di lunghezza pari a 472 bp.

Dunque per il *Campylobacter* spp. è stata selezionata la sonda 1.

Nella fase successiva del progetto sono state disegnate ulteriori sonde per i microrganismi identificati.

Nella tabella seguente si riportano tutte le sonde disegnate:

Target sonda	Sequenza nucleotidica	Length	ID	Bead
<i>Salmonella</i> spp:	5' GGG AGG AAG GTG TTG TGG TTA A	3'	22bp	1
<i>Escherichia coli</i> :	5' TAA TAC CTT TGC TCA TTG ACG	3'	21bp	2
<i>Yersinia</i> spp.:	5' CTT AAT ACG TTG TTG GAT TGA CG	3'	23bp	99
<i>Campylobacter</i> spp.:	5' GAA TTC TGA CGG TAC CTA AGG	3'	21bp	100
<i>Listeria</i> spp.:	5' CAA GGA TAA GAG TAA CTG CTT GTC CC	3'	26bp	57
<i>Pseudomonas</i> spp.:	5' GCA GTA AGT TAA TAC CTT GCT GTT	3'	24bp	48
<i>Staphylococcus aureus</i> :	5' TAT GTG TAA GTA ACT GTG CAC ATC	3'	24bp	33
<i>Bacillus</i> spp.:	5' TTG CTA GTT TGA ATA AGC TGG CAA	3'	24bp	65

Le sonde sono state disegnate in maniera tale da permettere, almeno dal punto di vista teorico, che venissero rispettate le indicazioni minime per poter garantire il loro funzionamento quando impiegate nel sistema Bioplex, basato su tecnologia Luminex.

Ciascuna sonda è stata poi associata a una specifica microsfera (Id indicato in tabella; fase di "coupling").

La tecnologia Luminex si basa su un sistema di due fluorofori, in grado di riconoscere le singole microsfere sulla base del loro specifico indirizzo spettrale (e quindi le sonde a esse legate) e l'intensità del legame tra il campione in esame (costituito da ampliconi marcati con streptavidina) e la sonda legata alla superficie della microsfera.

Per monitorare l'efficacia delle operazioni di accoppiamento (tra microsfere e sonda) è stato eseguito un saggio nell'ambito del quale si è verificato, tramite lettura con Bioplex, il legame tra la probe legata alle microsfere e un'anti-probe di sintesi marcata con biotina (Fase identificata come: "verifica del coupling").

In parallelo, come previsto sono stati valutati kit commerciali o saggi in house basati su real time PCR specifici per la maggior parte dei patogeni precedentemente menzionati.

Dall'analisi delle performances osservate in termini di specificità dei saggi (100%) e di sensibilità (LOD < 10 CFU/mL) oltre che dalla valutazione del costo di tali saggi in termini di reagenti e di tempo necessario per il proces-

samento, si evince che i metodi che consentono di identificare i principali patogeni alimentari eventualmente presenti negli alimenti destinati al consumo umano sono i metodi molecolari quali saggi real time PCR specifici per i singoli microrganismi.

Genomica e cromatina nel determinismo del livello di fertilità dei tori

Responsabili Scientifici:

Marina Montedoro, Andrea Galli, *Istituto Lazzaro Spallanzani*

10.1 DESCRIZIONE DEI RISULTATI IN RELAZIONE AGLI OBIETTIVI GENERALI E SPECIFICI PREVISTI NEL PERIODO DI RIFERIMENTO

L'obiettivo della WP era la caratterizzazione del livello di fertilità dei tori, definita come ERCR, tramite dati di tipo seminologico standard e avanzato (stato della cromatina) e genomico (chip HD).

L'attività di ricerca ha consentito la messa a punto di un modello statistico che tramite i dati di tipo seminologico consente di caratterizzare precocemente tori di bassa fertilità, quelli di maggior impatto produttivo per i centri di produzione seme. L'efficienza del modello è elevato consentendo di predire il 91% dei tori con bassa fertilità (valutata a posteriori tramite ERCR con alta attendibilità). L'analisi statistica dei dati genomici, seppur non risolutiva in termini di caratterizzazione del livello di fertilità, ha consentito di individuare SNP molto interessanti per una successiva individuazione di geni candidati.

10.2 ATTIVITÀ SVOLTE

La WP era suddivisa in 4 attività (tab. 1).

1. *Scelta dei tori*

I tori sono stati scelti in base al valore dell'ERCR.

L'ERCR è espresso come percentuale di Non Ritorni a 56 giorni (NR56),

ATTIVITÀ	CONTENUTO
1	Scelta dei tori calcolo ERCR
2	Analisi seminale analisi standard analisi cromatina
3	Analisi genomica
4	Analisi statistica dati seminologici dati genomici

Tab. 1 *Cronogramma del progetto*

aggiustato per i maggiori effetti ambientali. L'ERCR rappresenta l'effetto del toro su NR56 delle vacche inseminate in azienda, rispetto alla media dei NR56 degli altri tori.

L'ERCR con un adeguato numero di eventi rappresenta il livello di fertilità.

Il livello di fertilità consente di definire il numero critico di spermatozoi per raggiungere la massima fertilità in campo. Con un livello medio e alto di fertilità sono sufficienti 3-4 milioni di spermatozoi con caratteristiche di vitalità, mentre con un livello di fertilità basso sono necessari più di 10 milioni di spermatozoi vitali. Esistono comunque caratteristiche degli spermatozoi non compensabili aumentando il numero degli stessi utilizzati nell'inseminazione artificiale: sono i parametri non compensabili quali quelli che caratterizzano lo stato della cromatina nucleare.

L'ERCR di tutti i tori usati in inseminazione artificiale in Italia è stato calcolato con il seguente modello lineare generale misto (MGLM).

$$NR56 = HYM + ECM + P + DOI + AIC + \underline{Sire} + OSIRE + PE + e$$

dove:

NR56 = stato della vacca 56-giorni dopo il parto
(1 non ritorno; 0 re-inseminata)

HYM = azienda-anno-mese di inseminazione

ECM = energia spesa nella produzione di latte al 3,5 % grasso
e 3,2 % proteina

P = ordine di parto

DOI = classi di days-open

AIC = centri produzione seme

Sire = effetto casuale del toro (**ERCR**)

OSIRE = origine del "toro servizio"

PE = effetto ambientale permanente vacca

e = residuo casuale comune

Dal calcolo è scaturita una ereditabilità dell'ERCR pari a 0,009, con una correlazione tra fertilità genetica delle figlie e fertilità del toro di -0,015. Ne consegue che i caratteri fertilità dei tori e delle figlie sono indipendenti ed è importante valutarli entrambi.

Quale risultato della task è stato ottenuto il dataset ERCR.

I tori da utilizzare per la ricerca dovevano da un lato essere rappresentativi dei diversi livelli di fertilità, pertanto i loro indici dovevano possedere un adeguato livello di attendibilità statistica.

Il dataset ERCR è stato pertanto analizzato tramite Cluster Analysis (metodo k-means), dopo filtraggio dei dati per attendibilità $\text{ERCR} \geq 89\%$ e con il vincolo di seme congelato disponibile presso i centri di produzione seme.

Sono stati definiti 3 cluster: 1 = bassa fertilità; 2 = fertilità media; 3 = alta fertilità.

Inizialmente erano previsti 60 tori, poi diventati 105.

Di ogni toro sono stati acquistati 3 lotti, come previsto dal programma di ricerca, quindi per aumentare l'informatività dello studio è stato acquistato un quarto lotto.

2. *Analisi seminale*

Il seme congelato è stato analizzato dopo scongelamento a 37° C in bagno-maria termostato.

- Le variabili misurate sono state le seguenti:
- Concentrazione (CT), fluorimetria tramite NucleoCounter SP100;
- Motilità (MT, MP, VAP), sistema CASA – HTM IVOS v.12;
- Integrità di membrana (IM), fluorimetria tramite NucleoCounter SP100;
- Stato della cromatina (DFI, TUNEL) Citofluorimetria a Flusso previo trattamento citochimico.

Complessivamente sono stati analizzati 420 lotti di seme, per un totale di 2520 misure seminologiche.

Quale risultato della task è stato ottenuto il dataset seminologico.

3. *Analisi genomica*

L'analisi genomica è stata condotta in *outsourcing*, tramite Chip Illumina da 800k (HD), presso i laboratori AIA-LGS.

	MEDIA	DS	CV	0%	25%	50%	75%	100%
MT	52.2	15.58	0.29	8.0	40.75	53.00	64.00	88.0
MP	41.2	14.03	0.34	6.0	30.00	42.00	53.00	70.0
VAP	92.2	16.12	0.17	11.0	81.00	90.00	103.25	138.0
NSPM	16.5	9.39	0.56	1.7	10.10	14.60	20.98	56.3
IM	51.6	14.69	0.28	0.0	42.00	54.00	63.00	89.0
DFI	6.3	5.48	0.86	1.0	4.00	5.00	7.00	96.0
TUNEL	6.0	3.55	0.59	1.0	3.00	5.00	7.25	32.0

Tab. 2 *Indici di fertilità*

MISURA	VARIANZA		EFFETTO DEL CENTRO
	TORO	LOTTO	
MT	27,49%	8,47%	< 0.0001
MP	37,69%	8,24%	< 0.0001
VAP	44,20%	3,50%	< 0.0001
IM	46,05%	10,01%	< 0.0001
DFI	35,62%	1,00%	0.0571
TUNEL	20,91%	0,89%	< 0.0001

Tab. 3 *Varianza degli indici*

MISURE	FATTORE	
	1	2
MT	0.986	-0.149
MP	0.869	-0.108
VAP	0.352	
IM	0.555	-0.439
DFI	-0.118	0.582
TUNEL		0.480

Tab. 4 *Fattori principali associati agli indici*

4. *Analisi statistica*

Dataset seminologico

Nella tabella 2 si riporta la statistica descrittiva calcolato sul dataset seminologico. Tramite MGLM è stato studiato l’effetto del toro e del lotto, considerati come effetti random, e del centro di produzione seme, considerato come effetto fisso. I risultati si riportano nella tabella 3. L’effetto del centro, quando presente, è dovuto a due strutture. Si conferma la elevata componente della varianza associabile al toro.

	FATTORI	
	1	2
VARIANZA	0.364	0.134
VARIANZA CUMULATIVA	0.364	0.497

Tab. 5 *Varianze associate ai fattori principali*

$\chi^2=22.54$	$GL=4$	$p=0.000156$
----------------	--------	--------------

Tab. 6 *Studio della varianza*

Risulta positivo ai fini della informatività della ricerca una limitata variabilità del lotto in generale e in particolare una variabilità molto bassa per le misure relative allo stato della cromatina nucleare (DFI, TUNEL).

Al fine di caratterizzare l'eventuale unicità dell'informatività delle misure dello stato della cromatina è stata eseguita una analisi fattoriale.

Nella tabella 4 si riporta la matrice di caricamento.

Dall'analisi della tabella si evince che il carico informativo delle misure dello stato della cromatina è univoco, essendo rappresentato da un fattore chiaramente separato rispetto a quello associabile alle misure convenzionali della qualità seminale.

Nella tabella 6 si riporta lo studio della varianza.

Dal momento che l'interesse dei Centri di Produzione Seme è quello di individuare precocemente i tori che richiedono più spermatozoi nella dose per garantire la massima Fertilità in campo è stata sviluppata l'analisi statistica in modo tale da verificare la possibilità di definire un modello predittivo del basso livello di fertilità dei tori. I vantaggi per i centri di produzione seme deriverebbero dal fatto che potrebbero ottimizzare la produzione della dose con un maggiore numero di spermatozoi, senza dover aspettare i risultati della fertilità di campo che sono sempre molto tardivi a pervenire al centro.

Il dataset seminologico è stato pertanto arricchito di una colonna relativa alla codifica per basso livello di fertilità del toro (LowFERT).

La codifica è stata eseguita tramite la variabile CLUSTER precedentemente calcolata sul dataset ERCR.

IF CLUSTER = 1 THEN LowFERT = 1

IF CLUSTER = 2 THEN LowFERT = 0

IF CLUSTER = 3 THEN LowFERT = 0

È stato quindi sviluppato il primo modello logistico, contenente le variabili continue seminali e la variabile discreta LOTTO:

$$LowFERT = \beta_0 + \beta_1 NSPM + \beta_2 MT + \beta_3 MP + \beta_4 VAP + \beta_5 IM + \beta_6 DFI + \beta_7 TUNEL + LOTTO_i + e$$

	STIMA	ES	Z	P	
INTERCETTA	-4.229366	1.307460	-3.235	0.00122	**
NSPM	-0.034264	0.029508	-1.161	0.24557	
MT	0.026233	0.026390	0.994	0.32019	
MP	-0.065249	0.025339	-2.575	0.01002	*
VAP	-0.005462	0.011669	-0.468	0.63977	
IM	0.044904	0.017359	2.587	0.00969	**
DFI	0.085869	0.028569	3.006	0.00265	**
TUNEL	0.179887	0.045066	3.992	6.56e-05	***

Tab. 7 Soluzione del modello per le variabili seminali

	STIMA	ES	Z	P	
INTERCETTA	-4.51845	0.94922	-4.760	1.93e-06	***
MP	-0.05476	0.01569	-3.490	0.000483	***
IM	0.04907	0.01660	2.956	0.003118	**
DFI	0.08493	0.02827	3.004	0.002665	**
TUNEL	0.17660	0.04419	3.996	6.43e-05	***
G=41.33 (p<0.0001); AIC=232.84					

Tab. 8 Stima dei coefficienti

	LR	X2	GL	P
MP	12.5060	1	0.0004056	***
IM	9.7518	1	0.0017915	**
DFI	10.8478	1	0.0009891	***
TUNEL	15.4258	1	8.581e-05	***

Tab. 9 Significatività delle variabili

	0	1
FALSO	377	35
VERO	3	5

Tab. 10 Correttezza di classificazione

Nella tabella 7 si riporta la soluzione del modello per le variabili seminali. È stato definito un secondo modello contenente solo gli effetti trovati significativi nel primo:
$$LowFERT = \beta_0 + \beta_1 MP + \beta_2 IM + \beta_3 DFI + \beta_4 TUNEL + e$$

La stima dei coefficienti è riportata nella tabella 8.
La significatività delle variabili è riportata nella tabella 9.

				INTERVALLO DI CONFIDENZA AL 95%	
	VALORI ORIGINALI	BIAS	ES	NORMALE	PERCENTILE
INTERCETTA	-4.51844543	-0.781588266	1.25071032	-6.2200 -1.3560	-7.9210 -3.1580
MP	-0.05475885	0.005493553	0.01981008	-0.0990 -0.0210	-0.0879 -0.0102
IM	0.04907193	0.002258374	0.01554186	0.0177 0.0762	0.0239 0.0814
DFI	0.08493344	0.078180857	0.11700486	-0.2155 0.2390	0.0504 0.3948
TUNEL	0.17659693	-0.024176784	0.07220660	0.0565 0.3443	0.0006 0.2994

Tab. 11 *Bootstrap - Statistica (replicazioni=999)*

Il modello è stato utilizzato per la stima del livello di fertilità dei tori tramite misure seminologiche, riportando il 91 % di correttezza, come desumibile dalla tabella 10.

È stato quindi eseguito uno studio statistico tramite tecniche di bootstrapping, riportando i risultati elencati nella tabella 11.

Applicando alla classificazione del livello di bassa fertilità dei tori i parametri calcolati con il bootstrapping si ottiene un range di corrette classificazioni pari al 89% - 91%.

Dataset genomico

Dopo l'acquisizione dei dati e la verifica del formato dei file la situazione era la seguente:

94 tori
777962 SNP (Illumina BovineHD chip)
HW $p < 0.0001$
MAF < 0.02

Dopo l'editing dei dati la situazione era la seguente:

85 tori utilizzabili
591988 SNP utilizzabili

I fenotipi (Yc) sono stati corretti per l'effetto del centro di produzione

$$Yc_{jk} = \text{CENTRO_FA}_j + a_k + e_{jk}$$

$$\text{residual} = y$$

$$y_{ij} = \text{SNP}_j + e_{ij}$$

$$\text{con: } a \sim N(0, \mathbf{G} \sigma_u^2); e \sim N(0, \mathbf{I} \sigma_e^2).$$

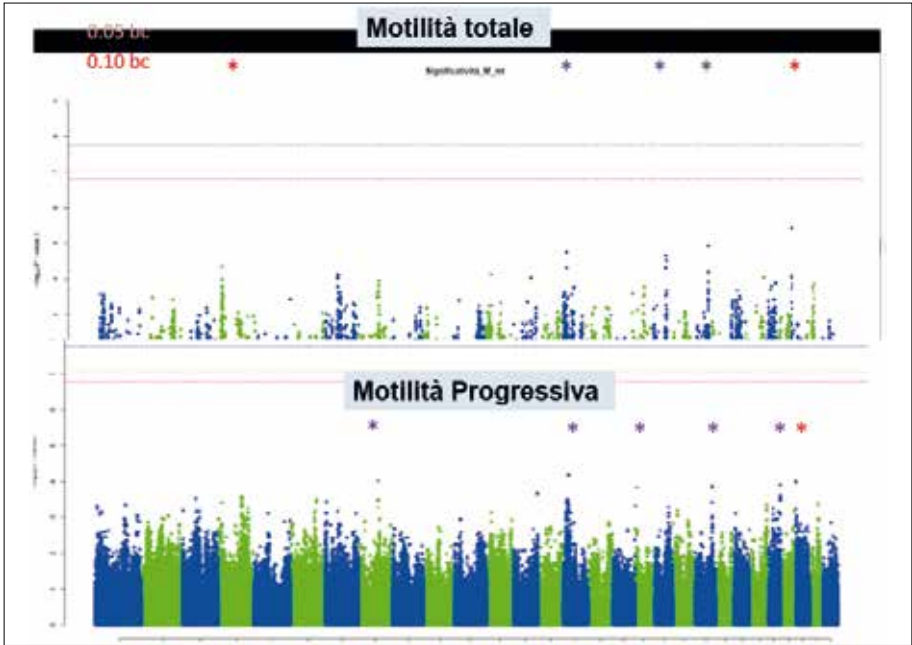


Fig. 1 *Genome scan per motilità*

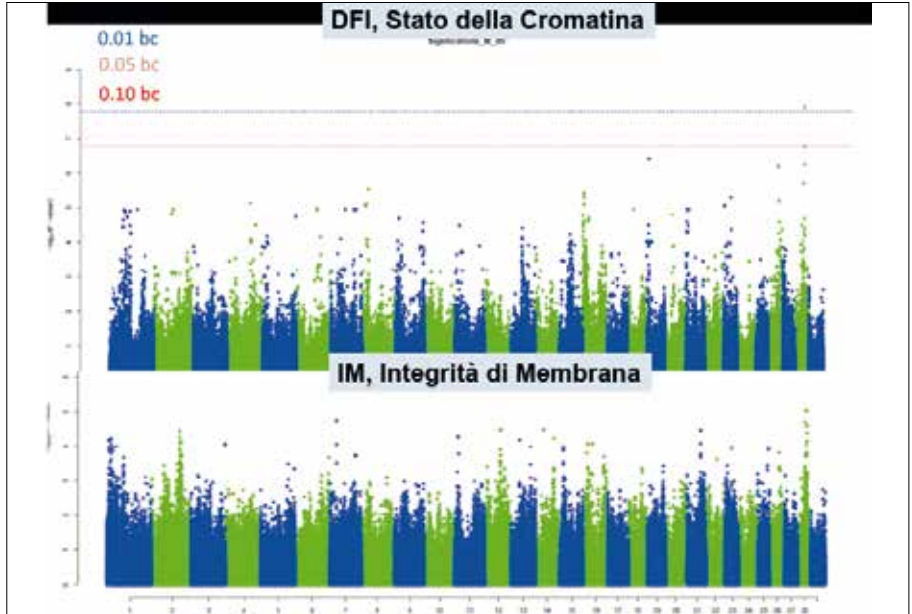


Fig. 2 *Genome scan per integrità cromatina e membrana*

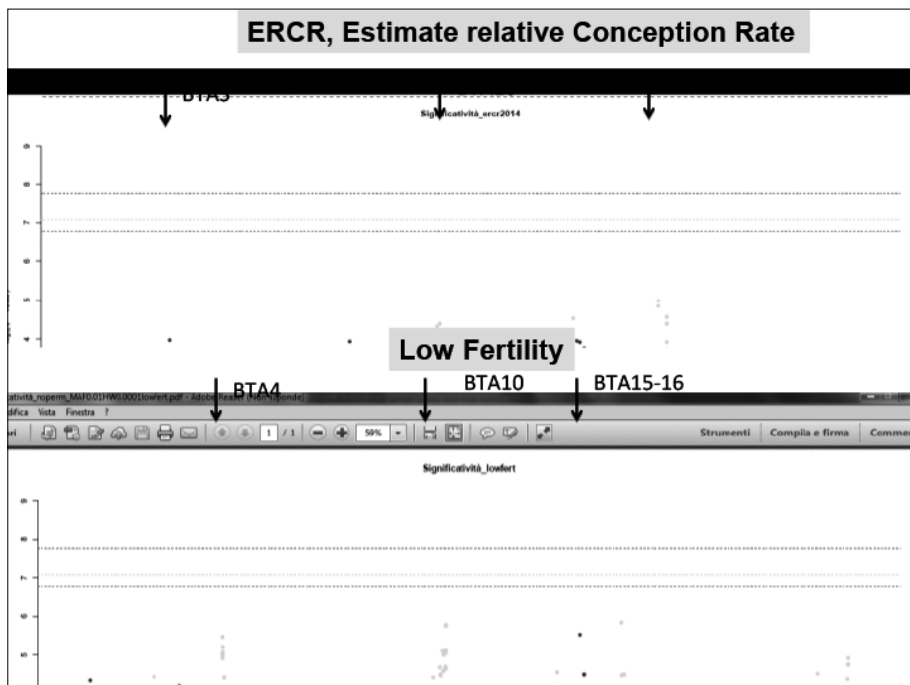


Fig. 3 *Significatività per indici di fertilità*

Per l'analisi dei dati è stato eseguito l'approccio GrammarGC (Auchencko et al., 2007), utilizzando il software Genabel Package in R e procedendo con la correzione del fenotipo per la parentela genomica.

I risultati sono presentati graficamente nei Manhattan Plot (Graf. 1-3).

Sono stati trovati SNPs interessanti, con alto livello di significatività statistica.

Nelle tabelle 12 e 13 si riportano in termini comparativi quanto da noi evidenziato rispetto a quanto riportato dalla scarsa letteratura internazionale.

I risultati ottenuti non sono risolutivi circa la possibilità di stabilire chiari collegamenti tra il genoma e fenotipi finali, ma sono molto promettenti!

Un ulteriore passo verso l'integrazione delle informazioni richiede la ricerca di polimorfismi in geni candidati vicini alle regioni genomiche identificate da studi GWAS.

Motilità

Marker	Trait	BTA Position	P-value	
BovineHD0400002747	Motilità Tot	4	8912596	4E-05
BovineHD0400002748	Motilità Tot	4	8913237	4E-05
BovineHD0400002749	Motilità Tot	4	8914777	4E-05
BovineHD0800019203	Motilità Progr.	8	64119930	9E-05
BovineHD1500004589	Motilità Tot	15	18067791	2E-05
BovineHD1500004589	Motilità Progr.	15	18067791	6E-05
BovineHD1500004590	Motilità Tot	15	18071786	5E-05
BovineHD1800001598	Motilità Progr.	18	5169112	1E-04
BovineHD1900013994	Motilità Tot	19	50213886	2E-05
BovineHD1900014905	Motilità Tot	19	53356447	3E-05
BovineHD2100017369	Motilità Tot	21	59907791	1E-05
BovineHD2100017369	Motilità Progr.	21	59907791	1E-04
BovineHD2100017442	Motilità Progr.	21	60139170	1E-04
BovineHD2100017448	Motilità Progr.	21	60160559	1E-04
BovineHD2500011691	Motilità Progr.	25	41515789	1E-04
BovineHD2600014268	Motilità Progr.	26	49517842	9E-05
BovineHD2700000116	Motilità Tot	27	316088	4E-06
BovineHD2700000116	Motilità Progr.	27	316088	1E-04
BovineHD2700000122	Motilità Tot	27	326078	4E-06
BovineHD2700000122	Motilità Progr.	27	326078	1E-04

Michot et al. (cit
Valour 2015)

Druet et al. 2009
Michot et al.
(cit Valour 2015)

Tab. 12 *Marcatori associati alla motilità*

Marcatore	Carattere	BTA	Posizione	P-value	
BovineHD0300008573	TUNEL	3	27022839	4E-06	BTA 3 30.28 Mb BTA 19 Non-compensatory fertility (Blaschek et al. 2011)
BovineHD0300008574	TUNEL	3	27023983	4E-06	
BovineHD410001961	TUNEL	3	27024892	4E-06	
BovineHD0300008576	TUNEL	3	27027813	4E-06	
BovineHD0300008577	TUNEL	3	27029132	4E-06	
BovineHD0300008578	TUNEL	3	27033352	4E-06	
BovineHD0300008579	TUNEL	3	27038740	4E-06	
BovineHD0300008580	TUNEL	3	27042448	4E-06	
BovineHD0300008581	TUNEL	3	27045824	4E-06	
BovineHD0300008582	TUNEL	3	27047043	7E-07	
BovineHD0700006539	Integr. Membrana	7	23832882	2E-05	BTA3, BTA28, Sperm volume, sperm concentration, Number of spermatozoa (Michot et al., cit Valour et al. 2015)
BovineHD0700006544	Integr. Membrana	7	23846696	2E-05	
BovineHD4100013899	DFI	19	9147190	4E-07	
BovineHD2600010542	DFI	26	38219677	6E-07	
BovineHD4100017937	DFI	26	38225649	6E-07	
BovineHD2800006900	DFI	28	26638772	2E-06	
BovineHD2800007992	DFI	28	30054567	2E-06	
BovineHD2800008609	DFI	28	32601290	5E-07	
BovineHD2800009025	DFI	28	33677489	1E-08	
BovineHD2800009027	DFI	28	33682118	2E-07	
BovineHD2800009028	DFI	28	33685334	2E-07	
BovineHD2800009029	DFI	28	33687545	2E-07	
BovineHD2800007121	Integr. Membrana	28	27288946	2E-05	
BovineHD2800007122	Integr. Membrana	28	27293178	2E-05	
BovineHD2800007123	Integr. Membrana	28	27294273	2E-05	
BovineHD2800008472	Integr. Membrana	28	32173530	9E-06	
BovineHD2800008478	Integr. Membrana	28	32204738	9E-06	
BovineHD2800008479	Integr. Membrana	28	32208068	9E-06	
BovineHD2800008480	Integr. Membrana	28	32209453	9E-06	
BovineHD2800008481	Integr. Membrana	28	32210126	9E-06	

Tab. 13 *Marcatori associati alla integrità*

10.3 DESCRIZIONE DELLE INTERAZIONI TRA LE UUOO PARTECIPANTI, EVENTUALI COLLABORAZIONI ESTERNE E IMPRESE

Sono state sviluppate collaborazioni esterne con l'ANAFI, per il calcolo degli ERCR, e con il laboratorio AIA-LGS per le analisi genomiche.

Le interazioni con le altre UUOO hanno riguardato essenzialmente l'UO dell'Università di Sassari (responsabile scientifico Prof. Macciotta) per la valutazione statistica dei dati genomici.

10.4 OSTACOLI OCCORSI E AZIONI CORRETTIVE MESSE IN ATTO

Di un toro non è stato possibile reperire il materiale seminale per le analisi.

Il toro non è stato sostituito in quanto il numero dei soggetti considerato era comunque superiore a quello originariamente previsto.

Sviluppo e validazione di modelli per l'applicazione di schemi di selezione assistita da marcatori e selezione genomica alle specie di interesse zootecnico

Responsabile Scientifico:

Nicolò Pietro Paolo Macciotta, *Università di Sassari*

Nell'ambito dell'progetto INNOVAGEN – il cui obiettivo generale è di integrare le conoscenze di genetica molecolare con quelle tecnico-operative sulla selezione animale, aggiornando le conoscenze acquisite nel progetto SELMOL a sostegno del progresso genetico delle produzioni animali – si inquadra l'attività dell'unità operativa Modelli (UO modelli - UNISS).

I componenti dell'unità UO Modelli, coordinata dal Prof. Nicolò Pietro Paolo Macciotta dell'Università Di Sassari – Dipartimento di Agraria (UNISS), hanno maturato una elevata competenza nello sviluppo e applicazione di metodi matematico statistici alle problematiche della selezione assistita da marcatori. Le attività dell'UO modelli sono state svolte in stretta collaborazione con le Unità bovini da latte e bovini da carne. Le razze oggetto di studio sono state BRUNA (BRU), FRISONA (FRI) PEZZATA ROSSA (PRI), PIEMONTESE (PMT) e MARCHIGIANA (MAR) utilizzando sia le nuove genotipizzazioni previste dal progetto INNOVAGEN, che quelle derivanti dal precedente progetto SELMOL.

L'UO modelli UNISS si avvale della collaborazione di esperti di diverse Università e Centri di Ricerca, quali:

1. Università cattolica del Sacro Cuore di Piacenza (Piacenza) – Istituto di Zootecnica: Prof. Ajmone-Marsan (UNICATT)
2. Università degli Studi della Tuscia (Viterbo) – Dipartimento di scienze e tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (Dafne): Proff. Umberto Bernabucci, Alessio Valentini (UNITUS-DAFNE)
3. Università degli studi di Milano – Facoltà di Agraria: Prof.ssa Paola Crepaldi (UNIMI)

4. Parco Tecnologico Padano: Dott.ssa Alessandra Stella (PTP)
5. Università degli studi del Molise (UNIMO). Campobasso. Prof. Fabio Pilla.
6. Università Degli studi “Federico II” (NA), Dipartimento di scienza del suolo della pianta, dell’ambiente e delle produzioni animali. Prof. Luigi Ramunno.
7. Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani (ISILS), Dott. Andrea Galli

L’UO modelli si avvale, inoltre, della collaborazione di personale assunto con i fondi del progetto che contribuiscono a mantenere la rete d’interazioni tra l’U.O. e gli esperti delle diverse Università o dai Centri di Ricerca. L’UO modelli, in particolare ha assunto con assegno di ricerca i giovani ricercatori elencati di seguito:

RICERCATORE	TIPO DI CONTRATTO	EXPERTISE
Giustino Gaspa	Assegnista di ricerca	Stima valori genomici, GWAS
Valentina Bonfatti	Assegnista di ricerca	Stima valori genomici
Alessandro Trusso	Assegnista di ricerca	Analisi dati genomici
Marcello Del Corvo	Assegnista di ricerca	Analisi di pedigree e consanguineità

Inoltre contribuiscono al progetto giovani ricercatori non direttamente assunti da INNOVAGEN che collaborano con l’UO modelli:

RICERCATORE	AFFERENZA	EXPERTISE
Silvia Sorbolini	Assegnista di ricerca presso Dipartimento di Agraria UNISS	Biologia molecolare, miglioramenti genetico
Gabriele Marras	Dottorando di Ricerca presso il Dipartimento di Agraria UNISS	Biodiversità, Section sweep, Run of Homozygosity.
Antonio Puledra	Dottorando di Ricerca presso il Dipartimento di Agraria UNISS	Miglioramento genetico, fisiopatologia dei pesci

[SEZIONE 10.1 ALLEGATO 7]

Gli obiettivi generali dell’U.O. MODELLI

Nel corso del progetto l’unità ha sviluppato le seguenti linee di ricerca: *i)* sviluppo e ottimizzazione di metodi matematico statistico applicati alla previsione dei valori genetici genomici sia entro razza che utilizzando in contemporanea dati di diverse razze bovine; *ii)* studio delle relazioni tra rassomiglianza genetica tra razze diverse e accuratezze delle previsioni dei valori genetici genomici *multibreed*; *iii)* sviluppo di metodi di analisi dei dati derivanti da piattaforme di 800K SNP e dal sequenziamento dell’intero genoma; *iv)* consulenza matemati-

WORK PACKAGE (WP)	TITOLO WP	INDICATORI DI VERIFICA	UO COINVOLTE
WP 1	Ottimizzazione metodi di previsione valori genetici genomici (GEBV) nelle razze bovine allevate in Italia	Comunicazioni a convegni nazionali/internazionali	UO LATTE (UNICATT) UO CARNE (UNITUS) ANA
WP 2	Calcolo dei valori genetici genomici multibreed nelle razze bovine allevate in Italia.	Articoli su rivista Comunicazioni a convegni nazionali/internazionali	UO LATTE (UNICATT) UO CARNE (UNITUS) PTP ANA
WP 3	Calcolo dei valori genetici genomici nelle femmine delle razze bovine da latte allevate in Italia	Articoli su rivista	UO LATTE (UNICATT) ANA
WP 4	Sviluppo di metodi per l'analisi di dati derivanti da mappe genetiche ad altissima densità e sequenziamento dell'intero genoma	Comunicazioni a convegni nazionali/internazionali	ANA
WP 5	Consulenza alle altre unità operative coinvolte nel progetto	Articoli su rivista	UO LATTE (UNICATT) UO CARNE (UNITUS) UNIMO UNINA UNIMI ISILS

co statistica alla altre unità operative del progetto per studi associazione fra SNP e caratteri di interesse economico in diverse specie di interesse zootecnico ed elaborazione dati. Tali attività saranno svolte in stretta collaborazione con le varie Associazioni Nazionali Allevatori e con le altre unità operative del progetto.

Gli obiettivi specifici dei WP e gli indicatori di verifica insieme alle collaborazioni con le altre UUOO sono riportati nella seguente tabella. Le successive sottodivisioni dei WP in azioni e il loro svolgimento insieme ai risultati ottenuti (per le azioni già concluse) sono elencati nei paragrafi successivi uno per ciascun WP.

[SEZIONE 10.2 ALLEGATO 7]

WP 1: Ottimizzazione metodi di previsione valori genetici genomici (GEBV) nelle razze bovine allevate in Italia

Azione 1.1: Ottimizzazione metodo di riduzione dei predittori basato sulle componenti principali.

AZIONE CONCLUSA**Collaborazioni:** UO LATTE (UNICATT), UO CARNE (UNITUS), ANA

Dott. Giustino Gaspa ha lavorato all'ottimizzazione del numero di PC per la stima dei valori genetici genomici nelle razze PRI, FRI e BRU. Comunicazione orale è stata presentata al XX convegno ASPA 2013. Calcolo dei valori genomici per caratteri della carne nella razza PRI mediante l'uso di mappe SNP ad alta densità (54K) e ottimizzazione del metodo delle componenti principali (in collaborazione con il Prof. Valentini).

Comunicazioni a convegni e articoli su rivista

GASPA G., MARRAS G., SORBOLINI S., DIMAURO C., JORJANI H., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Effect of reference population composition and number of principal components (PC) on the accuracy of multiple-breed genomic evaluation*, Presentato al XX convegno ASPA, Bologna 11-13 Giugno.

GASPA G., PINTUS M.A., NICOLAZZI E.L., VICARIO D., VALENTINI A., DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Use of Principal Component approach to predict Direct Genomic Breeding Values for Beef Traits in Italian Simmental Cattle*, «J Anim Science», 91, pp. 29-37.

Azione 1.2: Studio dell'effetto del trend genetico e della modellizzazione delle varianze degli effetti dei predittori sulla accuratezza dei valori genetici genomici.

Collaborazioni: UO LATTE (UNICATT), ANA

a) Dott. Massimo Cellesi ha sviluppato di un metodo per la stima dei valori genetici genomici dei bovini da latte attraverso la selezione di marcatori sulla base delle loro frequenze genotipiche (maximum difference analysis - MDA) in collaborazione con Prof. Ajmone-Marsan UO LATTE)

Comunicazioni orali presentate al convegno ADSA-ASAS nel 2012/2013.

CELLESI M., MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., VICARIO D., AJMONE-MARSAN P., STELLA A., DIMAURO C.: *Prediction of direct genomic values by using a restricted pool of SNP selected by maximum difference analysis.*

Articolo in revisione

CELLESI M., DIMAURO C., SORBOLINI S., NICOLAZZI E.L., AJMONE-MARSAN P. AND MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Maximum Difference Analysis: a new*

empirical method for genome-wide association studies, Submitted to Animal.

b) Sviluppo di procedure di diverse procedure di editing dei genotipi di tori di razza FRI derivanti da piattaforme HD (800K SNP) in collaborazione con l'UO latte. Calcolo di alcune statistiche relative alla struttura della popolazione. Il dott. Cellesi ha predisposto un algoritmo in python per effettuare MDA.

Azione 1.3: Sviluppo metodi di combinazione di diverse fonti di informazione per il calcolo dei GEBV

Collaborazioni: ANABORAPI

Confronto tra le accuratezze degli indici genomici e dell'indice pedigree per caratteri relativi alla difficoltà di parto e alla fertilità in bovini di razza Piemontese. Obiettivo della ricerca è stato quello di confrontare le accuratezze degli indici genomici per la difficoltà di parto e alcuni caratteri considerati nelle prove di performance con l'accuratezza degli indici pedigree per i medesimi caratteri, al fine di valutare il possibile uso applicativo degli indici genomici nelle procedure di selezione dei tori Piemontesi da avviare alle prove di progenie per le difficoltà di parto. I risultati dello studio indicano che la selezione dei tori da avviare alle prove di progenie per la difficoltà di parto, effettuata al termine della prova di performance, è, se condotta considerando i GEBV dei tori per la difficoltà di parto, del 20% più efficiente di quella attuale basata sull'indice pedigree

Azione 1.4: Sviluppo di modelli per l'analisi dei GEBV con l'utilizzo di misure ripetute

Collaborazioni: ANAPRI

Analisi di associazione tra SNP anonimi o in geni candidati e caratteri di interesse economico in specie di interesse zootecnico allevate in Italia. GWAS per i caratteri della curva di lattazione in vacche di razza Pezzata Rossa Italiana genotipizzate con un low density panel.

Comunicazione a congressi:

MACCIOTTA N.P.P., VICARIO D., DIMAURO C., GASPA G., CELLESI M., PULEDDA A., SORBOLINI S., AND AJMONE-MARSAN P. (2014): *GWAS per i caratteri della curva di lattazione in vacche di razza Pezzata Rossa Italiana genotipizzate con un low density panel*, Presentato ADSA-ASAS JOINT ANNUAL MEETING (KANSAS CITY – 20-24/07/2014)

Azione 1.5: Studio di diversi algoritmi per la velocizzazione dei tempi di calcolo

Collaborazioni: ANAPRI

Predisposizione di algoritmi per il calcolo dei valori genomici usando le componenti principali utilizzando diversi linguaggi di programmazione (fortran, sas). Applicazione di tali algoritmi per il calcolo degli indici genomici della razza pezzata rossa italiana.

WP 2: Calcolo dei valori genetici genomici multibreed nelle razze bovine allevate in Italia

Tra gli obiettivi di indagini vi era quello dell'approccio multibreed. Questo aspetto è di interesse particolare nella situazione italiana, data la presenza di numerose razze con una dimensione numerica limitata che non permette la stima degli effetti genomici entro razza.

Azione 2.1: Analisi della variabilità genetica e entro e fra razze con la matrice di parentela genomica

Collaborazioni: Alessandra Stella, PTP.

L'assegnista dott. Marcello Del Corvo ha lavorato su questo aspetto all'interno di un gruppo di lavoro del Parco Tecnologico Padano che sta partecipando a un progetto Europeo (Gene2Farm) che ha tra i diversi obiettivi quello di approfondimenti sulla predizione genomica con il sistema multibreed. Con questa collaborazione INNOVAGEN collabora al progetto Europeo Gene2Farm, a cui a fatto seguito una comunicazione a un convegno internazionale.

Comunicazione a congressi

CELLESI M., MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., VICARIO D., AJMONE-MAR-SAN P., STELLA A., DIMAURO C. (2013): *Prediction of direct genomic values by using a restricted pool of SNP selected by maximum difference analysis*, presentato ADSA-ASAS JOINT ANNUAL MEETING (INDIANAPOLIS 8-12 /07 /2013):

Azione 2.2: Studio delle differenze genomiche fra razze con metodi di regressione locale e analisi delle serie temporali

CONCLUSA.

Collaborazioni: Alessandra Stella, PTP.

Nell'ambito del progetto INNOVAGEN è stato messo a punto di un metodo di riconoscimento della razza di provenienza basato sull'analisi canonica discriminante dal dott. Dimauro utilizzando piattaforme di SNP a media densità. (54k) Inoltre metodi di regressione locale sono stati applicati per lo studio di diversità genetica tra 1 razza da latte e una carne. Due articoli su rivista sono stati pubblicati a riguardo.

Articoli su rivista

DIMAURO C., CELLESI M., STERI R., GASPA G., SORBOLINI S., STELLA A., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Use of the canonical discriminant analysis to select SNP markers for bovine breed assignment and traceability purposes*, «Animal Genetics».

PINTUS E., SORBOLINI S., ALBERA A., GASPA G., DIMAURO C., STERI R., MARRAS G., MACCIOTTA N.P.P. (2014): *Use of Locally Weighted Scatterplot Smoothing (LOWESS) regression to study genome signatures in Piedmontese and Italian Brown cattle breeds*, «Animal genetics».

MARRAS G., GASPA G., SORBOLINI S., DIMAURO C., AJMONE-MARSAN P., VALENTINI A., WILLIAMS J.L., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy*, «Animal Genetics», 46, pp. 110-121.

Articoli sottoposti alla valutazione (su Rivista internazionale)

SORBOLINI S., GASPA G., STERI R., DIMAURO C., CELLESI M., STELLA A., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Use of Canonical Discriminant Analysis to Study Selection Signatures in Cattle*, Submitted to PlosOne

Azione 2.3: Confronto degli effetti degli SNP sui fenotipi in diverse razze **Collaborazioni: Alessandra Stella, PTP.**

a) simulazione di due popolazioni bovine con caratteristiche simili a quelle della Bruna Italiana e Pezzata Rossa Italiana, lavoro al quale l'assegnista dott. Marcello Del Corvo ha partecipato.

b) Il modello genetico che si sta utilizzando per la creazione delle due popolazioni è quello di mutazione e deriva, con accoppiamento casuale e selezione naturale e artificiale. Queste forze sono applicate attraverso le generazioni in modo da mimare la storia evolutiva delle due razze Bruna Italiana e Pezzata Rossa Italiana.

c) L'obiettivo generale è stato quello di capire limiti e potenzialità di utilizzare per la stima degli effetti genomici delle due razze solo i dati entro razza, i dati di ambedue le razze.

Azione 2.4: Calcolo del valore genetico genomico dei singoli cromosomi e confronti fra razze.

Collaborazioni: ANA, UO LATTE UO CARNE

Sviluppo di un approccio multibreed per la stima dei valori genetici genomici in popolazioni miste basato sull'analisi delle componenti principali. Un articolo su rivista è stato pubblicato.

GASPA G., JORJANI H., DIMAURO C., CELLESI M., AJMONE-MARSAN P., STELLA A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Multiple-breed genomic evaluation by principal component analysis in small size populations*, «Animal», 9, pp. 738-749.

Azione 2.5: Studio matrici di covarianza genetica a livello cromosomico

Collaborazioni: USDA (John Cole), UO LATTE, UO CARNE

Prof. Macciotta e collaboratori hanno utilizzato un metodo basato sull'analisi fattoriale multivariata allo scopo di confrontare le matrici di correlazione genomica e cromosomiche. Una Comunicazione è stata presentata all'ADSA-ASAS 2013. e un Articolo su rivista.

Comunicazioni a Convegni e articoli su rivista

MACCIOTTA N.P.P., DIMAURO C., VICARIO D., NULL D.J., AND COLE J.B. (2013): *Dissection of genomic correlation matrices using multivariate factor analysis in dairy and dual-purpose cattle breeds*, Presentato a **ADSA-ASAS JOINT ANNUAL MEETING (INDIANAPOLIS 8-12 /07 /2013)**.

MACCIOTTA N.P.P., AJMONE MARSAN P., MILANESI M., VICARIO D., VALENTINI A., SORBOLINI S., DIMAURO C. (2015): *A comprehensive strategy for detecting genomic regions associated with traits of economic interest using information generated in genomic selection programmes*, Presentato al XXI Convegno ASPA Milano 2015.

Articoli su rivista

MACCIOTTA N.P.P., DIMAURO C., NULL D.J., GASPA G., CELLESI M. AND COLE J.B. (2015): *Dissection of genomic correlation matrices of US Holsteins using multivariate factor analysis*, «J. Anim. Breed. Genet.», 132, pp. 9-20.

Azione 2.6: Studio delle relazioni fra somiglianza genetica fra razze e accuratezza dei valori genetici genomici

vedi azione 2.4

WP 3: Calcolo dei valori genetici genomici nelle femmine delle razze bovine da latte allevate in Italia

Azione 3.1: Sviluppo di metodi di previsione del genotipo di mappe genetiche ad alta densità (54K SNPs) a partire da genotipi relative a un pannello di SNP a bassa densità basati sull'analisi statistica multivariata

Collaborazioni: UO LATTE (UNICATT)

Il Dott. Dimauro ha messo a punto di un sistema di *imputation* di genotipici mappe dense da 54 K a partire da mappe a bassa densità (7K) basato sulla Partial Least Squares regression in collaborazione con l'UO latte WP1.

Articolo su Rivista

DIMAURO C., CELLESI M., GASPA G., AIMONE-MARSAN P., STERI R., MARRAS G., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Use of the partial least squares regression approach to impute SNP genotypes in Italian Cattle breeds*, «Genetic Selection Evolution».

Azione 3.2: Studio delle relazioni fra accuratezza delle previsioni genomiche e rango delle matrici di covarianza degli SNP

Collaborazioni

Azione 3.3: Previsione dei valori genetici genomici con pannelli SNPs a bassa densità

Collaborazioni: ANA, UO LATTE (UNICATT)

Allo stato attuale si è condotto l'editing dei dati genotipici e fenotipici. È tuttora in corso le analisi per il calcolo dei DGV di bovine di PRI genotipizzate con il 7K.

Azione 3.4: Calcolo dei valori genetici genomici con l'utilizzo di fenotipi come variabile dipendente

Collaborazioni: ANA, UO LATTE (UNICATT)

Analisi tra associazione tra polimorfismi al singolo nucleotide e caratteristiche della curva di lattazione utilizzando i dati dei controlli giornalieri di bovine di razza PRI e pannelli a bassa densità (7k). Si è realizzato l'editing dei dati genotipici e fenotipici. È in corso lo l'analisi a livello genome-wide delle associazioni SNP/indicatori della persistenza di lattazione.

Articoli su Rivista

MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., BOMBA L., VICARIO D., DIMAURO C., CEL-

LESI M., AND AJMONE-MARSAN P. (2015): *Genome-wide association analysis in Italian Simmental cows for lactation curve traits using a low density (7K) SNP panel*, In press su «Journal of Dairy Science».

WP 4: Sviluppo di metodi per l'analisi di dati derivanti da mappe genetiche ad altissima densità e sequenziamento dell'intero genoma

In una situazione come quella italiana, nella quale oltre alle Associazioni Nazionali di razza esiste sia una Associazione Italiana Allevatori sia un'Anagrafe Nazionale Bovina, può trovare applicazione pratica una codifica di interscambio dei dati ricavati dai panel da 3k, 7k, 54k o 800k SNP che, per salvaguardare la proprietà degli stessi, li renda inutilizzabili ai fini di imputazioni e del calcolo del DGV, e ne preservi tuttavia l'utilità per l'identificazione degli animali (anche ai fini della tracciabilità) e per i test di parentela.

Azione 4.1: Simulazione di genotipi individuali ottenuti da mappe di SNPs ad alta densità (800K)

Collaborazioni:

a) In mancanza di un numero sufficiente di dati reali, la codifica sviluppata è stata verificata in tre simulazioni, ciascuna con 100'000 individui appartenenti a tre diverse razze con possibilità di incrocio, genotipizzati con diverse proporzioni di panel 3k, 7k, 54 k e 800k. La verifica, effettuata su 600'000 coppie genitore-figlio, ha dimostrato che la codifica è perfettamente valida per i test di parentela, e consente anche di distinguere i soggetti di razza pura dagli incroci.

b) Utilizzo di pannelli ad alta densità (800K) per la valutazione dell'accuratezza delle previsioni genomiche.

Comunicazioni a Convegni

GASPA G., MARRAS G., SORBOLINI S., AJMONE MARSAN P., WILLIAMS J.L., VALENTINI A., DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2014): *Genome-Wide Homozygosity in Italian Holstein Cattle using HD SNP Panel*, Presentato al 10th WCGALP, Vancouver, 17-22 Agosto 2014.

PULEDDA A., MILANESI M., GASPA G., DIMAURO C., AJMONE-MARSAN P., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Study of genomic prediction accuracy using High Density SNP panel in Italian Holstein cattle*, Presentato al XXI Convegno ASPA Milano 2015.

PULEDDA A., GASPA G., DIMAURO C., NICOLAZZI E.L., AJMONE-MARSAN

P., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Accuracy of genomic prediction using Principal Component Analysis on an Imputed High Density SNP panel in Italian Holstein cattle*, Presentato Abstract ADSA-ASAS 2015 Orlando.

Azione 4.2: Simulazione di genotipi individuali ottenuti da sequenziamento dell'intero genoma

Collaborazioni:

Studio della distribuzione del GC content e delle isocore nelle regioni genomiche del bovino in cui sono localizzati geni imprinted.

Azione 4.4: Simulazione di schemi di selezione genomica basati su 800K SNPs e sulla sequenza dell'intero genoma

Collaborazioni: UNIMI

Due strategie di valutazione genomica across-breed sono state valutate. Una ha previsto una fase di training su una razza geneticamente vicina (TS), e l'altra la fase di training su una popolazione mista (TM). Simulazione di 29 cromosomi, costruzione delle matrici di parentela genomica (TS e TM) e stima dei DGV mediante un modello BLUP.

WP 5: Consulenza alle altre unità operative coinvolte nel progetto

Azione 5.1: Assistenza nella predisposizione di piani di campionamento. collaborazione con

AZIONE CONCLUSA.

Collaborazioni: UO LATTE (UNICATT), ANA, CRSA.

a) Analisi dei dati di genotipizzazione e sequenziamento dell'esoma: in collaborazione con U.O. LATTE, CRSA e ANA

Azione 5.2 Sviluppo di modelli per lo studio di associazione fra SNPs localizzati in geni candidati e caratteri di interesse selettivo in varie specie (bovine, bufalina, ovina e caprina) allevate in Italia.

AZIONE CONCLUSA.

Collaborazioni: UNIMI, UNI "Federico II NA, UNIMO, UNITUS, ANA, ISILS

Analisi di associazione tra polimorfismi in geni del metabolismo lipidico e proteico e caratteri della produzione del latte nelle specie:

Caprina (collaborazione con la Prof. Crepaldi UNIMI)

Pubblicazione di un articolo su rivista relativo allo studio dell'associazione tra varianti di tre diversi geni su capre di razze alpine.

Articolo su rivista

CREPALDI P., NICOLOSO L., COIZET B., MILANESI E., PAGNACCO G., FRESI P., DIMAURO C., AND MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Associations of acetyl-coenzyme A carboxylase α , stearoyl-coenzyme A desaturase, and lipoprotein lipase genes with dairy traits in Alpine goats*, «J. Dairy Sci.», 96, pp. 1856-1864.

Bufalina (collaborazione prof. Ramunno UNI federico II)

Pubblicazione di un articolo su rivista relativo all'analisi di un polimorfismo nella regione del promotore dello Stearoyl-coA desaturasi in River Bufalo.

Abstract

MANCA M.G., COSENZA G., APICELLA E., PAUCIULLO A., COLETTA A., NUDDA A., MACCIOTTA N.P.P., ZICARELLI L., AND RAMUNNO L. (2015): *Survey of fatty acid profile of milk fat in Italian Water buffalo*, Presentato al XXI Convegno ASPA Milano.

Articoli su rivista

PAUCIULLO A., COSENZA G., STERI R., COLETTA A., LA BATTAGLIA A., DI BERARDINO D., MACCIOTTA N.P.P. AND RAMUNNO L. (2012): *A single nucleotide polymorphism in the promoter region of river buffalo stearoyl CoA desaturase gene (SCD) is associated with milk yield*, «Journal of Dairy Research», 79, pp. 429-435.

PAUCIULLO A., RAMUNNO L., MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., COLETTA A., APICELLA E., GALLO D. AND COSENZA G.: *Genetic variability detected at the lactoferrin locus (LTF) in the Italian Mediterranean river buffalo*, <http://dx.doi.org/10.1071/AN14612>

Ovina (collaborazione Prof. Pilla UNIMO)

Attraverso l'uso di modelli lineari misti e tecniche statistiche multivariate, si propone uno studio genome-wide di associazione tra polimorfismi al singolo nucleotide (SNP) e profilo acidico del latte (GWAS) di 190 pecore comisane utilizzando SNP chip (50K). Analisi della struttura genetica della popolazione oggetto studio (eterozigotà, Linkage disequilibrium, studio delle frequenze alleliche)

Comunicazioni a Congressi

GASPA G., D'ANDREA M., DIMAURO C., SORBOLINI S., MACCIOTTA N. AND PILLA F. *Genome-wide analysis of milk quality traits of comisana sheep by canonical discriminant analysis*. Abstract verrà presentato al ISAFG 2015, Piacenza, 26-28 Luglio 2015.

Bovina

(in collaborazione con il Prof. Umberto Bernabucci, UNITUS).

Studio di associazione fra polimorfismi al gene della heat shock protein e caratteri produttivi e morfologici della razza bovina Frisona

Abstract

BIFFANI S., BERNABUCCI U., LACETERA N., VITALI A., AJMONE-MARSAN P., MACCIOTTA N.P.P., NARDONE A. (2015): *A GWAS on heat tolerance phenotypes for Italian Holstein bulls*, Verrà presentato al JAM ADSA-ASAS 2015 Orlando 12-16 Luglio 2015.

(collaborazione Prof. Valentini UNITUS)

Analisi Genome-wide di associazione tra caratteri della produzione della carne e caratteristiche della carcassa con l'uso di mappe SNP ad alta densità (54K) nella razza bovina Marchigiana

Abstract ASPA

GASPA G., SORBOLINI S., DIMAURO C., CELLESI M., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Genomic Selection of Marchigiana Beef Traits*, Presentato al XXI Convegno ASPA Milano 2015.

Abstract

SORBOLINI S., GRUBER C., DIMAURO C., GASPA G., CELLESI M., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2014): *Genome-wide association analysis for beef traits in Marchigiana cattle breed*, Presentato al JAM ADSA-ASAS 2014 Kansas city.

Articolo su Rivista

SORBOLINI S., MARRAS G., GASPA G., DIMAURO C., CELLESI M., VALENTINI A., AND MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Detection of selection signatures in piemontese and marchigiana cattle, two breeds with similar production aptitudes but different selection histories*, «Genetics Selection Evolution», DOI 10.1186/s12711-015-0128-2

(collaborazione Dr Galli ISILS)

Studio della fertilità maschile mediante pannelli ad alta densità attraverso l'uso di modelli lineari misti. Analisi di associazione tra caratteri della fertilità maschile utilizzando pannelli di SNP ad alta densità (800K).

Azione 5.3 Sviluppo di modelli di selezione genomica per la specie suina
Collaborazione

Azione 5.4 Assistenza alle ANA per il trattamento dei dati delle genotipizzazioni ad alta densità e il calcolo dei valori genetici genomici

AZIONE CONCLUSA.

Collaborazioni: ANA

Nell'ambito delle attività di consulenza e assistenza alle Associazioni Allevatori, con la supervisione del prof. Gustavo Gandini è stato sviluppato un documento sul controllo della consanguineità in selezione, anche basato sul lavoro precedentemente svolto in ambito SELMOL

[SEZIONE 10.3 ALLEGATO 7]

Descrizione delle interazioni tra le UUOO partecipanti, eventuali collaborazioni esterne e imprese

WP	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Ottimizzazione metodi di previsione valori genetici genomici (GEBV) nelle razze bovine allevate in Italia								
Azione 1.1								
Azione 1.2								
Azione 1.3								
Azione 1.4								
Azione 1.5								
Calcolo dei valori genetici genomici multibreed nelle razze bovine allevate in Italia								
Azione 2.1								
Azione 2.2								
Azione 2.3								
Azione 2.4								
Azione 2.5								
Azione 2.6								
Calcolo dei valori genetici genomici nelle femmine delle razze bovine da latte allevate in Italia								
Azione 3.1								
Azione 3.2								
Azione 3.3								
Azione 3.4								
Sviluppo di metodi per l'analisi di dati derivanti da mappe genetiche ad altissima densità e sequenziamento dell'intero genoma								
Azione 4.1								
Azione 4.2								
Azione 4.3								
Consulenza alle altre unità operative coinvolte nel progetto								
Azione 5.1								
Azione 5.2								
Azione 5.3								
Azione 5.4								

Cronogramma del progetto e interazioni (trimestri)

Formazione e aggiornamento dell'organizzazione degli allevatori in relazione agli strumenti di genetica molecolare nella selezione zootecnica

Responsabile Scientifico:

Giulio Pagnacco*

(Prof. Paola Crepaldi*, Dr. Bianca Castiglioni°, Dr. Stefania Chessa°, Dr. Letizia Nicoloso*)

* *UNIMI, Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità pubblica*

° *CNR, Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria*

L'UO Formazione del Progetto INNOVAGEN si è impegnata come previsto nelle iniziative di promozione culturale e informazione circa le prospettive future di selezione basata anche su strumenti molecolari e in generale genomici.

L'attività si è concentrata principalmente su due iniziative maggiori che, come comunicato fin dall'inizio delle attività, andavano a modificare in senso ovviamente migliorativo quanto originariamente descritto dal piano operativo dell'unità.

SCHEDE

Con lo scopo di trasmettere a un pubblico più ampio possibile i concetti di base che stanno all'origine della valutazione genomica dei tori, l'UO ha prodotto 12 schede tecniche di otto facciate l'una che sono state nel tempo pubblicate sulla rivista L'Allevatore Magazine. Si tratta di una rivista quindicinale che trova un'ampia diffusione presso gli allevatori di tutte le specie e razze e che ha avuto nel periodo considerato una tiratura media di circa 39.000 copie. La larga diffusione dovrebbero garantire un accesso capillare a queste nozioni da parte di un numero realmente ampio di operatori zootecnici.

Nella tabella 1 sono riportate le indicazioni bibliografiche delle schede che nelle ultime due uscite hanno sinteticamente riportato i più importanti risultati scientifici e tecnici del progetto con attenzione all'utilità e potenzialità applicative dei risultati.

N	ANNO	N	DATA	ARGOMENTO
1	LXIX	8	24-apr-13	Alla scoperta del DNA e delle potenzialità della genetica molecolare
2	LXIX	10	29-mag-13	I segreti del DNA
3	LXIX	12	26-giu-13	Alleli e variabilità nelle popolazioni
4	LXIX	15	07-ago-13	Parentele classiche e consanguineità
5	LXIX	17	02-ott-13	Analisi simultanea di più regioni del genoma
6	LXIX	19	20-nov-13	Effetto di un gene sulle produzioni
7	LXX	3	19-feb-14	Progetti di sequenziamento, milioni di marcatori
8	LXX	5	19-mar-14	Tracciabilità genetica
9	LXX	8	14-mag-14	Indice di selezione
10	LXX	19	03-dic-14	Indici aggregati e indice genomico
11	LXXI	3	11-feb-15	I risultati del progetto I parte
12	LXXI	5	11-mar 15	I risultati del progetto II parte

Tab .1 Schede degli argomenti divulgati



Gli argomenti sono stati presentati in una forma il più possibile accessibile a un pubblico con una preparazione non strettamente scientifica ma attento alle problematiche discusse. Lo scopo era di guidare senza spaventare il lettore attraverso le problematiche e la comprensione di cosa sia il genoma, di come funzioni, e di come agisca la selezione che utilizza i più moderni strumenti disponibili per accelerare il raggiungimento dei suoi obiettivi.

I testi hanno la struttura di un articolo principale seguito e affiancato da approfondimenti destinati ai lettori più curiosi. Ogni scheda è anche corredata da immagini e illustrazioni per rendere meglio comprensibile l'argomento trattato.

Le 12 schede possono essere agevolmente scaricate dal sito:

<http://www.divet.unimi.it/ecm/home/ricerca/altri-progetti/innovagen>

e se stampate, possono costituire una vera e propria piccola dispensa di circa 100 pagine. Un vero “bigino” della problematica.



FILMATO

La seconda iniziativa maggiore dell'UO è stata la realizzazione di un filmato di genere *noire*. L'idea di base è che nella realtà odierna l'immagine è tutto. Cattura l'attenzione anche dei più distratti, non impegna troppo pesantemente la riflessione e lascia tracce più vive di uno studio a tavolino. Per divulgare le potenzialità che sono nascoste nel DNA, i ricercatori dell'UO hanno realizzato una *docufiction* dal titolo "Identità nascoste" per parlare di genetica molecolare sotto forma di film giallo. Ambientazione agreste, una stalla di Frisone come location, qualche volto noto del mondo universitario come "special guest" e la voglia di allargare i confini della ricerca, invogliando il maggior numero di persone a studiare una materia affascinante e dalle potenzialità infinite. Perché anche la genomica, se interpretata bene, è un vero spettacolo. Il filmato può essere visionato accedendo al sito You Tube sempre partendo dallo stesso link prima indicato del Dipartimento DIVET.

Il filmato, di 26 minuti, è stato realizzato con attori professionisti e alcune scene sono girate presso LGS di Cremona e la stalla sperimentale dell'Ateneo di Landriano (PV).

Corso INNOVAGEN

Gennaio 2013 Piacenza
Giulio Pagnacco

STATISTICHE DI BASE (formule)

Media della popolazione = $\mu = E(y_i)$

È nota a priori senza errore

Media campionaria = $\bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$

Basata su un campione di N osservazioni

Devianza campionaria = $\sum (y_i - \bar{y})^2$

Formula base da non utilizzare a causa delle approssimazioni di calcolo che vengono invece è la seguente formula equivalente composta da una somma di quadrati meno: (T^2/N) . Se le y sono centrate intorno allo zero il termine di correzione è pari a zero.

Devianza = $\sum y_i^2 - \frac{(\sum y)^2}{N}$

Oltre alle due iniziative maggiori sopra descritte l'UO ha anche dato un contributo pratico e ideativo alle iniziative in cui si ravvisava la necessità di promuovere la formazione e l'aggiornamento con i più disparati strumenti. Di seguito una breve descrizione di altre due iniziative minori dell'UO.

ATTIVITÀ FORMATIVA PRESSO LA FIERA DI CREMONA (OTTOBRE 2012)

L'UO si è cimentata, durante le giornate della Fiera di Cremona del bovino da latte del 2012, in una attività di illustrazione pratica e quasi ludica del concreto significato di indice genomico. In particolare è stato allestito presso lo stand AIA un gioco basato sull'estrazione da tre vasi di due palline colorate per vaso. La distribuzione delle palline (i due alleli a 3 diversi loci) e gli effetti genetici associati a ciascuna di queste, consentiva con una semplice somma di calcolare il valore genomico del toro di cui veniva in questo modo rappresentato il genotipo o l'indice genomico. Ogni estrazione contribuiva a riempire una tabella che illustrava sotto forma di distribuzione di frequenza la rarità di alcune combinazioni e la difficoltà di centrare una combinazione genetica ottimale. Lo stand è stato allegramente frequentato da allevatori e anche da scolaresche che avevano in questo modo una prima esposizione ai più rudimentali concetti di genetica, genomica e indice di selezione.

ATTIVITÀ FORMATIVA PRESSO L'UNIVERSITÀ CATTOLICA DI PIACENZA
(GENNAIO 2012)

Nell'ambito del Progetto INNOVAGEN hanno operato e si sono formati numerosi giovani, ricercatori e personale reclutato per lo sviluppo delle attività progettuali. L'Università Cattolica di Piacenza, nell'ambito del Progetto ha attivato corsi di formazione cui l'UO ha partecipato sia con allievi che con una attività didattica e formativa su specifiche tematiche di statistica e modellizzazione delle produzioni animali. Per l'occasione è stata anche prodotta una breve dispensa sugli argomenti trattati.

LOGO DI PROGETTO

L'UO Formazione ha anche messo a punto il logo di Progetto.



Logo che sottolinea la continuità col precedente Progetto SELMOL.

Gestione rapporti con le ANA

Responsabile Scientifico:
Riccardo Negrini, *CRSA*

Il progetto INNOVAGEN nasce come naturale prosecuzione del progetto SELMOL con l'obiettivo precipuo di approfondirne i risultati scientifici e di completare il trasferimento in campo delle acquisizioni tecniche già acquisite integrando le conoscenze di genetica molecolare con quelle pratico-operative sulla selezione animale.

Date le peculiarità degli obiettivi e soprattutto il taglio prettamente applicativo e di trasferimento tecnologico, nel progetto INNOVAGEN è stata prevista una specifica unità operativa con l'incarico di facilitare il flusso delle informazioni tra le varie componenti e Unità operative del progetto: Università, Associazioni Nazionali di razza, Uffici periferici dell'Associazione Nazionale Allevatori, Enti di Ricerca etc.. Il fine è quello di agevolare lo svolgimento delle attività e il raggiungimento degli obiettivi rispettando le tempistiche previste.

Questo compito è stato affidato al CRSA (Centro di Ricerca e Sperimentazione degli Allevatori) che si è fatta carico) della logistica del campionamento, fase critica di ogni ricerca, agevolando il reperimento dei campioni biologici e la loro gestione, ii) del reperimento delle informazioni fenotipiche e genealogiche necessarie agli studi di associazione e di tutte le informazioni necessarie allo svolgimento della ricerca; iii) dell'organizzazione e del trasferimento dei dati molecolari dai laboratori alle U.O. di riferimento.

Il beneficio di un monitoraggio diretto dei flussi di informazione ha impattato in maniera più che positiva l'intero svolgimento del progetto e in particolare ha permesso di ottenere una elevata qualità delle informazioni trasferite raccolte dal campo e la robustezza delle analisi statistiche.

Data la peculiare di questo WP, le sue attività sono state completamente trasversali nel progetto, interessando tutte le specie e gli indirizzi produttivi

oggetto di ricerca (bovini, ovicapri, bufali, suini e cavalli) e tutti le U.O. operative coinvolte.

L'U.O. CRSA è stata coordinata dal dott. Riccardo Negrini (Direttore tecnico dell'Associazione Italiana Allevatori) in collaborazione con il dott. Raffaele Mazza, coordinatore del Laboratorio Genetica e Servizi dell'Associazione Italiana Allevatori

L'U.O. si è avvalsa anche della collaborazione di personale assunto specificatamente dal progetto. In particolare U.O. ha bandito una borsa di studio per un laureato con esperienza nella genetica quantitativa e molecolare e con capacità di calcolo e gestione dei dati.

È risultato vincitore della procedura di assegnazione della borsa di studio è stato il dott. Ezequiel Luis Nicolazzi, impiegato poi a tempo pieno nelle attività del progetto. Nel corso del 2012, il dott. Nicolazzi è stato sostituito, sempre attraverso un bando di concorso dal dott. Nicola Bacciu che ha proseguito nelle attività intraprese l'anno precedente.

Di seguito viene riportata una sintesi delle attività svolte nel progetto confrontando gli obiettivi raggiunti con le milestone stabilite in sede di progettazione e i task assegnati.

In particolare CRSA è stato responsabile di tre Work-package ciascuno composto da uno o più task:

WP1: Logistica del campionamento, gestione dei campioni biologici e analisi molecolari

Task

- a. Supporto logistico scelta delle razze e campionamento materiale biologico
- b. Organizzazione dei campioni biologici e delle analisi molecolari
- c. Creazione di una bio-banca dei campioni biologici

WP2: Coordinamento del flusso delle informazioni da e verso le ANA

Task

2.1 Gestione flusso delle informazioni fenotipiche dalle ANA alle UO interessate

2.2 Gestione del flusso dei risultati delle genotipizzazioni verso le U.O. interessate

WP3: Trasferimento dei risultati

Task

3.1 Trasferimento al sistema allevatorio dei risultati della ricerca e delle informazioni necessarie per comprenderne le opportunità di applicazione

Nel corso del progetto, CRSA ha raccolto e reso fruibili tutte le informazioni necessarie per ottimizzare la campagna di campionamento biologico, e in particolare la localizzazione degli animali, la disponibilità di materiale biologico campionato già prelevato in momenti precedenti per altri scopi ed eventualmente di DNA utilizzato in progetti già conclusi.

La collaborazione totale tra ANA – LGS e CRSA ha permesso di avere informazioni circa i campioni biologici disponibili (e d'interesse anche per le ANA) in tempi molto brevi. Inoltre CRSA ha operato come interfaccia tra i partner scientifici e le Nazionali per veicolare le richieste di queste ultime e meglio direzionare gli sforzi verso obiettivi di loro interesse. Per comprendere la specificità delle richieste pervenute a CRSA, basti considerare i seguenti esempi: mentre le associazioni di Frisona e Bruna Italiana hanno preferito la genotipizzazione di animali maschi con chip ad alta densità (HD), la Pezzata Rossa ha deciso di genotipizzare le femmine con il chip a bassa densità (LD). L'unità operativa che elaborerà i dati genomici di capre ha scelto di genotipizzare i propri animali con uno SNPchip innovativo, non ancora in commercio.

- Più in dettaglio CRSA ha coordinato, organizzato e supervisionato il campionamento di materiale biologico per la genotipizzazione che ha interessato
- 500 tori di razza Frisona Italiana: La scelta dei campioni è stata fatta in coordinamento e collaborazione con U.O. Fertilità. I campioni genotipizzati dall'U.O. Latte sono stati selezionati nelle code degli EBV di proteina Kg, SCS, indice fertilità e longevità funzionale mentre i campioni genotipizzati dall'U.O. Fertilità sono stati selezionati per caratteri legati alla fertilità maschile.
 - 200 vacche di razza Bruna Italiana: La scelta dei campioni è stata fatta in collaborazione con l'associazione nazionale allevatori razza bruna italiana (ANARB). I campioni selezionati appartengono alle code della distribuzione di almeno 3 dei 5 caratteri considerati: percentuale di grasso, percentuale di proteina, mammella, longevità morfologica e punteggio finale.
 - 100 vacche di razza Pezzata Rossa Italiana. La scelta dei campioni è stata fatta in collaborazione con l'associazione nazionale allevatori pezzata rossa italiana (ANAPRI). I campioni sono stati selezionati per un EBV/fenotipo estremo per un carattere a elevata ereditabilità per la produzione di latte.

Inoltre il CRSA ha coordinato e finanziato il campionamento e la genotipizzazione con il chip a bassa densità di circa 1600 femmine della popolazione di Frisona Italiana, 1000 della popolazione di Bruna e 400 della popolazione di Pezzata Rossa con lo scopo di effettuare il recupero e la conversione

di una parte delle informazioni contenute nel database storico dei genotipi molecolari conservato e gestito in LGS agevolando così l'entrata in vigore delle nuove metodiche basate sugli SNP.

A questa attività si è aggiunto il supporto per la scelta dei soggetti da inviare al sequenziamento dell'esoma [vedi relazione U.O. latte bovino] e anche in questo caso i criteri di scelta non sono stati univoci ma hanno tenuto conto delle necessità delle singole Associazioni Nazionali di Razza:

- Frisone Italiana: individuati 24 tori con relazioni minime di parentela, rappresentativi della razza ed estremi per gli indici di fertilità maschile e/o femminile e con minima
- Bruna Italiana: individuati 8 tori in collaborazione con ANARB con parentela minimizzata, rappresentativi della razza ed estremi per Kg di proteine.
- Pezzata Rossa Italiana: individuati 8 tori in collaborazione con ANAPRI. con parentela minimizzata, rappresentativi della razza. 4 sono estremi positivi per la produzione di latte e contemporaneamente estremi negativi per la produzione di carne e i restanti positivi per carne e negativi per latte.

Una volta scelti gli animali, CRSA ha gestito il prelievo di materiale biologico o il recupero del materiale già presente presso la banca del DNA del laboratorio o banche di materiale biologico residenti presso le Associazioni Nazionali e poi l'invio ai laboratori incaricati delle analisi e fornendo una tracciabilità completa dell'intero processo fino alla genotipizzazione, all'invio dei risultati di laboratorio e allo stoccaggio dei campioni nella banca biologica.

L'U.O. CRSA si è occupata anche della logistica, della scelta dei soggetti e del reperimento in collaborazione con l'Associazione Italiana Allevatori provincia di Brescia dei campioni di latte necessari per stima di un indice genetico di caseificabilità obiettivo della U.O. guidata dalla prof. Caroli (Brescia).

In particolare sono stati presi contatti con l'ufficio periferico di Brescia dell'Associazione Italiana Allevatori, acquisiti i dati dei controlli funzionali per la verifica dei soggetti in lattazione e identificate le aziende e i soggetti da campionare.

Il criterio per la scelta dei soggetti è stato la massimizzazione del numero di figlie di ogni singolo toro la contemporanea minimizzazione del numeri di aziende da visitare.

In dettaglio dai dati dei controlli funzionali effettuati nelle aziende della provincia di Brescia, sono state scelte 1055 bovine, figlie di toro, presenti in 16 allevamenti. Da questo dataset sono stati selezionati 19 tori con almeno 20 figlie, 36 tori con almeno 10 figlie e 52 tori con almeno 5 figlie.

Sempre in collaborazione con l'Ufficio Periferico di Brescia sono stati prelevati circa un migliaio di campioni di latte congelati a -20 °C e destinati ai vari laboratori in carico delle analisi di laboratorio.

CRSA attraverso il Laboratorio Genetica e servizi di Cremona ha anche gestito direttamente la genotipizzazione di campioni di bovini, ovini e caprini con chip Illumina.

In particolare, sono state eseguite circa 3200 analisi 3k e 300 analisi LD di vacche, 500 analisi HD e 35 analisi 54K di tori, 336 analisi chip ovino e 336 analisi chip caprino. I dati di genotipizzazione sono stati trasferiti alle rispettive unità operative di competenza e alle associazioni nazionali di razza per la loro trasformazione in informazioni utili al miglioramento genetico.

Il CRSA ha anche svolto attività di divulgazione sia mettendo a disposizione del progetto la rivista L'Allevatore che raggiunge oltre le 30000 copie per la diffusione di articoli specifici prodotti dalle varie unità del Progetto e in particolare dell'Unità Formazione, sia con attività propria di informazione svolta in riunioni e convegni con allevatori e operatori del sistema.

Pubblicazioni su riviste internazionali

1. ACHILLI A., OLIVIERI A., SOARES P., LANCIONI H., HOOSHIAR KASHANI B., PEREGO U.A., NERGADZE S.G., CAROSSA V., SANTAGOSTINO M., CAPOMACCIO S., FELICETTI M., AL-ACHKAR W., PENEDO M.C., VERINI-SUPPLIZI A., HOUSHMAND M., WOODWARD S.R., SEMINO O., SILVESTRELLI M., GIULOTTO E., PEREIRA L., BANDELT H.J., TORRONI A. (2012): *Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication*, «Proc Natl Acad Sci», USA, Feb 14, 109 (7), pp. 2449-54. Epub 2012 Jan 30.
2. CAPOMACCIO S., MILANESI M., BOMBA L., VAJANA E., AND AJMONE-MARSAN P. (2015): *MUGBAS: a species free gene-based programme suite for post-GWAS analysis*, «Bioinformatics», 31, pp. 2380-1. doi:10.1093/bioinformatics/btv144.
3. MINOZZI G., NICOLAZZI E.L., STROZZI F., STELLA A., NEGRINI R., AJMONE-MARSAN P., AND WILLIAMS J.L. (2011): *Genome wide scan for somatic cell counts in holstein bulls*, «BMC Proc.», 5, Suppl 4, S17. doi:10.1186/1753-6561-5-S4-S17.
4. BASIRICÒ L., CATALANI E., MORERA P., CATTANEO S., STUKNYTÈ M., BERNABUCCI U., DE NONI I., NARDONE A. (2015): *Release of ACE-inhibitor Peptides during in vitro Gastrointestinal Digestion of Parmigiano Reggiano PDO Cheese and their Absorption through an in vitro Model of Intestinal Epithelium*, «J. Dairy Sci. J.», 98, pp. 7595-7601.
5. BERNABUCCI U., CATALANI E., BASIRICÒ L., MORERA P. AND NARDONE A. (2014): *In vitro ACE inhibitory activity and in vivo antihypertensive effects of water-soluble extract by Prmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses*, «Int. Dairy J.», 37, pp. 16-19.
6. TULIPANO G., FAGGI A., NARDONE A., COCCHI D., CAROLI A.M. (2015): *Characterisation of the potential of β -lactoglobulin and α -lactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function: In silico and in vitro comparative studies*, «International Dairy Journal», <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.008>.
7. MARRAS G., GASPA G., SORBOLINI S., DIMAURO C., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., WILLIAMS JOHN L., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy*, «Animal genetics», 46 (2), pp. 110-121.
8. GASPA G., PINTUS M.A., NICOLAZZI E.L., VICARIO D., VALENTINI A., DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Use of principal component approach to predict direct genom-*

- ic breeding values for beef traits in Italian Simmental cattle*, «Journal of animal science», 91 (1), pp. 29-37.
9. MANCINI G., GARGANI M., CHILLEMI G., NICOLAZZI E.L., MARSAN P.A., VALENTINI A., AND PARISET L. (2014): *Signatures of Selection in Five Italian Cattle Breeds Detected by a 54K SNP Panel*, «Molecular Biology Reports», 41 (2), pp. 957-65.
 10. GASPA G., PINTUS M.A., NICOLAZZI E.L., VICARIO D., VALENTINI A., DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Use of Principal Component approach to predict Direct Genomic Breeding Values for Beef Traits in Italian Simmental Cattle*, «J Anim Science», 91, pp. 29-37.
 11. SORBOLINI S., MARRAS G., GASPA G., DIMAURO C., CELLESI M., VALENTINI A., AND MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Detection of selection signatures in piemontese and marchigiana cattle, two breeds with similar production aptitudes but different selection histories*, «Genetics Selection Evolution», DOI 10.1186/s12711-015-0128-2.
 12. VANRADEN P.M., NULL D.J., SARGOLZAEI M., WIGGANS G.R., TOOKER M.E., COLE J.B., SONSTEGARD T.S. ET AL. (2013): *Genomic Imputation and Evaluation Using High-Density Holstein Genotypes*, «Journal of Dairy Science», 96 (1), pp. 668-78.
 13. CHessa S., NICOLAZZI E.L., NICOLoso L., NEGRINI R., MARINO R., VICARIO D., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., AND STEFANON B. (2015): *Analysis of Candidate SNPs Affecting Milk and Functional Traits in the Dual-Purpose Italian Simmental Cattle*, «Livestock Science», 173 (March), pp. 1-8.
 14. PINTUS E., SORBOLINI S., ALBERA A., GASPA G., DIMAURO C., STERI R., MARRAS G. AND MACCIOTTA N.P.P. (2014): *Use of locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS) regression to study selection signatures in Piedmontese and Italian Brown cattle breeds*, «Animal Genetics», 45, pp. 1-11.
 15. CICCONARDI F., CHILLEMI G., TRAMONTANO A., MARCHITELLI C., VALENTINI A., AJMONE-MARSAN P., AND NARDONE A. (2013): *Massive Screening of Copy Number Population-Scale Variation in Bos Taurus Genome*, «BMC Genomics», 14 (1).
 16. BONGIORNI S., MANCINI G., CHILLEMI G., PARISET L., AND VALENTINI A. (2012): *Identification of a Short Region on Chromosome 6 Affecting Direct Calving Ease in Piedmontese Cattle Breed*, «PLoS ONE», 7 (12).
 17. SORBOLINI S., GASPA G., STERI R., DIMAURO C., CELLESI M., STELLA A., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Use of Canonical Discriminant Analysis to Study Selection Signatures in Cattle*, Submitted to «PlosOne».
 18. CREPALDI P., NICOLoso L., COIZET B., MILANESI E., PAGNACCO G., FRESI P., DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Association of acetyl coenzyma A carboxylase alpha, stearyl coenzyme A desaturase and lipoprotein lipase genes with dairy traits in Alpine goats*. «J. Dairy Science», 96, pp. 1856-1864.
 19. AJMONE-MARSAN P., COLLI L., HAN J.L., ACHILLI A., LANCIONI H., JOOST S., CREPALDI P., PILLA F., STELLA A., TABERLET P., BOETTCHER P., NEGRINI R., LENSTRA J. A., ITALIAN GOAT CONSORTIUM, ECONOGENE CONSORTIUM, GLOBALDIV CONSORTIUM (2014): *The characterization of goat genetic diversity: towards a genomic approach*, «Small Ruminant Research», 121, 1, pp. 58-72.
 20. NICOLoso L., BOMBA L., COLLI L., NEGRINI R., MILANESI M., MAZZA R., SECHI T., FRATTINI S., TALENTI A., COIZET B., CHessa S., MARLETTA D., D'ANDRA M., BORDONARO S., PTAK G., CARTA A., PAGNACCO G., VALENTINI A., PILLA F., AJMONE MARSAN P., CREPALDI P. AND THE ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2015): *Genetic diversity of italian goat breeds assessed with a medium density SNP chip*, «Genetic Selection Evolution», Near Accepted.

21. BOMBA L., NICOLAZZI E.L., MILANESI M., NEGRINI R., MANCINI G., BISCARINI F., STELLA A., VALENTINI A. AND AJMONE-MARSAN P. (2015): *Relative extended haplotype homozygosity signals across breeds reveal dairy and beef specific signatures of selection*, «Genetics Selection Evolution», 47, p. 25.
22. BULGARI O., CAROLI A.M., CHESSA S., RIZZI R., AND GIGLIOTTI C. (2013): *Variation of Vitamin D in Cow's Milk and Interaction with β -Lactoglobulin*, «Molecules», 18, pp. 10122-10131.
23. CAPOMACCIO S., MILANESI M., BOMBA L., CAPPELLI K., NICOLAZZI EL, WILLIAMS JL, AJMONE-MARSAN P, STEFANON B. (2015a): *Searching new signals for production traits through gene-based association analysis in three Italian cattle breeds*, «Anim Genet.», May 22. doi: 10.1111/age.12303. [Epub ahead of print]
24. CAPOMACCIO S., MILANESI M., BOMBA L., VAJANA E., AJMONE-MARSAN P. (2015b): *MUGBAS: a species free gene-based programme suite for post-GWAS analysis*, «Bioinformatics», Mar 11. pii: btv144. [Epub ahead of print]
25. CHESSA S., BULGARI O., ROSSONI A., CERIOTTI G., CAROLI A. M. (2013): *Bovine β -casein: detection of two single nucleotide polymorphisms by bidirectional allele specific polymerase chain reaction (BAS-PCR) and monitoring of their variation*, «Open Journal of Animal Science», 3, pp. 36-41.
26. CHESSA S., BULGARI O., RIZZI R., CALAMARI L., BANI P., BIFFANI S., AND CAROLI A.M. (2014): *Selection for milk coagulation properties predicted by Fourier transform infrared spectroscopy in the Italian Holstein-Friesian breed*, «J. Dairy Sci.».
27. CICONARDI F., CHILLEMI G., TRAMONTANO A., MARCHITELLI C., VALENTINI A., AJMONE-MARSAN P, NARDONE A. (2013): *Massive screening of copy number population-scale variation in Bos taurus genome*, «BMC Genomics», 14 (1), art. no. 124.
28. DIMAURO C., CELLESI M., GASPA G., AJMONE-MARSAN P, STERI R., MARRAS G., MACCIOTTA N.P.P. (2013): *Use of partial least squares regression to impute SNP genotypes in Italian Cattle breeds*, «Genetics Selection Evolution», 45 (1), art. no. 15.
29. FONTANESI L., CALÒ D.G., GALIMBERTI G., NEGRINI R., MARINO R., NARDONE A., AJMONE-MARSAN P, RUSSO V. (2014): *A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle*, «Anim Genet.», Aug; 45 (4), pp. 576-80.
30. GASPA G., JORJANI H., DIMAURO C., CELLESI M., AJMONE-MARSAN P, STELLA A. AND N.P.P. MACCIOTTA (2015): *Multiple-breed genomic evaluation by principal component analysis in small size populations*, «Animal», 9, pp. 738-749.
31. MANCINI G., GARGANI M., CHILLEMI G., NICOLAZZI E.L., AJMONE MARSAN P, VALENTINI A., AND PARISSET L. (2014): *Signatures of selection in five Italian cattle breeds detected by a 54K SNP panel*, «Mol. Biol. Rep.», 41, pp. 957-965.
32. MANCINI G., NICOLAZZI E.L., VALENTINI A., CHILLEMI G., AJMONE MARSAN P, SANTUS E., AND PARISSET L. (2013): *Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and milk production traits in Italian Brown cattle*, «Livest. Sci.», 157, pp. 93-99.
33. MARRAS G., GASPA G., SORBOLINI S., DIMAURO C., AJMONE-MARSAN P, VALENTINI A., WILLIAMS J.L., MACCIOTTA N.P. (2015): *Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy*, «Anim Genet.», 46, pp. 110-121.
34. MCCLURE M., KIM E., BICKHART D., NULL D., COOPER T., COLE J., WIGGANS G., AJMONE-MARSAN P, COLLI L., SANTUS E., LIU GE., SCHROEDER S., MATUKUMALLI L., VAN TASSELL C., SONSTEGARD T. (2014): *Fine mapping for Weaver syndrome in*

- Brown Swiss cattle and the identification of 41 concordant mutations across NRCAM, PNPLA8 and CTTNBP2*, «PLoS One», 2013, 8(3):e59251.
35. MILANESI M., VICARIO D., STELLA A., VALENTINI A., AJMONE-MARSAN P., BIFFANI S., BISCARINI F. (2014): *Imputation accuracy is robust to cattle reference genome updates*, «Animal Genetics», doi: 10.1111/age.12251.
 36. MINOZZI G., NICOLAZZI E.L., STROZZI F., STELLA A., NEGRINI R., AJMONE-MARSAN P., WILLIAMS J.L. (2011): *Genome wide scan for somatic cell counts in holstein bulls*, «BMC Proc.», 5 (Suppl 4): S17.
 37. MINOZZI G., NICOLAZZI E.L., STELLA A., BIFFANI S., NEGRINI R., LAZZARI B., AJMONE-MARSAN P., AND WILLIAMS J.L. (2013): *Genome Wide Analysis of Fertility and Production Traits in Italian Holstein Cattle*, «PLoS ONE», 8.
 38. NICOLAZZI E.L., BIFFANI S. & JANSEN G. (2013): *Short communication: imputing genotypes using PedImpute fast algorithm combining pedigree and population information*, «Journal of Dairy Science», 96, pp. 2649-53.
 39. NICOLOSO L., CREPALDI P., MAZZA R., AJMONE-MARSAN P., NEGRINI R. (2013): *Recent advance in DNA-based traceability and authentication of livestock meat PDO and PGI products*, «Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture», 5 (1), pp. 9-18.
 40. PINTUS E., SORBOLINI S., ALBERA A., GASPA G., DIMAURO C., STERI R., MARRAS G., AND MACCIOTTA N.P.P. (2014): *Use of locally weighted scatterplot smoothing (LOWESS) regression to study selection signatures in Piedmontese and Italian Brown cattle breeds*, «Anim. Genet.», 45, pp. 1-11.
 41. PINTUS M.A., GASPA G., NICOLAZZI E.L., VICARIO D., ROSSONI A., AJMONE-MARSAN P., NARDONE A., DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2012): *Prediction of genomic breeding values for dairy traits in Italian Brown and Simmental bulls using a principal component approach*, «Journal of Dairy Science», 95 (6), pp. 3390-3400.
 42. VANRADEN P.M., NULL D.J., SARGOLZAEI M., WIGGANS G.R., TOOKER M.E., COLE J.B., SONSTEGARD T.S., CONNOR E.E., WINTERS M., VAN KAAM J.B., VALENTINI A., VAN DOORMAAL B.J., FAUST M.A., DOAK G.A. (2013): *Genomic imputation and evaluation using high-density Holstein genotypes*, «J Dairy Sci.», Jan, 96 (1), pp. 668-78.
 43. FONTANESI L., SCOTTI E., RUSSO V. (2012): *Haplotype variability in the bovine MITF gene and association with piebaldism in Holstein and Simmental cattle breeds*, «Animal Genetics», 43, pp. 250-256.
 44. BERTOLINI F., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCHIAVO G., MATASSINO D., FONTANESI L. (2015): *Combined use of principal component analysis and random forests identify population-informative single nucleotide polymorphisms: application in cattle breeds*, «Journal of Animal Breeding and Genetics», in press. doi: 10.1111/jbg.12155.
 45. FONTANESI L., RIBANI A., SCOTTI E., UTZERI V.J., VELIČKOVIĆ N., DALL'OLIO S. (2014): *Differentiation of meat from European wild boars and domestic pigs using polymorphisms in the MC1R and NR6A1 genes*, «Meat Science», 98, pp. 781-784.
 46. BERTOLINI F., GHIONDA M.C., D'ALESSANDRO E., GERACI C., CHIOFALO V., FONTANESI L. (2015): *A next generation semiconductor based sequencing approach for the identification of meat species in DNA mixtures*, «PLoS One», 10, e0121701.
 47. COSENZA G., PAUCIULLO A., MACCIOTTA N.P.P., APICELLA E., STERI R., LA BATTAGLIA A., JEMMA L., COLETTA A., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2014): *Mediterranean River Buffalo CSN1S1 gene: search for polymorphisms and association studies*, «Animal Production Science», <http://dx.doi.org/10.1071/AN13438>, published online 20 May 2014 ISSN: 1836-0939
 48. PAUCIULLO A., PERUCATTI A., COSENZA G., IANNUZZI A., INCARNATO D., GENUALDO

- V., DI BERARDINO D., IANNUZZI L. (2014): *Sequential cross-species chromosome painting among river buffalo, cattle, sheep and goat: a useful tool for chromosome abnormalities diagnosis within the family Bovidae*, «Plos One», ISSN: 1932-6203, Volume 9, Issue 10, e110297 doi:10.1371/journal.pone.0110297.
49. PAUCIULLO A., RAMUNNO L., MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., COLETTA A., APICELLA E., GALLO D., COSENZA G. (2015): *Genetic variability detected at the lactoferrin locus (LTF) in the Italian Mediterranean river buffalo*, «Animal Production Science», ISSN: 1836-0939 published online 18 February 2015 <http://dx.doi.org/10.1071/AN14612>
 50. RAMUNNO L., MACCIOTTA N.P.P., COLETTA A., GALLO D., COSENZA G. (2015): *Genetic variability at OXTR gene and association studies with buffalo milk traits*, «Journal of Dairy Science», submitted.
 51. FONTANESI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., FRONZA R., MARTELLI P.L., SCOTTI E., COLOMBO M., SCHIAVO G., CASADIO R., BUTTAZZONI L., RUSSO V. (2012): *Identification and association analysis of several hundred single nucleotide polymorphisms within candidate genes for backfat thickness in Italian Large White pigs using a selective genotyping approach*, «Journal of Animal Science», 90, pp. 2450-2464.
 52. FONTANESI L., BUTTAZZONI L., SCOTTI E., RUSSO V. (2012): *Confirmation of the association between a single nucleotide polymorphism in the porcine LDHA gene and average daily gain and correlated traits in Italian Large White pigs*, «Animal Genetics», 43, pp. 649-650.
 53. FONTANESI L., BERTOLINI F., DALL'OLIO S., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V. (2012): *Analysis of association between the MUC4 g.8227C>G polymorphism and production traits in Italian heavy pigs using a selective genotyping approach*, «Animal Biotechnology», 23, pp. 147-155.
 54. FONTANESI L., RUSSO V. (2013): *Nucleotide variability and haplotype heterogeneity at the porcine fat mass and obesity associated (FTO) gene*, «Animal Genetics», 44, pp. 96-100.
 55. FONTANESI L., BERTOLINI F., SCOTTI E., TREVISI P., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., DAVOLI R., BOSI P., RUSSO V. (2012): *Polymorphisms in an obesity related gene (PCSK1) are associated with fat deposition and production traits in Italian heavy pigs*, «Animal», 6, pp. 1913-1924.
 56. FONTANESI L., BUTTAZZONI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., RUSSO V. (2013): *Association between melanocortin 4 receptor (MC4R) gene haplotypes and carcass and production traits in Italian Large White pigs evaluated with a selective genotyping approach*, «Livestock Science», 157, pp. 48-56.
 57. FONTANESI L., BERTOLINI F. (2013): *The TBC1D1 gene: structure, function, and association with obesity and related traits*, «Vitamins and Hormones», 91, pp. 77-95.
 58. FONTANESI L., BERTOLINI F., SCOTTI E., SCHIAVO G., COLOMBO M., TREVISI P., RIBANI A., BUTTAZZONI L., RUSSO V., DALL'OLIO S. (2015): *Next generation semiconductor based-sequencing of a nutrigenetics target gene (GPR120) and association with growth rate in Italian Large White pigs*, «Animal Biotechnology», 26, pp. 92-97.
 59. FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., RUSSO V. (2014): *Investigation of a short interspersed nuclear element polymorphic site in the porcine vertnin gene: Allele frequencies and association study with meat quality, carcass and production traits in Italian Large White pigs*, «Italian Journal of Animal Science», 13, pp. 61-65.
 60. FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., RUSSO V. (2013): *Analysis of association between a microsatellite at intron 1 of the insulin-like growth factor*

- 1 (IGF1) gene and fat deposition, meat production and quality traits in Italian Large White and Italian Duroc pigs*, «Italian Journal of Animal Science», 12, pp. 444-449.
61. DALL'OLIO S., FONTANESI L., BUTTAZZONI L., BAIOTTO C., GALLO M., RUSSO V. (2013): *Association study between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and reproduction traits in Italian Large White sows*, «Livestock Science», 155, pp. 172-179.
62. FONTANESI L., SCHIAVO G., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., MARTELLI P.L., BUTTAZZONI L., CASADIO R., RUSSO V. (2012): *A genome wide association study for backfat thickness in Italian Large White pigs highlights new regions affecting fat deposition including neuronal genes*, «BMC Genomics», 13, p. 583.
63. SCHIAVO G., DOLEZAL M.A., SCOTTI E., BERTOLINI F., CALÒ D.G., GALIMBERTI G., RUSSO V., FONTANESI L. (2014): *Copy number variants in Italian Large White pigs detected using high-density single nucleotide polymorphisms and their association with back fat thickness*, «Animal Genetics», 45, pp. 745-749.
64. FONTANESI L., SCHIAVO G., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., RUSSO V. (2014): *A genome-wide association study for average daily gain in Italian Large White pigs*, «Journal of Animal Science», 92, pp. 1385-1394.
65. BOVO S., BERTOLINI F., SCHIAVO G., MAZZONI G., DALL'OLIO S., FONTANESI L. (2015): *Reduced Representation Libraries from DNA Pools Analysed with Next Generation Semiconductor Based-Sequencing to Identify SNPs in Extreme and Divergent Pigs for Back Fat Thickness*, «International Journal of Genomics», 2015, 950737.
66. SAMORÈ A.B., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V., FONTANESI L. (2015): *Genomic selection in a pig population including information from slaughtered full sibs of boars within a sib-testing program*, «Animal», 9, pp. 750-759.
67. FONTANESI L., SCHIAVO G., SCOTTI E., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SAMORÈ A.B., GALLO M., RUSSO V., BUTTAZZONI L. (2015): *A retrospective analysis of allele frequency changes of major genes during 20 years of selection in the Italian Large White pig breed*, «Journal of Animal Breeding and Genetics», 132, pp. 239-246.

Congressi

1. SORBOLINI S., GRUBER C., DIMAURO C., GASPA G., CELLESI M., VALENTINI A. AND MACCIOTTA N.P.P. (2014): *Genome-wide association analysis for beef traits in Marchigiana cattle breed*, Adsa-Asas Joint Annual Meeting 2014 (Kansas City 20-24/07/2014).
2. GASPA G., SORBOLINI S., DIMAURO C., CELLESI M., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Genomic Selection of Marchigiana Beef Traits*, Aspa 2015 (Milano 9-11/06/2015).
3. PULEDDA A., GASPA G., DIMAURO C., NICOLAZZI E.L., AJMONE-MARSAN P., VALENTINI A., MACCIOTTA N.P.P. (2015): *Accuracy of genomic prediction using Principal Component Analysis on an Imputed High Density SNP panel in Italian Holstein cattle*, Adsa 2015 (Orlando 9-11/06/2015).
4. GASPA G., MARRAS G., SORBOLINI S., AJMONE MARSAN P., WILLIAMS L.J., MACCIOTTA N.P.P.: *Genome-Wide Homozygosity in Italian Holstein Cattle using HD SNP Panel*, 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.
5. BERNABUCCI U., BASIRICÒ L., MORERA P., TINARELLI F. (2013): *Polymorphisms in HSP70A1A, HSP90AB1 and HSF1 genes associated with heat tolerance in Italian Holstein cows*, «Italian J. Animal Sci.», 12-s1:63.
6. CAROLI A.M., CHESSA S., BULGARI O., IACOPONI F., PARISSET L. (2013): *Effects of milk protein polymorphisms on milk traits: an across-breed study*, «Italian Journal of Animal Science», 12 (1), p. 66.
7. CHESSA S., BULGARI O., RIZZI R., CALAMARI L., CAROLI A.M. (2013): *Genetic analysis of milk clotting aptitude in the Italian Holstein-Friesian*, «Italian Journal of Animal Science», 12 (1), p. 38.
8. MILANESI M. (2015): *High-throughput sequencing technologies and genomics: insights into the bovine species*, Ph D Thesis.
9. TALENTI A., MILANESI M., NICOLAZZI E.L., NICOLOSO L., FRATTINI S., COIZET B., PAGNACCO G., WILLIAMS J.L., AJMONE MARSAN P., CREPALDI P. (2015): *Birth date regression to identify genomic signatures of recent selection in Italian Holstein*, «Italian J. Animal Sci.», 14-s1:28.
10. CREPALDI P., BORDONARO B., CHESSA S., COIZET B., COLLI L., D'ANDREA M.S., MAZZA R., MIARI S., MURRU S., NICOLOSO L., PAGNACCO G., PTAK G., PILLA F., SECHI T., VALENTINI A. (2013): *Italian Goat Consortium: a first overview of genetic*

- variability using a medium density single nucleotide polymorphism array*, XX Congresso ASPA, Associazione per la Scienza e le Produzioni Animali Bologna, 11-13 Giugno.
11. NICOLOSO L., PILLA F., CREPALDI P. AND ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2014): *Analisi genomica di 14 razze caprine Italiane*, XXI Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli Ovini e dei Caprini 9/12 settembre - Foggia.
 12. TALENTI A., NICOLAZZI E. L., NICOLOSO L., FRATTINI S., COIZET B., CHESSA S., PAGNACCO G., PILLA F., PAOLO AJMONE-MARSAN P., CREPALDI P. AND THE ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2015): *Parentage assessment with 200 single nucleotide polymorphisms on 15 Italian goat breeds*, XXI ASPA Congress, Milan, Italy, 9-12 June.
 13. SECHI T., USAI M.G., NICOLOSO L., TALENTI A., COIZET B., STEFANO F., PAGNACCO G., CASU S., CARTA A., CREPALDI P., AND THE ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2015): *Genetic variability of the Sardinian goat population assessed by the GoatSNP50 Bead-Chip*, XXI ASPA Congress, Milan, Italy, 9-12 June.
 14. TALENTI A., NICOLOSO L., FRATTINI S., COIZET B., D'ANDREA M.S., PILLA F., AJMONE MARSAN P., PAGNACCO G., CREPALDI P., ITALIAN GOAT CONSORTIUM (2015): *Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in Alpine Ibex using the GoatSNP50 Beadchip*, XXI ASPA Congress, Milan, Italy, 9-12 June.
 15. XI INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT (2012): *The characterization of goat genetic diversity: towards a genomic approach* Gran Canaria, Spain.
 16. XXII PLANT AND ANIMAL GENOME (2013): *Molecular insight into goat diversity*, S. Diego, CA.
 17. XXIII PLANT AND ANIMAL GENOME (2014): *Progress in genomic analysis of Italian goat populations*, S. Diego, CA.
 18. LIVESTOCK GENOMIC RESOURCES IN A CHANGING WORLD CONFERENCE (2014): *The coalition between Italian goats and Italian researchers: the Italian Goat Consortium*, Cardiff, 17-19 June.
 19. BERNABUCCI U., MORERA P., CATALANI E., BASIRICÒ L. AND NARDONE A. (2013): *ACE-inhibitory activity and antihypertensive effect of biopeptides in aged hard cheeses*, 13th International Conference of FFC - First International Symposium of ASFFBC: Functional and Medical Foods with Bioactive Compounds: Science and Practical Application, 2013, Kyoto-Japan. Abstract Book; "Functional and Medical Foods with Bioactive Compounds - Science and Practical Application", Volume 13, pp. 160-162.
 20. CARDINALI I., LANCIONI H., CAPOMACCIO S., CAPPELLI K., GIONTELLA A., PEREGO U.A., CAPODIFERRO M.R., RIZZI E., OLIVIERI A., SILVESTRELLI M., ACHILLI A.: *The horse mitochondrial haplogroup variation in ten Italian local breeds*, XIII Congress of the Italian Federation of Life Sciences.
 21. AJMONE-MASAN P., MILANESI M., BOMBA L., COLLI L., BACCIU N., RAMUNNO L., COSENZA G., COLETTA A., ZICARELLI L., FRITZ E., KOLTES J., REECY J.M., WILLIAMS J., IAMARTINO D., SONSTEGARD T. S., VAN TASSELL C. P., THE INTERNATIONAL BUFFALO CONSORTIUM (2013): *Biodiversity among Buffalo genomes*, International Plant and Animal Genome Conference Future Dates, XXI Conference, January 12-16, San Diego.
 22. COSENZA G., APICELLA E., PAUCIULLO A., RUBESSA M., PALMIERI N., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2013): *Genetic variability of Prolactin (PRL) and Prolactin Receptor (PRLR) genes in the Italian Mediterranean river buffalo*, 10th World Buffalo Congress and the 7th Asian Buffalo Congress, 6th - 8th May, Phuket, Thailand, 96.
 23. MILANESI M., RAMUNNO L., COSENZA G., COLETTA A., ZICARELLI L., FRITZ E. R.,

- KOLTES J.E., REECY J.M., WILLIAMS J., IAMARTINO D., GARCIA J.F., SONSTEGARD T.S., TASSELL C.P., MARSAN P.A. (2013): *Whole genome genetic diversity of buffalo*, 20th Congress of Animal Science and Production Association, «Italian Journal of Animal Science», C-050 DOI: 10.4081/ijas.2013.s1
24. IAMARTINO D., WILLIAMS J.L., RAMUNNO L., AJMONE-MARSAN P., VALENTINI A., MOIOLI B., CHILLEMI G., STROZZI F., FERRÉ F., BIAGINI T., MANCINI G., PASQUARIELLO R., COSENZA G., COLETTA A., CASTIGLIONI B., ZICARELLI L., IANNUZZI L., MACCIOTTA N., MATASSINO D., PILLA F., D'ANDREA M., CORRADO F., PERETTI V. (2013): *Sequencing of the Water Buffalo Genome: results and perspectives*, 20th Congress of Animal Science and Production Association, «Italian Journal of Animal Science», C-051 DOI: 10.4081/ijas.2013.s1
25. RAMUNNO L., COSENZA G., APICELLA E., DI BERARDINO D., GALLO D., RUBESSA M., COLETTA A. PAUCIULLO A. (2013): *Genetic structure and composite genotype distribution at Oxytocin (OXT) - Oxytocin Receptor (OXTR) loci in Italian Mediterranean river buffalo*, 20th Congress of Animal Science and Production Association, Italian Journal of Animal Science. P-053 DOI: 10.4081/ijas.2013.s1
26. PAUCIULLO A., COSENZA G., APICELLA E., GALLO D., ERHARDT G., IANNUZZI L., RAMUNNO L. (2013): *Genetic variability of Lipoprotein lipase gene (LPL) and preliminary association study with milk fatty acids in Italian Mediterranean river buffalo*, Max Rubner Conference - Max Rubner-Institut, the German Federal Research Institute of Nutrition and Food, in Karlsruhe, Germany, 7-9 October pp. 33-34.
27. AJMONE MARSAN P., IAMARTINO D., BOMBA L., NICOLAZZI E. L., SAHAR SAAD A. S., EL-DIN, HERRERA J. R.V., CRUZ L., ZHANG S., MOKHBER M., MOKHBER M., VLAIC A., RAMUNNO L., COSENZA G., AHMAD A., SOYSAL I., KETUDAT-CAIRNS M., PARNPAL R., GONÇALVES DRUMMOND M. G., GARCIA J. F., GALBUSERA P., BURTON J., HOAL E., VALENTINI A., MOIOLI B., MILANESI M., COLLI L., STELLA A., WILLIAMS J. (2014): *An overview of Bus bubalis genetic diversity*, International Plant & Animal Genome XXII Conference, January 10-15, San Diego, CA, USA, W115.
28. MANCA M.G., COSENZA G., APICELLA E., PAUCIULLO A., COLETTA A., NUDDA A., MACCIOTTA N.P.P., ZICARELLI L., RAMUNNO L. (2014): *Survey of fatty acid profile of milk fat in Italian Water buffalo*, Conference, Joint Annual Meeting (JAM) American Dairy Science Association (ADSA) Kansas City, Missouri, July 20–24, abstract numbers 1502.
29. NICOLAZZI E. L., VANTASSELL C. P., IAMARTINO D., REECY J. D., FRITZ-WATERS E., SONSTEGARD T.S., KOLTES J.E., SCHROEDER S. G., AHMAD A., GARCIA J. F., RAMUNNO L., COSENZA G., WILLIAMS J. AND INTERNATIONAL BUFFALO CONSORTIUM (2015): *Using the 90K Buffalo SNP Array*, International Plant and Animal Genome Conference XXIII, January 10-14 - San Diego, CA, USA, W108.
30. MARSAN P.A., MILANESI M., VAJANA E., IAMARTINO D., BOMBA L., NICOLAZZI E.L., EL-DIN AHMED S. S., V. HERRERA J. R., CRUZ L., ZHANG S., YANG L., HAO X., ZUO F., LAI S.J., MOKHBER M., AUGUSTIN VLAIC A., RAMUNNO L., COSENZA G., AHMAD A., SOYSAL I., ÜNAL E. Ö., KETUDAT-CAIRNS M., PARNPAL R., DRUMMOND M. G., GARCIA J. G., UTSUNOMIYA Y. T., GALBUSERA P., BURTON J., HOAL E., YUSNIZAR Y., SUMANTRI C., MOIOLI M., VALENTINI A., COLLI L., STELLA A., WILLIAMS J. AND INTERNATIONAL BUFFALO CONSORTIUM (2015): *Diversity and Origins of Domestic Buffalo*, International Plant and Animal Genome Conference XXIII, January 10-14 - San Diego, CA, USA. W109.
31. COLLI L., MILANESI M., VAJANA E., IAMARTINO D., BOMBA L., NICOLAZZI E. L.,

- SAAD EL-DIN AHMED S., V HERRERA J. R., CRUZ L., ZHANG S., YANG L., HAO X., ZUO F., LAI SJ., WANG S., LIUR., GONG Y., MOKHBER M., MAOY., GUAN F., VLAIC A., RAMUNNO L., COSENZA G., AHMAD A., SOYSAL I., ÜNAL E. Ö., KETUDATCAIRNS M., GARCIA J. F., UTSUNOMIYA Y.T., PARNPAL R., DRUMMOND M. G., GALBUSERA P., BURTON J., HOAL E., YUSNIZAR Y., SUMANTRI C., MOIOLI B., VALENTINI A., STELLA A., WILLIAMS J., THE INTERNATIONAL BUFFALO CONSORTIUM, AJMONE MARSAN P. (2015): *Patterns of diversity in swamp and river buffalo as revealed by SNP molecular markers*, 21th Congress of Animal Science and Production Association, Italian Journal of Animal Science; volume 14 supplement 1. Pag. 11, C-017. ISSN 1594-4077 e ISSN 1828-051X.
32. DOI: 10.4081/ijas.2015.4094.
33. PAUCIULLO A., APICELLA E., RAMUNNO L., COSENZA G. (2015): *Genetic variability at the FASN locus in the Italian Mediterranean river buffalo (bubalus bubalis, 2n=50)*, 21th Congress of Animal Science and Production Association, «Italian Journal of Animal Science», volume 14 supplement 1, pp. 118-119, P-063. ISSN 1594-4077 e ISSN 1828-051X - DOI: 10.4081/ijas.2015.4094
34. COSENZA G., APICELLA E., COLETTA A., PICO A. B., MACCIOTTA N.P.P., RAMUNNO L., PAUCIULLO A. (2015): *Genetic variants of CSN1S1 gene in Italian Mediterranean river buffalo: an association with milk yield*, 21th Congress of Animal Science and Production Association, Italian Journal of Animal Science; volume 14 supplement 1. pp. 106, P-039. ISSN 1594-4077 e ISSN 1828-051X DOI: 10.4081/ijas.2015.4094
35. FONTANESI L., VALENTINI M., STERI R., SCOTTI E., DALL'OLIO S., MOIOLO B., BUTTAZZONI L. (2013): *A comparative serum metabonomic analysis between Italian Duroc and Italian Large White pigs*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13 June 2013.
36. FONTANESI L., DALL'OLIO S., FANELLI F., SCOTTI E., SCHIAVO G., BERTOLINI F., TASSONE F., SAMORÉ A.B., BOVO S., MAZZONI G.L., GALLO M., BUTTAZZONI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., MARTELLI P.L., CASADIO R., PAGOTTO U., RUSSO V. (2013): *Combined genomics and metabolomics approaches to identify markers associated with production traits in pigs*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13 June 2013.
37. SCOTTI E., BERTOLINI F., SCHIAVO G., COLOMBO M., TREVISI P., DALL'OLIO S., BUTTAZZONI L., RUSSO V., FONTANESI L. (2013): *Identification of polymorphisms in the porcine GPR120 (FFAR4) gene and association with production traits in Italian Large White pigs*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13 June 2013.
38. FONTANESI L., BERTOLINI F., SCOTTI E., SCHIAVO G., TREVISI P., COLOMBO M., MARTELLI P.L., CASADIO R., BOSI P. (2013): *Bitter taste receptor genes in pigs: SNP identification using next-generation semiconductor sequencing*, Proceedings of the International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (ISEP), September 9-12, Sacramento, California.
39. SCHIAVO G., DOLEZAL M., MARTELLI P.L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., CASADIO R., BAGNATO A., RUSSO V., FONTANESI L. (2012): *Identification of copy number variants associated with back fat thickness in pigs using a selective genotyping approach*, Proceedings of the 4th International Conference on Quantitative Genetics: Understanding Variation in Complex Traits, Edinburgh, 17-22 June 2012, Abstract P-402.
40. SCHIAVO G., DOLEZAL M., MARTELLI P.L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., CASADIO R., BAGNATO A., RUSSO V., FONTANESI L. (2012): *A selec-*

tive genotyping approach identifies copy number variants associated with backfat thickness in Italian Large White pigs, Proceedings of the ISAG2012 Congress, Cairns, July 15-20 2012.

41. SAMORÈ A.B., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V., FONTANESI L. (2013): *Genomic selection in Italian heavy pigs: a simulation study*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13 June 2013.
42. SAMORÈ A.B., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V., FONTANESI L. (2013): *A simulation study to evaluate different strategies of genomic selection in Italian heavy pigs*, Proceedings of the 64th EAAP Annual Meeting, 26-30 August 2013, Nantes, France. Abstract 17546.
43. FONTANESI L., DALL'OLIO S., FANELLI F., SCOTTI E., SCHIAVO G., BERTOLINI F., TASSONE F., SAMORÈ A.B., MAZZONI G.L., BOVO S., GALLO M., BUTTAZZONI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., MARTELLI P.L., CASADIO R., PAGOTTO U., RUSSO V. (2013): *Genomics and metabolomics approaches to identify markers associated with economic traits in pigs*, Proceedings of the 64th EAAP Annual Meeting, 26-30 August 2013, Nantes, France. Abstract 17658.
44. RIBANI A., BERTOLINI F., SCHIAVO G., SCOTTI E., UTZERI V.J., DALL'OLIO S., TREVISI P., BOSI P., FONTANESI L. (2015): *Next generation semiconductor based sequencing of bitter taste receptor genes in different pig breeds and populations and association study of identified polymorphisms using a DNA pooling strategy*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), abstract C0-70.
45. FONTANESI L., SAMUELE B., MAZZONI G.L., SAMORÈ A.B., SCHIAVO G., SCOTTI E., FANELLI F., BERTOLINI F., GALLO M., BUTTAZZONI L., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., MEZZULLO M., MARTELLI P.L., CASADIO R., PAGOTTO U., RUSSO V., & DALL'OLIO S. (2014a): *Genome wide perspective of genetic variation in pig metabolism and production traits*, Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Vancouver (CA), August 17-22, 2014.
46. FONTANESI L., SCHIAVO G., BOVO S., MAZZONI G., FANELLI F., RIBANI A., UTZERI V.J., LUISE D., SAMORÈ A.B., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., MANISI A., BERTOLINI F., MEZZULLO M., PAGOTTO U., DALL'OLIO S., TREVISI P., & BOSI P. (2015): *Dissecting complex traits in pigs: metabolotypes illuminate genomics for practical applications*, Proceedings of the 66th EAAP Annual Meeting 2015, Warsaw, Poland, 31 August-4 September 2015.
47. SCHIAVO G., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., BERTOLINI F., SAMORÈ A.B., RUSSO V., GALLO M., BUTTAZZONI L., FONTANESI L. (2015): *Genome wide analysis of the effects of twenty years of artificial directional selection in the Italian Large White pig breed*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), abstract C-069.
48. SAMORÈ A.B., DALL'OLIO S., MURATORI T., FONTANESI L. (2015): *Genetic aspects of haematological parameters in Italian Large White pigs*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), abstract P-067.
49. FONTANESI L., BERTOLINI F., SCHIAVO G. (2015): *The founder signature: sequencing the genome of "Olimpo", the most important boar of the Italian Large White selection program*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), abstract C-047.
50. GAGLIARDI, R., PROROGA, Y.T.R., BARBATO, A., TRANI, A., FACCIA, M., DI LUCCIA A. (2009): *ELISA for monitoring the freshness of river buffalo curd*, Atti del convegno "Micheese-AS-Methods and. Issues in Cheese Authenticity Studies", Avellino 3-5/09/2009, p. 44.
51. BERTOLINI F., SARDINA M.T., SCHIAVO G., MATASSINO D., RUSSO V., PORTOLANO B.,

- FONTANESI L. (2013): *Analysis of Illumina BovineSNP50 BeadChip data in different Italian cattle breeds to identify useful markers for breed authentication of dairy and beef products*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13, June 2013.
52. SCHIAVO G., SCOTTI E., NANNI COSTA L., DALL'OLIO S., D'ALESSANDRO E., RUSSO V., FONTANESI L. (2013): *Genetic diversity in different Italian pig breeds evaluated using Illumina PorcineSNP60 BeadChip data*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13, June 2013.
53. SCHIAVO G., NOSRATI M., CIANI E., D'ANDREA M., MATASSINO D., FONTANESI F., THE BIOVITA (BIODIVERSITÀ OVINA ITALIANA) CONSORTIUM (2013): *Analysis of copy number variations in Italian sheep breeds using the Illumina OvineSNP50 Bead-Chip array*, Proceedings of the XX ASPA Congress, Bologna 11-13, June 2013.
54. SCHIAVO G., BERTOLINI F., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., SCOTTI E., MATASSINO D., RUSSO V., DALL'OLIO S., NANNI COSTA L., FONTANESI L. (2015): *Combined principal component analysis and random forest approaches identified population informative SNPs in several Italian pig breeds*, «Italian Journal of Animal Science», 14 (Suppl. 1), Abstract n. P-070.

BREVETTI

- FONTANESI L., DALL'OLIO S., SCOTTI E. (2015): *Marcatore del DNA per l'identificazione dei suini di razza Cinta Senese e relative metodi e kit di identificazione*, Domanda n. 102015000011082.

Finito di stampare in Firenze
presso la tipografia editrice Polistampa
nel marzo 2017

