





ACCADEMIA  
DEI GEORGOFILI



## PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DEL PROGETTO SELMOL

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

I GEORGOFILI  
Quaderni 2010-III

Firenze, 15-16 settembre 2010



EDIZIONI POLISTAMPA



**CRSA**

*Consorzio di Ricerca e Sperimentazione per gli Allevatori*



MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE  
ALIMENTARI E FORESTALI



*Il Progetto Selmol - Ricerca e innovazione nelle attività di miglioramento genetico animale mediante tecniche di genetica molecolare per la competitività del sistema zootecnico nazionale - è stato finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali. Ente beneficiario il Consorzio di Ricerca e Sperimentazione per gli Allevatori (C.R.S.A.). Gli Atti sono pubblicati con il finanziamento del Progetto.*

A cura di: *Cinzia Marchitelli, Maria Stella Ranieri, Riccardo Negrini*

Copyright © 2011  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili»  
Anno 2010 - Serie VIII - Vol. 7 (186° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

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

ISBN 978-88-596-0884-4

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA



## INDICE

NINO ANDENA	
<i>Introduzione</i>	13
ALESSANDRO NARDONE	
<i>Relazione del coordinatore del progetto</i>	15
UNITÀ OPERATIVA CARNE SUINA	
VINCENZO RUSSO	
<i>Relazione del coordinatore</i>	29
VINCENZO RUSSO	
<i>Ricerca di marcatori associati con caratteristiche produttive e qualitative della carne e della carcassa</i>	31
VINCENZO RUSSO	
<i>Geni associati con l'efficienza riproduttiva nelle scrofe</i>	43
VINCENZO RUSSO	
<i>Individuazione di SNP in regioni del genoma suino nelle quali sono stati identificati QTL per il pH della carne post-mortem</i>	49
BRUNO STEFANON	
<i>Individuazione di geni associati con la velocità di crescita in razze suine italiane</i>	53
PAOLO AJMONE-MARSAN	
<i>Ricerca e analisi polimorfismi in geni candidati per l'incremento ponderale giornaliero (IGM) e lo spessore del lardo dorsale</i>	57
GIULIO PAGNACCO	
<i>Identificazione di polimorfismi in geni che potenzialmente influenzano la qualità della carne</i>	61
FABIO PILLA	
<i>Studio della variabilità genetica ai loci coinvolti nell'accrescimento e nella qualità della carne nella razza Casertana</i>	67

VINCENZO RUSSO	
<i>Ricerca di geni differenzialmente espressi in suini di diverse razze sottoposte a stress premacellazione</i>	71
ALESSIO VALENTINI	
<i>Ricerca di polimorfismi nei promotori di geni candidati per la qualità della carne e valutazione della loro efficienza trascrizionale in colture cellulari trasfettate, mediante geni reporter</i>	77
VINCENZO RUSSO	
<i>Validazione mediante real time-PCR (qRT-PCR) di geni differenzialmente espressi all'analisi microarray in suini estremi per potenziale glicolitico</i>	85
DONATO MATASSINO	
<i>Confronto tra Fiocco fresco e Fiocco stagionato ottenuti dal TGAA Casertana e dall'ibrido commerciale PEN AR LAN</i>	91
UNITÀ OPERATIVA CARNE BOVINA E ALTRE SPECIE	
ALESSIO VALENTINI	
<i>Relazione del coordinatore</i>	99
ALESSIO VALENTINI	
<i>Genome Selection per caratteri post mortem nella razza bovina Marchigiana</i>	101
JOHN WILLIAMS	
<i>Genome wide scan per la facilità di parto nella razza bovina Piemontese</i>	105
FABIO PILLA	
<i>Genome wide scan per l'accrescimento e la facilità di parto nella razza bovina Pezzata Rossa</i>	109
PAOLO AJMONE-MARSAN	
<i>Identificazione delle tracce lasciate dalla selezione differenziale per la produzione di carne e di latte nei bovini</i>	113
LILIANA DI STASIO	
<i>Analisi di geni candidati per caratteri in vivo nella razza bovina Piemontese</i>	119
FRANCESCO PANELLA	
<i>Associazione tra SNPs e caratteri morfologici e produttivi nelle razze ovine italiane da carne</i>	125
FRANCESCO PANELLA	
<i>Geni candidati, effetto e loro utilizzazione nelle razze Chianina e Marchigiana</i>	131
ALESSIO VALENTINI	
<i>Geni candidati nella razza bovina Limousine</i>	139

LILIANA DI STASIO

*Variabilità dei geni  $\mu$ -Calpaina e Calpastatina e associazioni  
con la tenerezza della carne nella razza bovina Piemontese* 143

GIAN FRANCO GREPPI

*Messa a punto di un sistema di sonde per l'analisi di proteine, DNA e RNA e  
verifica dell'influenza di alleli potenzialmente sul trascrittoma muscolare  
tramite microarray* 149

PAOLA RONCADA

*Analisi proteomica del muscolo bovino per valutare l'effetto  
dei differenti QTL individuati sui parametri di qualità della carne* 155

#### UNITÀ OPERATIVA LATTE BOVINO

PAOLO AJMONE-MARSAN

*Relazione coordinatore* 161

PAOLO AJMONE-MARSAN

*Analisi Genome-Wide* 165

LORRAINE PARISET

*Analisi di geni candidati* 171

VINCENZO RUSSO, ALESSANDRO BAGNATO

*Analisi di QTL sui cromosomi 14 e 20 per l'identificazione  
di geni candidati per la qualità e la produzione del latte  
nelle razze Frisona e Bruna* 179

ANNA CAROLI

*Analisi dei polimorfismi genetici delle proteine del latte* 183

MARIA FELIGINI

*Determinazione quali-quantitativa delle caseine e delle maggiori  
sieroproteine di latte bovino e correlazione con l'aplotipo  
ai rispettivi loci caseinici e sierici* 189

#### UNITÀ OPERATIVA MODELLI

NICOLÒ PIETRO PAOLO MACCIOTTA

*Relazione coordinatore* 195

NICOLÒ PIETRO PAOLO MACCIOTTA

*Genomic selection* 197

CAMILLO PIERAMATI

*Utilizzo informazioni da panel 54k SNP* 203

NICOLÒ PIETRO PAOLO MACCIOTTA	
<i>Elaborazione modelli per analisi dati di espressione genica</i>	209
PAOLO CARNIER	
<i>Sviluppo di software in grado di produrre stime degli effetti dei segmenti cromosomici in modo efficiente grazie alla parallelizzazione dell'algoritmo</i>	215
GUSTAVO GANDINI	
<i>Identificazione e confronto di schemi selettivi per razze locali bovine e ovi-caprine italiane con controllo della consanguineità</i>	221
UNITÀ OPERATIVA LATTE ALTRE SPECIE	
LUIGI RAMUNNO	
<i>Relazione del coordinatore</i>	229
LUIGI RAMUNNO	
<i>Latte bufalino</i>	231
LUIGI RAMUNNO	
<i>Latte asinino</i>	237
LUIGI RAMUNNO	
<i>Latte capra</i>	241
ANTONELLO CARTA	
<i>Verifica di un QTL per la composizione chimica del latte e valutazione del potenziale impatto della selezione assistita da marcatori nella razza ovina Sarda</i>	245
LINA CHIANESE	
<i>Caratterizzazione delle lattoproteine asinine mediante l'approccio proteomico</i>	251
PAOLA CREPALDI	
<i>Analisi di geni candidati nelle variazioni quanti-qualitative della frazione lipidica del latte caprino</i>	257
MARIA FELIGINI	
<i>Caratterizzazione quali-quantitativa delle proteine del latte di bufalo Mediterraneo</i>	263
FABIO PILLA	
<i>Individuazione nella razza Comisana di geni che influenzano le qualità nutrizionali del latte</i>	267
ANDREA RANDO	
<i>Caratterizzazione delle caseine calcio sensibili e delle siero proteine in latte di asina</i>	271

UNITÀ OPERATIVA COMPONENTI FUNZIONALI  
PER LA SALUTE UMANA IN ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

ALESSANDRO NARDONE

*Relazione del coordinatore* 277

ALESSANDRO NARDONE

*Comparazione dell'attività ACE inibitoria e dell'attività ipotensiva  
del latte delle specie bovina, ovina, caprina, bufalina e asinina* 279

ALESSANDRO NARDONE

*Studio nella specie bovina delle differenze nell'attività di ACE inibizione  
dovute a base genetica e dell'attività ACE inibitoria/ipotensiva  
di derivati del latte, potenzialmente a forte attività.* 285

ANNA CAROLI

*Studio dell'azione calcio fissatrice dei caseinofosfopeptidi (CFP)* 293

ANNA CAROLI

*Studio dell'attività di regolazione del metabolismo energetico  
di biopeptidi del latte* 297

UNITÀ OPERATIVA TRACCIABILITÀ E RINTRACCIABILITÀ

DONATO MATASSINO

*Relazione del coordinatore* 303

DONATO MATASSINO

*Rintracciabilità di razza e autenticazione di prodotto mediante  
approccio proteomico* 305

DONATO MATASSINO

*Ricerca di 'biomarcatori peculiari' del tipo genetico nella componente  
lipidica di prodotti tradizionali o locali di origine animale. Specie 'Suina'* 311

DONATO MATASSINO

*Individuazione, a livello del DNA, di marcatori 'esclusivi'  
o 'discriminanti' o 'privati' caratterizzanti un tipo genetico. Specie 'Suina'* 317

MICHELE BLASI

*Individuazione, a livello del DNA, di marcatori 'esclusivi'  
o 'discriminanti' o 'privati' caratterizzanti un tipo genetico. Specie 'Suina'* 323

GRAZIELLA BONGIONI

*Rintracciabilità di razze suine autoctone con marcatori SNP* 329

PAOLO AJMONE-MARSAN

*Tracciabilità specie bovina* 335

LUCA FONTANESI

*Individuazione di marcatori razza specifici in geni del colore  
del mantello per l'autenticazione di alcuni prodotti monorazza  
derivati da razze locali suine e ovine* 341

ALDO DI LUCCIA

*Ricerca di "marcatori molecolari" peculiari del tipo genetico e/o  
della materia prima prodotta e/o dei prodotti derivati* 347

#### UNITÀ OPERATIVA CAVALLI

MAURIZIO SILVESTRELLI

*Relazione del coordinatore* 353

MAURIZIO SILVESTRELLI

*Applicazione di tecniche di genomica strutturale e funzionale  
per la tipizzazione e selezione del cavallo* 355

CARLO RENIERI

*Studio di alcuni meccanismi genetici dello stress da esercizio  
nel cavallo sportivo* 361

#### UNITÀ OPERATIVA RIPRODUZIONE STRESS E MALATTIE

JOHN WILLIAMS

*Relazione del coordinatore* 367

NICOLA LACETERA

*Individuazione di eventuali associazioni tra SNPs presenti sui geni  
Toll Like Receptors 9 (TLR9) e TLR4 e alcuni parametri  
immunologici o di resistenza alle malattie in bovine di razza Frisona* 369

JOHN WILLIAMS

*Sequenziamento di geni candidati con effetto sulla suscettibilità  
a paraTB su animali sani e malati* 373

JOHN WILLIAMS

*Studio dell'effetto del genotipo sulla vitalità embrionale  
mediante analisi high throughput di mRNA e miRNA* 377

LUCA FERRETTI

*Riproduzione e DNA mitocondriale* 383

UMBERTO BERNABUCCI

*Valutazione della risposta allo stress in base al genotipo  
ai loci heat shock in razza Frisona* 387

DOMENICO IANNELLI

*Identificazione di geni che conferiscono al bufalo protezione  
contro la B. abortus* 395

GIORGIO POLI

*Valutazione della associazione tra la risposta immunitaria e la variabilità  
genetica per le cellule somatiche* 403

ELISA PIERAGOSTINI

*Resistenza alle malattie trasmesse da zecche nei piccoli ruminanti* 409

UNITÀ OPERATIVA FORMAZIONE PER LE STRUTTURE  
DI MIGLIORAMENTO GENETICO

GIULIO PAGNACCO

*Relazione del coordinatore* 417

ALESSANDRO NARDONE

*Conclusioni* 423

GIUSEPPE BLASI

*Postfazione* 427

INTEGRAZIONE A UNITÀ OPERATIVA RIPRODUZIONE STRESS E MALATTIE

JOHN WILLIAMS

*Studio della risposta cellulare alla mastite,  
studio di geni candidati antibatterici e analisi genome-wide* 431





## Introduzione

Il miglioramento genetico degli animali è al centro delle attività delle Associazioni allevatori da oltre sessanta anni. I metodi di selezione dei riproduttori non sono mai rimasti statici perché le Associazioni sono state attente a recepire le innovazioni della scienza e della tecnica. Da molti anni vengono innovati i modelli di calcolo degli indici genetici; aumenta la complessità ma migliora la stima e si risponde meglio alle richieste degli allevatori e ai bisogni della società.

Oggi, e ancor più domani, cambiamenti importanti si prospettano nel mondo della selezione, grazie alla genetica molecolare. All'allevamento viene offerto un nuovo strumento, in grado di aprire più ampi orizzonti, non solo per migliorare le produzioni quantitative, ma anche altri caratteri più direttamente riferiti alla qualità dei prodotti e alla salute e funzionalità degli animali allevati. Ciò che solo pochi decenni addietro sembrava fantascienza, la ricerca scientifica ha reso oggi possibile: "leggere" nel DNA i caratteri di un individuo e stimarne il valore genetico. Il rilevamento del fenotipo rimane fondamentale, ma l'informazione che si può avere direttamente dal DNA ne completa l'utilizzazione e accelera i tempi del progresso genetico.

Di fronte a questa realtà che avanza l'AIA e le associazioni nazionali di specie e di razza non possono restare ferme perché nell'attesa rischierebbero di subire le nuove tecnologie direttamente dal mercato.

Ecco perché il progetto "Selmol" ha visto l'Organizzazione degli Allevatori italiani, con il proprio Consorzio di Ricerca e Sperimentazione (CRSA), impegnata in prima linea a collaborare con i gruppi di ricerca più avanzati in questo settore, presenti nelle Università italiane e in altre Istituzioni. I risultati

\* *Presidente del Consorzio di Ricerca e Sperimentazione degli Allevatori*

a oggi conseguiti sono più che promettenti e quelli sulla selezione genomica in particolare hanno già permesso di avviare con tempestività e “alla pari” rapporti fruttuosi di collaborazione internazionale. Non è lontano il giorno in cui, grazie alla genetica molecolare, anche dalle linee femminili si potrà ottenere un più incisivo apporto alla selezione. Questo rappresenterà un ulteriore contributo a conseguire in minor tempo più progresso genetico, meglio mirato alle esigenze degli allevatori e del mercato. Una prospettiva a portata di mano, che non deve però spingere a pericolose fughe in avanti. Non è una ritrattazione della fiducia nella scienza, è soltanto la necessità di non esporre gli allevatori ai rischi e ai costi della sperimentazione in campo. Selmol ha dimostrato la capacità di AIA e delle sue associate di fare sistema con la ricerca e le potenzialità che ha questo sistema di rispondere alle aspettative delle Istituzioni e della collettività.

Gli allevatori italiani hanno dimostrato ancora una volta la disponibilità a fare la loro parte e quanto questo sia a beneficio della collettività.

Un ringraziamento doveroso va, infine, rivolto al MIPAAF, che con sensibilità e lungimiranza, ha finanziato la realizzazione del progetto.

ALESSANDRO NARDONE\*

## Relazione del coordinatore del progetto

**Titolo del progetto:** *Ricerca e innovazione nelle attività di miglioramento genetico animale mediante tecniche di genetica molecolare per la competitività del sistema zootecnico nazionale*

**Acronimo:** Selmol

**Durata del progetto:** 36 mesi

**Data di approvazione:** 29/01/2007

**Data di inizio attività:** 01/06/2007

**Proroga:** 30/09/2010

**Ente beneficiario:** Consorzio di Ricerca e Sperimentazione per gli Allevatori (CRSA), Roma

### UNIVERSITÀ/ENTI PARTECIPANTI AL PROGETTO

Dipartimento Progettazione e Gestione dei Sistemi Agro-Zootecnici e Forestali, Università degli Studi di Bari, Bari

Consorzio per la Sperimentazione, Divulgazione e Applicazione di Biotecniche Innovative, Benevento

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università degli Studi di Bologna, Bologna

Dipartimento delle Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Brescia, Brescia

Dipartimento Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Stu-

\* *Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Produzioni Animali*

di del Molise, Campobasso  
 Laboratorio di Genetica e Servizi (LGS), Cremona  
 Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Foggia, Foggia  
 Strutture Autonome Responsabili di Ricerca e Formazione (SARF) di Scienze  
 Ambientali, Università degli Studi di Camerino, Macerata  
 Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria,  
 Università di Milano, Milano  
 Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Zootecnica Agraria, Università  
 degli Studi di Milano, Milano  
 Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare,  
 Università degli Studi di Milano, Milano  
 Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA) CNR, Milano  
 Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani" (ISLS), Milano  
 Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, Università  
 degli Studi di Napoli, Napoli  
 Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Padova, Padova  
 Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia, Pavia  
 Dipartimento di Biologia Applicata, Sezione Scienze Zootecniche, Università  
 degli Studi di Perugia, Perugia  
 Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Centri Studi  
 Cavallo Sportivo, Università degli Studi di Perugia, Perugia  
 Istituto di Zootecnica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza  
 Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali, Università degli Studi  
 della Basilicata, Potenza  
 Consorzio di Ricerca e Sperimentazione degli Allevatori, Roma  
 Agenzia per la Ricerca in Agricoltura della Regione Sardegna, Sassari  
 Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Sassari, Sas-  
 sari  
 Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Torino, Torino  
 Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Università degli Studi di  
 Udine, Udine  
 Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia, Vi-  
 terbo

#### OBIETTIVO, AZIONI E ORGANIZZAZIONE DEL PROGETTO

L'obiettivo generale del progetto Selmol è il potenziamento del progresso genetico delle popolazioni animali allevate in Italia diretto ai caratteri già sotto

selezione, nonché a nuovi caratteri riguardanti la qualità dei prodotti e le condizioni di salute, il benessere e la fertilità degli animali. Per il raggiungimento dell'obiettivo il progetto ha previsto un modello organico e integrato tra le tecniche di genetica molecolare e le metodologie tecnico-operative già in essere per la selezione degli animali.

Le azioni più significative hanno riguardato: i) l'individuazione di geni candidati, QTL e marcatori molecolari per caratteri di prioritario interesse sia produttivo sia funzionale; ii) lo sviluppo di nuovi modelli per l'integrazione dei dati molecolari (geni, QTL e SNP) negli schemi di selezione; iii) lo sviluppo di sistemi per la caratterizzazione genomica e trascrittomica dei tipi genetici e proteomica dei loro prodotti; iv) lo studio delle caratteristiche nutrizionali dei prodotti di origine animale, funzionali alla salute umana; v) l'aggiornamento di tecnici e dirigenti delle strutture di miglioramento genetico sugli sviluppi teorici e applicativi della genetica molecolare.

Il progetto ha operato con metodiche già patrimonio delle Unità di ricerca coinvolte (ricerca di QTL, ricerca di geni candidati, ricerca di Single Nucleotide Polymorphism, espressione genica, proteomica, lipidomica) e nuove metodologie. Tra queste ultime particolare impegno è stato dedicato alla diagnostica ad alta processività per l'analisi di SNP (chip a 54K per bovino e cavallo), messa a punto dalla ricerca internazionale quando il progetto era già in esecuzione.

Il progetto ha sviluppato ricerche su: Bovino, Ovino, Capra, Bufalo, Suino, Cavallo, Asino.

Le linee di ricerca hanno riguardato 9 settori: Carne, Latte, Riproduzione, Malattie e stress, Cavalli, Molecole bioattive, Tracciabilità e rintracciabilità, Sviluppo e validazione di modelli di analisi, Formazione.

Complessivamente per la realizzazione del progetto sono state coinvolte 17 Università e 6 Centri di ricerca, organizzati in 10 Unità Operative (UO) e 40 Subunità (SUBUO), e 10 Associazioni Nazionali Allevatori (ANA).

La realizzazione del progetto è avvenuta con una forte interazione tra strutture di ricerca e quelle di selezione. La priorità è stata data a linee concordate con le ANA responsabili del miglioramento genetico. Anche le priorità del trasferimento dei risultati sono state condivise con le Associazioni Allevatori.

Al fine di poter monitorare l'andamento generale dell'organigramma dell'intero progetto e la operatività delle singole UO/SUBUO il Coordinamento ha realizzato due Banche Dati e ha organizzato, con sistematicità, numerose riunioni con le UO/SUBUO e tra queste e le ANA. Numerosi

incontri sono stati realizzati anche all'interno di ciascuna UO tra le SUBUO componenti.

Le due Banche Dati sono state strutturate:

- una secondo la procedura dei “deliverable”, per monitorare l'avanzamento delle singole linee di ricerca e allo stesso tempo per realizzare archivi consultabili, degli elaborati prodotti nell'ambito del Selmol, al fine di facilitare lo sviluppo di ricerche condivise. Questo ha promosso diverse iniziative di utilizzo plurimo dello stesso materiale biologico da parte di più Unità di Ricerca, favorendo sinergie e approfondimenti nella conoscenza dei genotipi rispetto a molteplici caratteri;
- una in modo da poter contenere tutti i risultati conseguiti entro Selmol.

L'accesso alle Banche Dati da parte dei ricercatori delle UO e SUBUO e delle ANA è stato regolato mediante password.

Per la realizzazione e per la gestione di fasi delle due Banche Dati il Coordinamento si è avvalso del CASPUR (Consorzio interuniversitario per le applicazioni di supercalcolo per Università e Ricerca). L'hardware è stato ubicato presso il centro elaborazioni dati dell'Associazione Italiana Allevatori (AIA).

Al fine di regolare i rapporti tra i partecipanti al progetto, rispetto a proprietà dei dati e proprietà intellettuali, sono stati stipulati e sottoscritti accordi tra CRSA, UO/SUBUO e ANA. Sulla base di tali accordi queste ultime hanno reso possibile il reperimento e la raccolta di materiale biologico e l'utilizzo di dati in loro possesso (fenotipi, EBV, parentele, ecc.).

Il Coordinamento, al fine di operare con la necessaria uniformità nelle fasi della genotipizzazione dei riproduttori bovini utilizzati nelle ricerche della selezione genomica mediante la tecnologia dei chip ad alta densità, ha realizzato una indagine comparativa a livello internazionale per la scelta della ditta a cui commissionare le analisi e ha promosso la messa a punto di protocolli standard per l'estrazione e la normalizzazione del DNA.

## RISULTATI

Per tutte e 7 le specie (Bovino, Ovino, Capra, Bufalo, Suino, Cavallo, Asino) oggetto di indagine sono stati ottenuti risultati di interesse, diretto e indiretto, ai fini della selezione. Per alcune specie (bovini e cavalli) già sono in fase di trasferimento, o trasferiti, risultati che influiscono positivamente sulla velocità del progresso genetico o consentono di aumentare il numero di caratteri da sottoporre a selezione. Per le altre specie sono molteplici i risultati relativi a caratteri

sia già in selezione sia di nuova introduzione, per i quali è in atto un attento esame per un possibile trasferimento negli schemi selettivi a breve-medio termine.

Di seguito vengono riportati sinteticamente i risultati di maggiore rilievo ottenuti dal progetto seguendo lo schema: specie/razza/metodologia/carattere. La analisi dettagliata di tutti i risultati è sviluppata nelle relazioni delle singole Unità di Ricerca.

### *Bovini*

*Selezione genomica.* I risultati riguardano parametri quanto-qualitativi della produzione di latte e di carne, della riproduzione, dello stato di salute e della tracciabilità dei prodotti.

La applicazione in via sperimentale di questa metodologia ha richiesto una forte interazione dei gruppi di ricerca coinvolti e delle Associazioni per definire la raccolta (materiale biologico e dati) e la preparazione (estrazione e normalizzazione del DNA) dei campioni e i modelli di calcolo dei valori genetici genomici (GEBV). Per il calcolo dei GEBV sono stati applicati diversi modelli di analisi (analisi delle componenti principali (PCA), Bayes A e Bayes B, BLUP-AM, Single Value Decomposition) e sviluppati numerosi software, al fine di ottenere dei valori di accuratezza elevata. Il metodo PCA, messo a punto dal Progetto, è risultato efficace nel ridurre il numero di predittori per il GEBV degli animali, con accuratezze pressoché simili a quelle ottenute con tutti i marcatori, ma con una velocità di calcolo enormemente superiore. La validità del modello ha avuto conferma dalla pubblicazione, del modello stesso, sulla rivista scientifica di settore a più elevato IF. È stato effettuato anche un confronto tra i valori di GEBV che si ottengono utilizzando la matrice di parentela genealogica e quella genomica. La correlazione fra gli indici stimati con le due matrici è risultata molto alta.

I risultati sperimentali della selezione genomica sono stati già presi in esame dalle ANA interessate ai fini applicativi. Questo ha consentito alle ANA di aprire tempestivamente e in condizione pressoché paritarie, collaborazioni internazionali nei piani di selezione, come era negli obiettivi generali del progetto. Tutti i software utilizzati per il controllo qualità del dataset e per l'analisi dei dati genomici sono stati resi disponibili alle ANA.

Inoltre i risultati ottenuti dalla genotipizzazione con i 54K SNP su oltre 3000 tori per le cinque razze bovine (due da latte, due da carne e una a duplice attitudine), sono stati utilizzati per l'analisi di Genome Wide Association (GWA) e della struttura genetica delle razze.

Mediante la GWA sono state identificate, per tutte e 5 le razze, regioni sui diversi cromosomi associate con diversi caratteri qualitativi/quantitativi per latte, carne e per la fertilità. Nelle razze Frisona, Bruna, e Pezzata Rossa un forte picco di probabilità di associazione con il carattere contenuto di grasso del latte è stato individuato sul cromosoma 14 nella regione in cui mappa il gene DGAT1. Nella razza Pezzata Rossa sono stati individuati numerosi picchi di probabilità di associazione (appena al di sopra della soglia di significatività) per l'accrescimento giornaliero, mentre la regione del cromosoma 18 in cui mappa il gene FTO (fat mass and obesity associated) è stata trovata associata con il carattere facilità di parto. Nella razza Piemontese un forte picco di probabilità è sul cromosoma 6 nella regione in cui mappa il gene LAP3 (conosciuto anche come ossitocina) indicante l'associazione con il carattere facilità di parto. Per quanto riguarda il carattere mastite lo studio di associazione ha rilevato, nella razza Frisona, che due regioni cromosomiche sono associate, con alta significatività, al valore di SCC (Somatic Cell Count): una regione sul cromosoma 14 e una regione sul cromosoma 6.

Mediante la stima, sia del linkage disequilibrium (LD) su tutto il genoma sia del parametro  $F_{st}$  (che stima la distanza genetica tra due popolazioni), sono state identificate regioni cromosomiche "potenzialmente" sotto differente intensità di selezione nelle diverse razze. Ad es. la regione del cromosoma 2, in cui mappa il gene GDF8 (miostatina), risulta fortemente selezionata nella sola razza Piemontese.

*Geni candidati.* L'analisi di geni candidati nelle razze Bruna, Frisona e Pezzata Rossa, basata sulla ricerca delle relazioni tra un numero definito di SNP e i caratteri di interesse, ha evidenziato una associazione significativa tra gli SNP e gli EBV di quantità di latte, grasso e proteine, e percentuale di proteine. Per la Frisona e la Bruna l'associazione è stata riscontrata anche per la percentuale di grasso.

Nella razza Piemontese solo due SNP (di 24 analizzati) localizzati nei geni LEP e LEPR (sui 13 geni presi in esame), sono stati trovati associati significativamente con i caratteri di muscolosità e la muscolosità aggregata. Un aplotipo presente nel gene GHR è risultato fortemente associato con l'indice di accrescimento medio giornaliero (AMG).

Nelle razze Marchigiana e Chianina è risultata una associazione significativa tra 8 SNP presenti in 12 geni candidati e i caratteri: i) peso vivo all'età di un anno, ii) AMG e iii) muscolosità.

Lo studio di associazione di 141 SNP in 27 geni candidati per la risposta immunitaria, condotto su bovine di razza Frisona positive/negative per la paratubercolosi, non ha rilevato nessun polimorfismo significativo. Mentre



un esperimento condotto in parallelo nelle razze Jersey, Bruna, Limousine, Piemontese, Belgian Blue e Frisona, su uno SNP nel gene IL27, ha dimostrato un'associazione significativa negli animali di razza Jersey positivi al test per la paratubercolosi.

La ricerca *in vitro* sullo stress termico ha messo in evidenza la associazione tra un aplotipo presente nel gene HSP70.1 e una miglior termotolleranza cellulare. Si attendono i risultati della genotipizzazione rispetto ai polimorfismi di questo gene, in oltre 600 tori di razza Frisona analizzati dal progetto per la GS, e la associazione con caratteri produttivi e funzionali.

Lo studio condotto, in Frisone, su geni associati con il Bovis Herpes Virus 1 (BHV-1) ha evidenziato che un aplotipo nel gene TLR9 è significativamente associato con una cattiva risposta immunitaria e SNP singoli nel gene TLR4 sembrano conferire una maggiore resistenza nei confronti delle infezioni.

Risultati sono attesi anche dallo studio di associazione tra 16 SNP analizzati in 8 geni candidati per azione antibatterica e gli EBV per SSC in tori di razza Frisona.

*QTL.* Nelle razze Frisona e Bruna l'analisi di QTL sui cromosomi 14 e 20 ha portato alla identificazione di nuovi QTL e di nuovi geni candidati con effetto su qualità e quantità del latte.

*Proteomica.* L'analisi proteomica delle proteine estratte da campioni di muscolo bovino (razza Marchigiana), prelevati al momento della macellazione, ha prodotto mappe proteiche bidimensionali utili per individuare spot proteici da associare a caratteri della qualità della carne.

È stato isolato un marcatore proteico utile per la tracciabilità delle cagliate e del fiordilatte. Questo risultato, per il rilevante interesse generale ai fini della lotta alle frodi commerciali ha già determinato il deposito di un apposito brevetto, partecipato anche direttamente dall'Associazione Italiana Allevatori.

Infine è stata analizzata l'azione ACE inibitoria e ipotensiva di peptidi liberati dalle proteine del latte e del formaggio Parmigiano Reggiano, mediante l'azione di enzimi proteolitici, accertata *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, e la diversa capacità mineralizzante di caseinofosopeptidi sintetici, presenti in varianti differenti della  $\beta$  e dell' $\alpha$ -caseina bovina. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un'azione ACE inibitoria degli estratti sia proteici totali che dei caseinati del latte, sia della frazione solubile del Parmigiano Reggiano. L'azione ACE inibitoria è risultata particolarmente elevata per le singole frazioni caseiniche e per uno di 6 nuovi peptidi sintetici analizzati dal progetto: il peptide VIPNNHIIP, presente solo nelle varianti A1 e B della  $\beta$ -caseina, ha dato un valore di  $IC_{50}$  pari a 28,23  $\mu$ M, che lo colloca al 5° posto tra i peptidi noti a

più forte azione ACE inibitoria. Nessuna differenza significativa invece è stata riscontrata, per i valori di ACE inibizione, tra i caseinati del latte di bovine con un differente genotipo al locus delle caseine. Un forte effetto ipotensivo è risultato (in ratti ipertesi) per l'estratto solubile di Parmigiano Reggiano. In merito è in valutazione il deposito di un brevetto.

Per quanto riguarda la capacità mineralizzante i caseinofosfopeptidi derivanti da alcune varianti della  $\beta$ -caseina (tutte tranne la C) presentano una forte azione.

### *Suini*

Sono stati ottenuti risultati sui caratteri quanti-qualitativi della carne e su quelli riproduttivi.

*Geni candidati.* Lo studio di associazione di 763 SNP in oltre 100 geni candidati nella razza Large White (LW) e parte di questi nella razza Duroc (quelli risultati più interessanti nella razza LW) ha identificato un'associazione significativa per diversi SNP con: i) l'indice AMG nella razza LW e nella razza Duroc, ii) lo spessore del lardo dorsale nella razza LW e nella razza Duroc, iii) i tagli magri nella razza LW e nella razza Duroc, iv) l'indice di conversione alimenti nella razza LW e nella razza Duroc, v) il grasso intramuscolare visibile nella sola razza Duroc, e infine vi) il potenziale glicolitico (per uno SNP) nella razza LW e con il pH1 (per due SNP) nella razza LW.

L'analisi di associazione per l'individuazione di marcatori in geni candidati per l'efficienza riproduttiva nelle scrofe ha rilevato che su 30 SNP in 30 geni candidati, solo quelli presenti in 5 loci (CYP21, GPX5, MAN2B2, RBP4 e TGFBR1) sono associati significativamente con gli EBV per numero di suinetti nati vivi.

L'Associazione Nazionale dei suini sta avviando con la UO suini la valutazione dei risultati ottenuti su geni candidati sia per caratteri già oggetto di selezione sia per nuovi caratteri a bassa ereditabilità o di difficile rilevamento (caratteristiche riproduttive e caratteristiche qualitative della carne che richiedono esami di laboratorio lunghi e costosi).

*Trascrittomica.* In suini sottoposti a stress premacellazione delle razze LW e Duroc sono stati individuati rispettivamente 348 e 345 geni differenzialmente espressi. La validazione è stata fatta mediante real-time PCR, per 6 geni. Mediante trascrittomica è stata valutata l'influenza dei polimorfismi presenti nella regione del promotore sull'efficienza di trascrizione dei geni SCD, LDLR e LEP. Sia per il gene SCD che per il gene LDLR è risultata una

differente efficienza di trascrizione a seconda del polimorfismo presente nel promotore.

*Proteomica.* Il confronto di campioni di fiocco fresco ottenuti dai tipi genetici Casertana e Calabrese, e dall'ibrido commerciale PEN AR LAN ha evidenziato la presenza di proteine differenzialmente espresse sia tra la Casertana e l'ibrido sia tra Casertana e Calabrese. In particolare le proteine leucina-amino-peptidasi, adenilato chinasi, DJ-1 e HSP70 sono risultate più abbondanti nella Casertana rispetto al PEN AR LAN, mentre le proteine DJ-1 e mioglobina sono risultate maggiormente espresse nella Calabrese rispetto alla Casertana e la tioredossina è più abbondante nella Casertana rispetto alla Calabrese. Il fine utile di questi risultati di proteomica è utilizzare le proteine differenzialmente espresse come biomarcatori per l'analisi di rintracciabilità delle razze analizzate.

### *Ovini e caprini*

Le linee di ricerca che hanno riguardato la produzione di latte in razze delle specie ovine e caprine hanno dato risultati sia per caratteri già sotto selezione sia per caratteri riguardanti particolari caratteristiche nutrizionali del latte, quali i CLA (conjugate linoleic acid), favorevoli alla salute umana, non presenti negli schemi attuali di selezione.

*Geni candidati.* Nelle razze ovine Comisana e Massese un polimorfismo nel gene SCD è risultato associato significativamente con la percentuale di proteine nel latte, mentre nella sola razza Comisana è associato anche con la quantità di latte e di proteine. Lo stesso SNP ( ma l'altro allele), in entrambi le razze, è risultato associato significativamente con la quantità di acido oleico e di acidi grassi saturi. Per il gene DGAT1 è stata dimostrata un'associazione significativa, considerando insieme le due razze, con acidi grassi sia insaturi sia saturi.

In razze ovine da carne è stato condotto uno studio con 8 SNP in 8 geni candidati su arieti delle razze Appenninica, Bergamasca, Biellese, Gentile di Puglia, Laticauda e Merinizzata per i quali la AssoNaPa disponeva di pesi a età tipiche (0, 30, 45, 60, 180, 360d) e relativi incrementi ponderali, indici di performance e valutazioni morfologiche (caratteristiche di razza e attitudinali, conformazione e vello). Sono state valutate le frequenze alleliche e genotipiche e la distribuzione dei genotipi rispetto ai caratteri considerati. Sono attesi i risultati dell'analisi di associazione in fase di ultimazione.

Per la specie caprina, in 12 differenti razze, sono stati analizzati 27 SNP nei geni ACACA, FASN, LPL, DGAT1 e SCD e dall'analisi di associazione è

risultato che 4 SNP sono associati significativamente con la quantità di grasso sia nella razza Saanen che nella razza Camosciata delle Alpi; mentre nella sola razza Saanen, due SNP nel gene ACACA sono associati significativamente con la percentuale di grasso.

*QTL.* Nella razza ovina Sarda, mediante l'uso di una mappa a elevata densità, è stata confermata l'esistenza di un QTL sul cromosoma 7 che influenza i contenuti percentuali di grasso e proteina del latte ed è stato identificato un nuovo QTL sullo stesso cromosoma con effetti sulle quantità di latte, grasso e proteina.

L'ASSONAPA ha mostrato interesse in particolare per i risultati sui geni candidati che sono associati significativamente con particolari acidi grassi insaturi presenti nel latte ovino. Sulla base di questi risultati l'AssoNaPa ha all'esame l'ampliamento dell'indagine su un maggior numero di riproduttori al fine di selezionare i genotipi positivi per la produzione di latte con caratteristiche nutritive favorevoli alla salute umana.

### *Bufali*

*Geni candidati.* Nella specie bufalina tre polimorfismi nel gene ossitocina sono risultati associati significativamente con la velocità di mungitura e la quantità di latte prodotto. Uno SNP nel gene DGAT1 è risultato correlato con la percentuale di grasso; risultati sono attesi dall'analisi di correlazione tra SNP nella regione del promotore del gene SCD e SNP nel gene ACACA e quantità di latte, percentuale di grasso e di proteina totale e frazioni proteiche.

Gli studi sui geni implicati nella brucellosi hanno evidenziato che gli animali sono eterogenei rispetto alla trasmissione dell'infezione e il controllo della brucellosi può avvenire attraverso l'eliminazione selettiva dei soli animali che liberano nel latte una carica elevata di *B. abortus*. Tali animali possono essere selezionati in base all'aplotipo per i polimorfismi nei geni NRAMP1 e MBL.

L'ANASB (Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina) sta valutando la possibilità di utilizzare, negli schemi di selezione, i risultati ottenuti sui geni implicati con la velocità di mungitura. L'ANASB altresì ha preso in esame la possibilità di utilizzare per le mozzarelle di bufala la stessa metodologia messa punto per le cagliate di latte bovino, allo scopo di accertare eventuali frodi commerciali.

### *Cavallo*

*Geni candidati.* Lo studio di quattro SNP in due geni candidati, IL6 e TNF $\alpha$ ,

in cavalli sottoposti a stress da gara, ha evidenziato differenze importanti tra i genotipi rispetto agli oligoelementi presenti nel sangue in condizione di forte stress ossidativo quale si determina a fine gara.

I risultati ottenuti sui geni implicati nel colore del mantello sono stati già trasferiti dalle Associazioni Allevatori nella programmazione degli accoppiamenti per eliminare il mantello sauro, indesiderato.

*Trascrittomica.* Per il cavallo sono stati ottenuti risultati interessanti dagli studi di trascrittomica condotti per rilevare geni implicati con lo stress da esercizio e dagli studi sul DNA mitocondriale. Sono stati individuati geni differenzialmente espressi in cavalli da endurance prima e dopo lo stress da gara. È in corso la validazione, mediante real-time PCR, di 25 geni.

*DNA mitocondriale.* Anche i risultati ottenuti dalla ricerca sul DNA mitocondriale sono stati già trasferiti, utilizzando l'informazione relativa all'aplogruppo, per identificare con certezza la linea da cui discende il riproduttore.

#### FORMAZIONE

La Formazione di tecnici e dirigenti delle strutture di miglioramento genetico sugli sviluppi teorici e applicativi della genetica molecolare ha dato luogo all'organizzazione di giornate di formazione negli anni 2008, 2009, 2010. Sono stati prodotti tre DVD, a video animazione su i seguenti argomenti: *Elementi di genetica di base*, *Tecnologie innovative di genotipizzazione* e *Principi di Selezione Genomica*. La qualità della trattazione fa prevedere l'impiego dei DVD in ambito didattico anche al di fuori delle strutture di selezione.

#### BANCHE DATI

Sono da considerare risultati del progetto anche la realizzazione di due banche dati. Una che raccoglie tutti i risultati ottenuti dal progetto SELMOL/AIA (<http://88.49.249.148>), il cui accesso e uso dei dati è appositamente regolamentato. Un'altra implementata entro il sito [www.selmol.eu](http://www.selmol.eu), che contiene 119 peptidi ACE inibitori (sequenza aminoacidica, valore di ACE inibizione, riferimento bibliografico) che integrano di circa il 25% il numero di peptidi presenti entro il sito pubblico BIOPEP ([www.uwm.edu.pl/biochemia](http://www.uwm.edu.pl/biochemia)).

## PUBBLICAZIONI

I risultati scientifici ottenuti dal progetto Selmol, nei 3 anni della sua realizzazione, sono stati concretizzati, a oggi, in 48 pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali con IF, lavori presentati in congressi qualificati internazionali (84) e nazionali (58). Inoltre numerose sono le pubblicazioni in fase di preparazione.

Infine tra i risultati del progetto vanno considerati anche i molteplici protocolli sperimentali prodotti dalle Unità di Ricerca, che potranno costituire importanti strumenti di lavoro per la comunità scientifica.

In particolare va sottolineata la forte azione di interazione promossa dal progetto tra i ricercatori che operano nel campo della genetica molecolare in Italia. La sollecitazione svolta dal progetto nei loro riguardi a finalizzare le ricerche verso il miglioramento genetico potrà essere di beneficio assoluto per la selezione degli animali in Italia e in ambito internazionale. In sostanza, sotto il profilo organizzativo si è costituito un vero e proprio network che, se opportunamente gestito anche dopo il termine del progetto, potrà risultare di grande utilità per la presenza qualificata in ambito internazionale della ricerca italiana, come già testimoniano alcune proposte di collaborazione a ricercatori del progetto da parte di organismi di elevata qualificazione scientifica internazionale. Anche la partecipazione italiana a progetti di ricerca internazionali potrà trarre beneficio dalla realizzazione del progetto Selmol.

Unità operativa carne suina





## Relazione del coordinatore

La conoscenza del genoma rappresenta lo strumento più importante per introdurre rilevanti innovazioni nel campo del miglioramento genetico dei suini.

L'obiettivo generale del progetto di ricerca è stato quello di individuare geni utili per il miglioramento genetico della produzione e della qualità della carne suina.

Gli obiettivi specifici miravano alla:

- ricerca di geni che determinano le caratteristiche già oggetto di selezione quali velocità di crescita, indice di conversione, spessore del lardo, peso della coscia e dei tagli magri;
- ricerca di geni responsabili di altre caratteristiche ritenute importanti, ma che non sono prese in considerazione nei programmi di selezione per la loro scarsa ereditabilità o per difficoltà della loro rilevazione (caratteristiche riproduttive, caratteristiche qualitative della carne che richiedono esami di laboratorio lunghi e costosi);
- ricerca e identificazione nelle razze e popolazioni suine italiane dei geni responsabili degli effetti QTL individuati;
- ricerca di SNP nei suddetti geni;
- verifica della frequenza e dell'associazione dei polimorfismi di questi geni con i caratteri di interesse per la selezione nelle popolazioni suine italiane
- verifica dell'effetto di alcuni polimorfismi sul livello di espressione genica
- applicazione di tecniche di trascrittomica e di proteomica per la ricerca di geni candidati per la qualità della carne;
- sviluppo di modelli per l'integrazione dei risultati ottenuti nei sistemi esistenti di miglioramento.

\* *Università di Bologna, Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare*

I risultati ottenuti nel triennio e riportate per linee di ricerca nelle relazioni delle singole Unità di ricerca sono stati molteplici, rilevanti e in molti casi trasferibili o suscettibili di applicazione pratica al miglioramento genetico dei suini.

VINCENZO RUSSO\*

## Ricerca di marcatori associati con caratteristiche produttive e qualitative della carne e della carcassa\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

La suinicoltura italiana è unica a livello mondiale perché orientata in larga parte alla produzione di prosciutti DOP, quali quelli di Parma e San Daniele, oltre che a numerosi altri prodotti trasformati di alta qualità. La qualità della carne e della carcassa rappresentano aspetti fondamentali per queste produzioni. Il miglioramento di queste caratteristiche oltre all'efficienza di tutti i caratteri produttivi sono obiettivi della selezione nel suino pesante. L'antagonismo tra caratteri produttivi e qualitativi rappresenta tuttavia un limite alla selezione. In particolare, la produzione di prosciutti stagionati richiede il giusto livello del lardo di copertura. Questo carattere è a sua volta correlato in modo sfavorevole con altri caratteri produttivi quali velocità di accrescimento ed efficienza di trasformazione degli alimenti. L'identificazione di marcatori associati con lo spessore del lardo dorsale e con altri caratteri produttivi e qualitativi rappresenta una possibilità in più per aumentare l'efficienza della selezione superando, almeno in parte, i limiti dovuti alla specificità della suinicoltura italiana. Fino a ora solo pochi marcatori sono stato utilizzati in studi di associazione nelle razze pesanti italiane.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di identificare marcatori SNP in geni candidati per diversi caratteri produttivi e qualitativi con particolare riferimento al deposito di grasso e valutare il loro effetto sui caratteri oggetto di selezione nel suino pesante e altri caratteri qualitativi della carne potenzialmente interessanti per il miglioramento delle caratteristiche della carne ai fini della trasformazione in prosciutti stagionati.

\* *Università di Bologna, Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare*

\*\* *Unità di ricerca Università di Bologna, responsabile scientifico prof. Vincenzo Russo*

## MATERIALE E METODOLOGIE

L'identificazione di marcatori SNP in geni candidati è stata effettuata utilizzando diversi approcci:

- analisi della letteratura;
- analisi *in silico* delle sequenze depositate in banca dati mediante la costruzione di una apposita pipeline;
- risequenziamento di geni.

Lo studio di associazione tra i polimorfismi identificati e lo spessore del lardo dorsale è stato effettuato utilizzando diversi gruppi di suini di razza Large White Italiana, Duroc Italiana e una popolazione commerciale. In particolare, per la razza Large White Italiana sono stati utilizzati i seguenti gruppi di suini provenienti dalle prove di sib-test effettuate dall'ANAS:

- 560 suini estremi per l'indice genetico spessore del lardo dorsale (280 con indice negativo e 280 con indice positivo) (primo esperimento di selective genotyping);
- 300 suini di tre gruppi, ciascuno composto da 100 animali, costituiti da 50 animali con indice positivo e 50 con indice negativo, rispettivamente per i caratteri incremento medio giornaliero (IMG), tagli magri (TM) e spessore del lardo dorsale (SLD) (secondo, terzo e quarto esperimento di selective genotyping);
- 270 suini non selezionati sulla base di alcun criterio (gruppo random).

Per questi animali erano disponibili gli indici genetici calcolati dall'ANAS per caratteri oggetto di selezione. Inoltre per il gruppo random sono stati determinati diversi parametri qualitativi della carne (pH1, pH2, potenziale glicolitico, attività catepsinica del muscolo semimembranoso).

Per quanto riguarda la razza Duroc Italiana sono stati utilizzati i seguenti gruppi di suini provenienti dalle prove di sib-test effettuate dall'ANAS:

- un gruppo di 100 suini estremi per l'indice genetico grasso intermuscolare visibile (50 con indice positivo e 50 con indice negativo);(quinto esperimento di selective genotyping);
- un gruppo di circa 300 animali non selezionati sulla base di alcun criterio (gruppo random).

Per questi suini erano disponibili gli indici genetici calcolati dall'ANAS per caratteri oggetto di selezione.

Infine, per l'analisi di associazione è stata utilizzata una popolazione commerciale di circa 150 suini sui quali sono stati determinati diverse misure e parametri legati al deposito di grasso.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Per quanto riguarda l'analisi di associazione nel gruppo dei 560 suini di razza Large White Italiana utilizzati nell'esperimento di selective genotyping, gli SNP sono stati selezionati utilizzando i tre criteri sopra indicati. Dall'analisi della letteratura sono stati scelti 131 SNP in geni già segnalati essere associati con caratteri legati al deposito di grasso in diverse popolazioni suine. Altri 60 geni sono stati scelti sulla base del loro ruolo nei processi legati direttamente o indirettamente al metabolismo energetico e al deposito di grasso. Il sequenziamento di parti di questi geni in un pannello di suini di diverse razze ha permesso di identificare 84 SNP di cui 67 sono stati scelti per l'analisi di associazione con il carattere spessore del lardo dorsale. L'analisi *in silico* effettuata su 3 milioni di EST (expressed sequence tags) depositate in banca dati ha permesso di identificare 7976 SNP in un pannello allargato di geni candidati ottenuto mediante analisi dell'interattoma con la banca dati STRING. Di questi SNP identificati *in silico*, 565 sono stati scelti per l'analisi di associazione.

In totale, sommando gli SNP scelti per la genotipizzazione e identificati in diversi modi sono stati analizzati 763 SNP. Questi SNP sono stati genotipizzati con il sistema GoldenGate dell'Illumina sui 560 suini di razza Large White Italiana estremi per l'indice genetico spessore del lardo dorsale. Per 86 SNP il test di analisi con il sistema GoldenGate non ha dato alcun risultato. Dei rimanenti 677 SNP, 169 sono risultati monomorfi, 187 hanno presentato una frequenza dell'allele più raro (MAF) al di sotto del 5% e per questo sono stati esclusi da ulteriori analisi, 321 SNP con  $MAF > 5\%$  sono stati utilizzati per le successive elaborazioni.

Di questi 321 SNP, 65 hanno mostrato differenze significative ( $P < 0,10$ ) delle frequenze alleliche tra i due gruppi estremi. Correggendo i livelli di significatività per test multipli con una procedura indicata come Proportion of False Positives (PFP), 30 SNP sono risultati significativi con un valore di PFP  $< 0,20$ . Alcuni di questi SNP risultati molto significativi sono riportati in tabella 1.

Dei geni individuati mappano in regioni QTL per lo spessore del lardo dorsale già identificate in altri studi. In particolare, per quanto riguarda la mutazione nel gene MC4R (Asp298Asn) già diversi altri studi avevano messo in evidenza il suo effetto su diversi altri caratteri (accrescimento, conversione degli alimenti, ecc.) oltre che sul livello di deposito di grasso. Il ruolo specifico di altri geni sullo spessore del lardo dorsale rimane in molti casi ancora da chiarire. Tuttavia, i risultati ottenuti aprono prospettive per capire il loro ruolo nei meccanismi biologici che portano all'accumulo di grasso.

GENE	P	SNP	CROMOSOMA	ORIGINE SNP
TBC1D1	0,000137	G>A	SSC8	Risequenziamento
CALR	0,000601	A>G	SSC2	Analisi <i>in silico</i>
NT5E	0,000937	T>C	SSC1	Analisi <i>in silico</i>
RRAGD	0,002064	T>C	SSC1	Letteratura
MC4R	0,002220	A>G	SSC1	Letteratura

Tab. 1 *Risultati dell'esperimento di selective genotyping nei 560 suini di razza Large White Italiana*

Alcuni geni sono stati studiati più in dettaglio o gli studi di associazione sono stati condotti nelle altre popolazioni riportate. Tra questi, risultati particolarmente interessanti sono stati ottenuti per i geni FTO, PCSK1, TBC1D1, MC4R e CTSK. Questi geni sono stati scelti perché nell'uomo e nel topo sono associati a diversi caratteri legati all'obesità. In particolare, polimorfismi nel gene FTO nell'uomo sono stati associati all'obesità comune. Nel gene FTO suino abbiamo sequenziato tutti gli esoni e identificato alcuni polimorfismi che sono risultati associati con il grasso intermuscolare visibile (GIV) nella razza Duroc Italiana e a diversi caratteri legati al deposito di grasso in popolazioni commerciali. Per quanto riguarda il gene PCSK1 sono stati sequenziati completamente i 14 esoni e parti delle regioni introniche. I 13 SNP identificati sono disposti in 9 aplotipi diversi. Due SNP analizzati sono risultati essere associati con tutti i caratteri oggetto di selezione nelle razze Large White Italiana e Duroc Italiana. I risultati ottenuti per il gene TBC1D1 nell'esperimento di selective genotyping con 560 suini di razza Large White Italiana sono stati confermati in un campione indipendente di animali. Conferma dei risultati dell'esperimento di selective genotyping con i 560 suini è stata ottenuta nello studio di associazione nelle popolazioni random di razza Large White Italiana e Duroc Italiana. Questo marcatore è risultato associato a molti altri caratteri produttivi. Questi dati confermano l'effetto di questo marcatore già identificato in altre popolazioni suine da altri autori. Un marcatore nel gene CTSK è risultato essere associato con grasso intermuscolare visibile e spessore del lardo dorsale nella razza Duroc Italiana.

Tra gli altri geni studiati sulla base delle indicazioni in letteratura, particolarmente interessante è risultato il marcatore nel gene IGF2 intron3-g.3072G>A, già riportato come essere il responsabile del QTL con imprinting paterno localizzato sul cromosoma 2 di suino. Questo marcatore è risultato il più significativo per tutti i caratteri produttivi (spessore del lardo dorsale, tagli magri, incremento ponderale giornaliero, indice conversione alimenti e

peso cosce) tra tutti quelli analizzati nella razza Large White Italiana in tutti i gruppi di suini considerati. Nessun effetto è stato evidenziato per i caratteri qualitativi della carne. Tuttavia questo marcatore è risultato fissato nella razza Duroc Italiana. Nella stessa regione del gene IGF2 abbiamo identificato un marcatore nel gene CTSD. Per questo marcatore è stato possibile mettere in evidenza un effetto indipendente da quello del polimorfismo IGF2 intron3-g.3072G>A, sia nella razza Large White Italiana che nella razza Duroc Italiana, ponendo le basi per il miglioramento della selezione assistita da marcatori che è già in corso utilizzando la mutazione nel gene IGF2 in altre popolazioni suine.

Un altro marcatore risultato altamente significativo ( $P < 0,001$ ) per quasi tutti i caratteri produttivi nella razza Duroc Italiana è un SNP nel gene miopalladina.

Molti altri SNP in diversi geni candidati sono risultati significativi su caratteri oggetto di selezione. Altri polimorfismi sono risultati statisticamente significativi sui caratteri qualitativi misurati sul muscolo semimembranoso in suini di razza Large White Italiana.

La tabella 2 riassume i risultati ottenuti dall'analisi di SNP in geni candidati nelle popolazioni random e nei gruppi dei 100 suini nei quattro esperimenti di selective genotyping.

In termini applicativi, l'identificazione di marcatori associati con i caratteri oggetto di selezione e altri caratteri qualitativi mette a disposizione gli strumenti per l'implementazione di nuove strategie di selezione per il miglioramento genetico dei suini italiani.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Luca Fontanesi (Ricercatore)  
 Roberta Davoli (Professore ordinario)  
 Stefania Dall'Olio (Professore associato)  
 Leonardo Nanni Costa (Professore ordinario)  
 Paolo Zambonelli (Ricercatore)  
 Emilio Scotti (Tecnico)  
 Silvia Braglia (Assegnista)  
 Michela Colombo (Dottoranda)  
 Greta Gandolfi (Dottoranda)  
 Marco Comella (Dottorando)  
 Francesca Bertolini (Dottoranda)  
 Camilla Speroni (Dottoranda)  
 Lucia Tognazzi (Assegnista)

RAZZA	GENE	CROMOSOMA	P (POPOLAZIONE RANDOM)	P (SELECTIVE GENOTYPING)	CARATTERE
Large White	IGF2	2	2,7E-14	4,41E-6	IMG
Large White	CTSD	2	0,00001	0,0002	IMG
Large White	PKM2	7	0,0005	NT	IMG
Large White	PCSK1 AluI	2	0,0012	NT	IMG
Large White	CTSL	10	0,003	0,331	IMG
Large White	PCSK1 TaaI	2	0,0035	NT	IMG
Large White	CAST	2	0,004	NT	IMG
Large White	CTSZ	17	0,006	NT	IMG
Large White	MC4R	1	0,015	NT	IMG
Large White	CTSF	2	0,008	0,128	IMG
Large White	CTSH	7	0,032	NT	IMG
Large White	CSTB	13	0,099	NT	IMG
Duroc	MYPN	14	5,0E-12	NT	IMG
Duroc	PCSK1 AluI	2	9E-06	NT	IMG
Duroc	PCSK1 TaaI	2	0,0002	NT	IMG
Duroc	CTSD	2	0,0008	NT	IMG
Duroc	MC4R	1	0,016	NT	IMG
Duroc	CTSK	4	0,026	NT	IMG
Large White	IGF2	2	2,20E-09	3,16E-15	SLD
Large White	MC4R	1	1E-06	NT	SLD
Large White	CTSD	2	0,0007	0,276	SLD
Large White	CTSL	10	0,011	0,0006	SLD
Large White	CTSF	2	0,02	NT	SLD
Large White	PKM2	7	0,03	NT	SLD
Large White	CTSS	4	0,046	NS	SLD
Large White	TRIB3	17	0,07	0,016	SLD
Large White	TBC1D1	8	0,378	0,019	SLD
Duroc	MYPN	14	9,70E-09	NT	SLD
Duroc	CTSD	2	0,0002	NT	SLD
Duroc	PCSK1 AluI	4	0,0044	NT	SLD
Duroc	FTO	6	0,007	NT	SLD
Duroc	CTSL	10	0,085	NT	SLD
Duroc	PCSK1 TaaI	4	0,091	NT	SLD
Duroc	TRIB3	9	0,098	NT	SLD
Large White	IGF2	2	2,20E-18	9,53E-20	TM
Large White	CTSD	2	2,90E-08	0,00068	TM

Tab. 2 Alcuni risultati ottenuti dall'analisi di SNP in diversi geni candidati. IMG, incremento medio giornaliero; SLD, spessore del lardo dorsale; TM, tagli magri; ICA, indice conversione alimenti; GIV, grasso intermuscolare visibile; NT, non analizzato (segue)



RAZZA	GENE	CROMOSOMA	P (POPOLAZIONE RANDOM)	P (SELECTIVE GENOTYPING)	CARATTERE
Large White	PKM2	7	0,0009	NT	TM
Large White	PGAM2	18	0,093	NT	TM
Large White	CTSF	2	0,001	0,561	TM
Large White	PCSK1 AluI	2	0,006	NT	TM
Large White	CTSZ	17	0,01	NT	TM
Large White	CTSL	10	0,016	0,004	TM
Large White	PCSK1 TaaI	2	0,019	NT	TM
Large White	CTSS	4	0,071	NT	TM
Large White	TBC1D1	8	0,165	0,017	TM
Duroc	MYPN	14	2,70E-15	NT	TM
Duroc	MC4R	1	1E-06	NT	TM
Duroc	PCSK1 TaaI	2	7E-06	NT	TM
Duroc	CTSD	2	0,0001	NT	TM
Duroc	PCSK1 AluI	2	0,0007	NT	TM
Duroc	CTSK	4	0,003	NT	TM
Duroc	FTO	6	0,004	NT	TM
Duroc	CTSL	10	0,012	NT	TM
Duroc	CAST	2	0,062	NT	TM
Large White	IGF2	2	2,30E-09	NT	ICA
Large White	CTSD	2	0,0001	NT	ICA
Large White	CTSS	4	0,006	NT	ICA
Large White	FTO	6	0,012	NT	ICA
Large White	MC4R	1	0,024	NT	ICA
Large White	PKM2	7	0,025	NT	ICA
Large White	CTSH	7	0,028	NT	ICA
Large White	CTSZ	17	0,029	NT	ICA
Large White	PCSK1 TaaI	2	0,0412	NT	ICA
Large White	PCSK1 AluI	2	0,0904	NT	ICA
Duroc	MYPN	14	5,80E-11	NT	ICA
Duroc	MC4R	1	4,50E-07	NT	ICA
Duroc	CTSD	2	0,0008	NT	ICA
Duroc	CAST	2	0,005	NT	ICA
Duroc	PCSK1 AluI	4	0,0053	NT	ICA
Duroc	PCSK1 TaaI	4	0,0108	NT	ICA
Large White	IGF2	2	1,50E-06	NT	Cosce
Large White	CTSD	2	0,0002	NT	Cosce

Tab. 2 Alcuni risultati ottenuti dall'analisi di SNP in diversi geni candidati. IMG, incremento medio giornaliero; SLD, spessore del lardo dorsale; TM, tagli magri; ICA, indice conversione alimenti; GIV, grasso intermuscolare visibile; NT, non analizzato (segue)

RAZZA	GENE	CROMOSOMA	P (POPOLAZIONE RANDOM)	P (SELECTIVE GENOTYPING)	CARATTERE
Large White	TBC1D1	8	0,02	NT	Cosce
Large White	CTSZ	17	0,024	NT	Cosce
Large White	MC4R	1	0,045	NT	Cosce
Large White	PGAM2	18	0,048	NT	Cosce
Large White	CTSL	10	0,056	NT	Cosce
Large White	PCSK1 AluI	4	0,0812	NT	Cosce
Duroc	MYPN	14	7,90E-18	NT	Cosce
Duroc	MC4R	1	2,00E-08	NT	Cosce
Duroc	CAST	2	0,038	NT	Cosce
Duroc	PCSK1 AluI	4	0,0005	0,034	GIV
Duroc	MYPN	14	0,0055	0,00001	GIV
Duroc	FTO	6	0,007	0,000009	GIV
Duroc	PCSK1 TaaI	4	0,0181	NT	GIV
Duroc	CTSL	10	0,161	0,089	GIV
Large White	PRKAG3 T30N	14	0,019	NT	Lattato
Large White	PRKAG3 I199V	14	0,034	NT	pH1
Large White	CTSZ	17	0,046	NT	Glicogeno
Large White	TRIB3	17	0,067	NT	lactate
Large White	PRKAG3 T30N	14	0,06	NT	Potenziale glicolitico
Large White	PKM2	7	0,075	NT	pH1

Tab. 2 Alcuni risultati ottenuti dall'analisi di SNP in diversi geni candidati. IMG, incremento medio giornaliero; SLD, spessore del lardo dorsale; TM, tagli magri; ICA, indice conversione alimenti; GIV, grasso intermuscolare visibile; NT, non analizzato

## PRODOTTI

- Sequenze nucleotidiche
- Marcatori per la selezione
- Metodi di analisi

## TRASFERIMENTO

Marcatori associati con diversi caratteri produttivi nelle razze Large White Italiana e Duroc Italiana

## PUBBLICAZIONI

*Su riviste con impact factor*

- 1) FONTANESI L., DAVOLI R., NANNI COSTA L., BERETTI F., SCOTTI E., TAZZOLI M., TASSONE F., COLOMBO M., BUTTAZZONI L., RUSSO V. (2008): *Investigation of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: association with meat quality and production traits in Italian Large White pigs*, «Meat Science», 80, pp. 780-787.
- 2) RUSSO V., FONTANESI L., SCOTTI E., BERETTI F., DAVOLI R., NANNI COSTA L., VIRGILI R., BUTTAZZONI L. (2008): *Single nucleotide polymorphisms in several porcine cathepsin genes are associated with growth, carcass and production traits in Italian Large White pigs*, «Journal of Animal Science», 86, pp. 3300-3314.
- 3) FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DAVOLI R., RUSSO V. (2009): *The porcine fat mass and obesity associated (FTO) gene is associated with fat deposition in Italian Duroc pigs*, «Animal Genetics», 40, pp. 90-93.
- 4) DALL'OLIO S., DAVOLI R., BUTTAZZONI L., ZAMBONELLI P., RUSSO V. (2009): *Study of porcine adiponectin (ADIPOQ) gene and association of a missense mutation with EBVs for production and carcass traits in Italian Duroc heavy pigs*, «Livestock Science», 125, pp. 101-104.
- 5) FONTANESI L., SPERONI C., BUTTAZZONI L., SCOTTI E., NANNI COSTA L., DAVOLI R., RUSSO V. (2010): *Association between cathepsin L (CTSL) and cathepsin S (CTSS) polymorphisms and meat production and carcass traits in Italian Large White pigs*, «Meat Science», 85, pp. 331-338.
- 6) FONTANESI L., SPERONI C., BUTTAZZONI L., SCOTTI E., DALL'OLIO S., NANNI COSTA L., DAVOLI R., RUSSO V. (2010): *The IGF2 intron3-g.3072G>A polymorphism is not the only Sus scrofa chromosome 2p mutation affecting meat production and carcass traits in pigs: evidences from the effects of a cathepsin D (CTSD) gene polymorphism*, «Journal of Animal Science», doi:10.2527/jas.2009-2560.
- 7) FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., DAVOLI R., RUSSO V. (2010): *A single nucleotide polymorphism in the porcine cathepsin K (CTSK) gene is associated with back fat thickness and production traits in Italian Duroc pigs*, «Molecular Biology Reports», 37, pp. 491-495.

- 8) FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., BAGNATO A., LO FIEGO D.P., DAVOLI R., RUSSO V. (2010): *Confirmed association between a single nucleotide polymorphism in the FTO gene and obesity-related traits in heavy pigs*, «Molecular Biology Reports», 37, pp. 461-466.
- 9) FONTANESI L., COLOMBO M., TOGNAZZI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., DAVOLI R., RUSSO V. (in press): *The porcine TBC1D1 gene: mapping, SNP identification, and association study with meat, carcass and production traits in Italian heavy pigs*, «Molecular Biology Reports».
- 10) FONTANESI L., SPERONI C., BUTTAZZONI L., SCOTTI E., DALL'OLIO S., DAVOLI R., RUSSO V.: *Association between polymorphisms in cathepsin and cystatin genes with meat production and carcass traits in Italian Duroc pigs: confirmation of the effects of a cathepsin L (CTSL) gene marker*, Submitted.
- 11) FONTANESI L., COLOMBO M., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., BERTOLINI F., DALL'OLIO S., DAVOLI R., RUSSO V. (in press): *The porcine tribbles homolog 3 (TRIB3) gene: identification of a missense mutation and association analysis with meat quality and production traits in Italian heavy pigs*, «Meat Science».

*Su Atti di convegni*

- 1) RUSSO V., FONTANESI L., SCOTTI E., SPERONI C., BERETTI F., DAVOLI R., NANNI COSTA L., VIRGILI R., BUTTAZZONI L. (2008): *Identification and analysis of mutations in porcine cathepsin and cystatin genes: association with meat production and carcass traits in Italian heavy pigs*, Proceedings of the 59<sup>th</sup> EAAP Conference, Vilnius, Lithuania, August 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup>, 2008, (Abstract).
- 2) FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DAVOLI R., RUSSO V. (2008): *Identification of mutations in the fat mass and obesity associated (FTO) gene and association with fat deposition traits in heavy pigs*, Abstract: Proceedings of the 59<sup>th</sup> EAAP Conference, Vilnius, Lithuania, August 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup>, 2008, (Abstract).
- 3) FONTANESI L., SCOTTI E., DALL'OLIO S., BUTTAZZONI L., DAVOLI R., LO FIEGO D.P., RUSSO V. (2008): *Additional support for an association between the fat mass and obesity associated (FTO) gene and intermuscular fat deposition in Italian Duroc pigs*, Proceedings of the Second European Conference on Pig Genomics, Pig Genome II, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, June 4-5, 2008, p. 55, (Abstract).
- 4) FONTANESI L., TOGNAZZI L., COLOMBO M., SCOTTI E., BERETTI F., RUSSO V. (2008): *Investigation of several candidate genes for fatness and muscle mass deposition traits in pigs*, Proceedings of the Second European Conference on Pig Genomics, Pig Genome II, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, June 4-5, 2008, pp. 55-56, (Abstract).
- 5) RUSSO V., SPERONI C., BUTTAZZONI L., DAVOLI R., NANNI COSTA L., FONTANESI L. (2008): *Identification of mutations in the porcine cathepsin L (CTSL) and cathepsin S (CTSS) genes and association study between meat quality and production traits in Italian Large White pigs*, Proceedings of the Second European Conference on Pig Genomics, Pig Genome II, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, June 4-5, 2008, pp. 57-58, (Abstract).
- 6) COLOMBO C., FONTANESI F., TOGNAZZI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DAVOLI R., RUSSO V. (2009): *The porcine TBC1D1 gene: mapping, SNP identification, and association study*

- with meat, carcass and production traits in Italian Large White pigs*, Proceedings of the ASPA 18th Congress, Palermo, June 9-12, 2009, «Ital. J. Anim. Sci.», 8 (Suppl. 2), p. 195.
- 7) SPERONI C., FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., DAVOLI R., RUSSO V. (2009): *Association study between SNPs in cathepsin genes and production traits in Italian Duroc pigs*, Proceedings of the ASPA 18th Congress, Palermo, June 9-12, 2009, «Ital. J. Anim. Sci.», 8 (Suppl. 2), p. 236.
  - 8) FONTANESI L., SPERONI C., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., NANNI COSTA L., DAVOLI R., RUSSO V. (2009): *Effects of the CTSD g.70G>A and IGF2 intron3-g.3072G>A polymorphisms on meat production and carcass traits in pigs: evidences of the presence of additional QTN close to the imprinted IGF2 region of chromosome 2*, Book of Abstracts of the 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Barcelona, Spain, 24-27 August 2009, p. 164.
  - 9) FONTANESI L., SPERONI C., BUTTAZZONI L., SCOTTI E., DALL'OLIO S., NANNI COSTA L., DAVOLI R., RUSSO V. (2009): *The IGF2 intron3-g.3072G>A polymorphism is not the only SSC2p mutation affecting meat production and carcass traits in pigs: evidences from the effects of a cathepsin D (CTSD) gene marker*, Proceedings of the Pig Genome III Conference, The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, 2nd-4th November 2009.
  - 10) FONTANESI L., SCOTTI E., BUTTAZZONI L., BERTOLINI F., DALL'OLIO S., DAVOLI R., RUSSO V. (2009): *An obesity gene (PCSK1) is associated with obesity-related traits in Italian heavy pigs*, Proceedings of the Pig Genome III Conference, The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, 2nd-4th November 2009.
  - 11) FONTANESI L., COLOMBO M., BUTTAZZONI L., SCOTTI E., DALL'OLIO S., NANNI COSTA L., DAVOLI R., RUSSO V. (2009): *A missense mutation in the porcine tribbles homolog 3 (TRIB3) gene is associated with fat deposition and meat quality traits in Italian heavy pigs*, Proceedings of the Pig Genome III Conference, The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, 2nd-4th November 2009.
  - 12) FONTANESI L., SCOTTI E., GALIMBERTI G., CALÒ D.G., FRONZA R., COLOMBO M., MARTELLI P.L., BUTTAZZONI L., CASADIO R., RUSSO V. (2010): *Selective Genotyping Analysis of 677 SNPs to Identify Markers Associated with Back Fat Thickness in Italian Large White Pigs*, Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 1-6 August 2010, Leipzig, Germany.
  - 13) RUSSO V., SCOTTI E., BERTOLINI F., BUTTAZZONI L., DALL'OLIO S., DAVOLI R., FONTANESI L. (2010): *Single nucleotide polymorphisms in the porcine PCSK1 gene are associated with fat deposition and carcass traits in Italian Large White and Italian Duroc pigs*, Proceedings of the 61<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, August 23<sup>rd</sup>-27<sup>th</sup>, Heraklion, Crete Island, Greece.
  - 14) DAVOLI R., COMELLA M., BRAGLIA S., ZAMBONELLI P., VALASTRO V., BUTTAZZONI L. and RUSSO R.: *Quantitative real time approach to study expression profile of FASN and MC4R genes in skeletal muscle samples from Italian Large White and Italian Duroc pigs*, COST ACTION 925, Final meeting Cork (Ireland) 13th-14th May 2008.
  - 15) DAVOLI R., VALASTRO V., BRAGLIA S., BUTTAZZONI L. and RUSSO R.: *Association study of MC4R polymorphism with carcass and meat quality traits in Italian pig breeds*, Pig Genome II Conference, Ljubiana 4-5 June 2008.
  - 16) MATASSINO D., BRAGLIA S., COMELLA M., INCORONATO C., OCCIDENTE M., PANE E., PASQUARIELLO R., DAVOLI R.: *Study of SNP in genes related to fat and energy me-*

*tabolism and association with some carcass traits in Casertana pig ancient autochthonous genetic type*, Associazione Scientifica di Produzione Animale, XVIII Congresso Nazionale, Palermo, 9-12 giugno 2009.

- 17) BRAGLIA S., COMELLA M., ZAPPAVIGNA A., BUTTAZZONI L., RUSSO V. and DAVOLI R. (2009): *SNPs of MYPN and TTN genes in Italian Large White and Italian Duroc pigs are associated to meat production traits*, 60th EAAP Barcelona Spain 24-27 August 2009, p. 166.
- 18) DAVOLI R., BRAGLIA S., GANDOLFI G., ZAPPAVIGNA A., SPERONI C., ZAMBONELLI P., BUTTAZZONI L., RUSSO V.: *Study of SNPs in genes encoding for structural and proteolytic proteins in skeletal muscle of Italian Large White and Italian Duroc pigs*, Associazione Scientifica di Produzione Animale, XVIII Congresso Nazionale, Palermo, 9-12 giugno 2009.

VINCENZO RUSSO\*

## Geni associati con l'efficienza riproduttiva nelle scrofe\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

La prolificità delle scrofe e il numero di mammelle sono importanti caratteri riproduttivi che influenzano l'efficienza riproduttiva delle scrofe (numero di suinetti svezzati/scrofa/anno). Il miglioramento genetico della prolificità mediante la selezione presenta dei limiti in quanto il carattere ha bassi valori di ereditabilità, si esprime solamente in un sesso e dopo il raggiungimento della maturità sessuale. Diversi autori hanno studiato geni candidati per la prolificità delle scrofe, ai fini di valutare la loro idoneità per l'impiego nella selezione assistita da marcatori (MAS). Nell'ambito del Progetto Selmol è stata analizzata la variabilità di 31 loci e sono stati effettuati gli studi di associazione fra i marcatori e alcuni caratteri riproduttivi, quali l'indice prolificità e il numero di mammelle, in un campione di scrofe di razza Large White italiana (LWI).

### MATERIALI E METODOLOGIE

Sono stati prelevati i campioni di setole di 1803 scrofe di razza LWI provenienti da 6 allevamenti dell'Emilia-Romagna e della Lombardia (tab. 1). I campioni sono stati utilizzati per le estrazioni di DNA e per la tipizzazione di 30 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) mediante piattaforma Sequenom iPLEX™ GOLD system (tab. 2). Per ogni locus sono state calcolate le

\* *Università di Bologna, Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare*

\*\* *Unità di ricerca Università di Bologna, responsabile scientifico prof. Vincenzo Russo*

frequenze geniche e genotipiche ed è stato verificato l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Sono stati stimati gli indici genetici per il numero dei nati vivi al primo parto (EBV NBA1) di ogni scrofa e sono state studiate le associazioni fra i marcatori e gli EBV NBA1. Per il polimorfismo PvuII del gene *ESR1*, sono state confrontate le frequenze geniche di due gruppi estremi di scrofe (selective genotyping) per EBV NBA1 (227 animali/gruppo). Al fine di individuare geni associati col numero di mammelle sono state confrontate le frequenze alleliche tra due gruppi di scrofe ottenuti con la suddivisione dell'intero campione in due categorie in base al numero di mammelle funzionali ( $1=14$  e  $2=>14$ ).

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

La numerosità del campione e le caratteristiche descrittive degli EBV per NBA1 delle scrofe dei sei diversi allevamenti sono riportati in tabella 1.

Gli indici NBA1, espressi in unità di deviazione standard, sono stati stimati con un modello BLUP-single trait Animal Model che ha corretto per l'effetto di diversi fattori quali allevamento-anno, mese di parto, età della scrofa al primo parto, coefficiente di inbreeding e tipo di fecondazione. Dai dati dell'intero data set sono stati individuati i campioni con gli indici più estremi e divergenti e sono stati costituiti due gruppi, uno costituito da scrofe con valori degli indici positivi ( $+2,060 \pm 0,890$ ) e l'altro con valori degli indici negativi ( $-1,138 \pm 0,757$ ). Nei due gruppi sono stati osservati uguali valori di frequenza genica (allele A= 0,62, allele B= 0,38) per il polimorfismo PvuII del gene *ESR1*. Ciò indica che nella razza Large White questo locus non esercita alcuna influenza sulla prolificità della scrofa.

ALLEVAMENTI	N° SCROFE	MEDIA	D.S.	MIN	MAX
1	691	0,569	1,247	-3,227	4,839
2	427	1,172	0,868	-1,101	4,328
3	102	0,988	1,255	-1,884	4,962
4	323	0,239	1,418	-3,050	3,983
5	126	1,019	0,952	-0,884	4,305
6	134	1,449	1,168	-0,786	4,234
Tutti	1803	0,773	1,237	-3,227	4,962

Tab. 1 *Numerosità del campione entro ogni allevamento e caratteristiche descrittive degli indici genetici per il numero dei suinetti nati vivi al primo parto (EBV NBA1)*



SIMBOLO DEL GENE	NOME DEL GENE	SSC	REGIONE	SNP I>2	N° ANALISI	FREQUENZA ALLELE 1	FREQUENZA ALLELE 2
ADRB2	Beta-2 adrenergic receptor	2	Promotore	C>T	1648	0,988	0,012
AFP	Alpha-fetoprotein	8	Introne 10	T>C	1771	0,888	0,112
BMPRI1B	Bone morphogenetic protein receptor type 1beta	8	Esone 10	C>T	1634	0,594	0,406
CHGB	Chromogranins Beta	17	Esone 4	G>A	1748	0,882	0,118
CLGN	Calmegin	8	Introne 12	A>G	1655	0,985	0,015
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	8	Introne 2	T>C	759	0,809	0,191
CTSL	Cathepsin L	10	Esone 5	C>T	1712	0,787	0,213
CYP21	Steroid 21-hydroxylase (P450c21)	7	3' UTR	G>A	1665	0,732	0,268
EDNRA	Endothelin receptor type A	8	Introne 6	C>T	1709	0,996	0,004
EPOR	Erythropoietin receptor	2	Introne 4	C>T	1662	0,805	0,195
ESR2	Estrogen receptor 2	1	Esone 5	G>A	1772	0,413	0,587
FUT1	Fucosyltransferase 1	6	Esone 1	G>A	1500	0,904	0,096
GDF9	Growth differential factor 9	2	Esone 2	C>T	1620	0,104	0,896
GDF9	Growth differential factor 9	2	Esone 2	C>T	1750	0,951	0,049
GNRHR	Gonadotropin releasing hormone receptor	8	3' UTR	C>G	1318	0,809	0,191
GPX5	Glutathione peroxidase 5	7	3' UTR	C>T	1561	0,650	0,350
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	1	Introne 9	T>C	1733	0,965	0,035
LEPR	Lptin receptor	6	Esone 4	C>T	1773	0,636	0,364
LIF	Leukemia inhibitory factor	14	3' UTR	T>C	754	0,973	0,027
MAN2B2	Mannosidase alpha class 2 B member 2	8	Esone 10	A>G	1699	0,203	0,797
OPN	Osteopontin	8	Promotore	G>A	1784	0,983	0,017
pDAZL	Porcine Deleted in AZoospermia Like	13	Introne 9	C>A	1501	0,998	0,002
PNAS-4	CGI-146, Pro-Apoptotic Gene Activated During the Early Response to DNA Damage	10	Introne 2	T>C	1658	0,828	0,172
Pou1f1/Pit1	POU class 1 homeobox 1	13	Introne 5	C>G	1759	0,999	0,001
RBP4	Retinol binding protein 4	14	Introne 4	G>C	1362	0,471	0,529
RLN	Relaxin	1	Esone 1	C>A	1642	0,999	0,001
RNF4	Nuclear RING finger protein 4	8	Introne 5	T>C	1688	0,001	0,999
SCG2	Secretogranin II	15	Esone	A>G	1748	0,943	0,057
STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	12	Introne 14	A>G	1748	0,814	0,186
TGFBR1	Transforming growth factor beta type 1 receptor	1	Esone 7	A>G	1740	0,566	0,434

Tab. 2 Caratteristiche dei polimorfismi analizzati e corrispondenti frequenze geniche

I restanti polimorfismi analizzati e i valori di frequenza degli alleli sono riportati in tabella 2.

I geni analizzati sono stati scelti dall'esame della letteratura o perché risultati associati con caratteri relativi alla prolificità in alcune popolazioni suine, o perché candidati per la loro funzione e/o localizzazione cromosomica. In particolare, nove geni sono localizzati sul cromosoma 8 (SSC8) dove sono stati segnalati diversi Quantitative Trait Locus (QTL) per i caratteri che influenzano la prolificità delle scrofe, quali tasso di ovulazione, numero di corpi lutei e capacità uterina. Complessivamente 12 loci sono risultati o monomorfi o con una frequenza dell'allele più raro (MAF) inferiore a 0,09. Per i marcatori genetici che hanno mostrato frequenze geniche informative (tab. 2), è stato effettuato uno studio di associazione con il numero dei nati vivi al primo parto. I loci CYP21, GPX5, MAN2B2, RBP4 e TGFBR1 sono risultati statisticamente associati ( $P > 0,02$ ) con gli EBV per NBA1. In considerazione del fatto che la prolificità delle scrofe è il più importante carattere riproduttivo, è stato analizzato se i potenziali geni candidati per tale carattere sono marcatori del numero di mammelle. Relativamente al numero di mammelle, nelle razza Large White italiana si seleziona mediante soglie e solamente i soggetti con un numero minimo di 14 mammelle, regolarmente distanziate e con capezzoli normali, ben pronunciati e pervi, presentano i requisiti minimi per l'iscrizione al libro genealogico della razza (Associazione Nazionale Allevatori Suini, ANAS; <http://www.anas.it>). La classificazione delle scrofe in due classi ha reso possibile l'impiego di analisi statistiche idonee per le variabili categoriche. I diversi loci sono risultati in equilibrio genetico in entrambi i gruppi di scrofe ed è stata individuata una differenza statisticamente significativa per le frequenze geniche ( $P < 0,0087$ ) del locus *GPX5*. Questo risultato è interessante in quanto il numero di mammelle funzionali è alla base dell'attitudine materna.

Complessivamente le analisi hanno permesso di individuare marcatori che potrebbero essere impiegati per la MAS per la prolificità e/o per il numero di mammelle nella razza Large White italiana.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Stefania Dall'Olio (Professore associato)  
Luca Fontanesi (Ricercatore)  
Lucia Tognazzi (Assegnista)

## PUBBLICAZIONI

*Su riviste con impact factor*

- 1) DALL'OLIO S., FONTANESI L., TOGNAZZI L., RUSSO V. (2010a): *Genetic structure of candidate genes for litter size in Italian Large White pigs*, «Vet. Res. Commun.», doi:10.1007/s11259-010-9380-7.

*Su Atti di convegni*

- 1) DALL'OLIO S., FONTANESI L., TOGNAZZI L., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V. (2009a): *Investigation of candidate genes for litter size in Italian Large White sows*, «Italian Journal of Animal Science», 2009, 8 (Suppl. 2), pp. 199 (Atti Proceedings of the ASPA 18th Congress, Palermo, June 9-12, 2009).
- 2) DALL'OLIO S., FONTANESI L., TOGNAZZI L. (2009b): *Struttura genetica della razza suina Large White Italiana in geni candidati per la prolificità*, Atti Congresso Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Udine (Italy), 16-18 settembre 2009 (vol. LXIII, pp. 436-438), isbn: 1825-4454, Sinergia arti grafiche e visive.
- 3) DALL'OLIO S., FONTANESI L., TOGNAZZI L., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V. (2009c): *Association study between eight candidate genes and prolificacy in Italian Large White sows*, Pig Genome III Conference, UK 2-4 novembre 2009.
- 4) DALL'OLIO S., FONTANESI L., TOGNAZZI L., BUTTAZZONI L., GALLO M., RUSSO V. (2010b): *Studio di associazione tra marcatori del DNA e il numero di mammelle funzionali nella razza suina Large White Italiana*, Atti Congresso Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Asti (Italy), 7-10 settembre 2010.



VINCENZO RUSSO\*

## Individuazione di SNP in regioni del genoma suino nelle quali sono stati identificati QTL per il pH della carne *post-mortem*\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Nell'ambito del progetto Selmol è in corso lo studio del pH delle carni in quanto è un parametro importante per la qualità dei prodotti sia freschi che stagionati. Tale carattere è influenzato sia da fattori ambientali che da fattori genetici. In Sellier (1998) è riportato un valore medio di  $h^2$  per il pH1 di 0,16 e per il pH24 di 0,21. In lavori recenti sulla razza Large White sono stati trovati valori di  $h^2$  del pH2 di 0,29 e 0,35 (Nguyen et al., 2006; Rosendo et al., 2010). Diverse ricerche hanno segnalato regioni QTL (QTLR) nel genoma suino che contribuiscono alla regolazione del pH (Pig QTL Database: <http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>) e alcune QTLR sono state descritte in pubblicazioni nelle quali sono stati usati suini di razze diverse.

Lo scopo del presente lavoro è uno studio di tre QTLR per il pH basato sulla ricerca di SNP in geni mappati entro le tre regioni con l'obiettivo finale di individuare polimorfismi che controllano il carattere studiato.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Per le analisi sono state scelte tre QTLR sui cromosomi di suino 1 (60-80 cM), 2 (55-66 cM) e 3 (42-60 cM) definite in accordo con la mappa di associazione USDA-MARC (<http://www.animalgenome.org/maps/marcmap.html>). L'allineamento tra i genomi suino e umano è stato effettuato usando

\* Università di Bologna, Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare

\*\* Unità di ricerca Università di Bologna, responsabile scientifico prof. Vincenzo Russo

il Pig QTL Database e l'NCBI Genome Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>). I cluster individuati, sono stati opportunamente valutati per scegliere quelli contenenti almeno 4 sequenze da allineare tra di loro per l'identificazione di SNP. Gli SNP individuati sono stati genotipizzati utilizzando il sistema Golden Gate (Illumina). Per lo studio di associazione sono disponibili campioni di muscolo *Semimembranosus* prelevati da 354 Large White Italiani (LWI), 136 Duroc Italiani (DI) e 158 Landrace Italiani (LAI) macellati per le prove di sib test effettuate da ANAS e sui quali è stato misurato il pH1 e il pH2. Per il calcolo delle frequenze alleliche e genotipiche e le analisi di associazione verrà usato il programma Plink (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Nelle tre regioni QTL studiate sono stati localizzati 2409 cluster di geni suini classificati in UniGene. Di questi ne sono stati selezionati 1822 e di questi ultimi sono 353 quelli che presentano almeno un SNP utilizzabile nel sistema GoldenGate. Complessivamente sono stati analizzati 379 polimorfismi in quanto per alcuni geni è stato usato più di 1 polimorfismo. Gli SNP effettivamente trovati sono 617 ma non tutti erano utilizzabili con il metodo di genotipizzazione utilizzato in quanto erano troppo vicini tra di loro. Un dettaglio del flusso di lavoro che ha portato all'identificazione degli SNP è riportato nella tabella 1.

Mediante posizionamento sulla sequenza genomica dei siti polimorfi e utilizzando dati derivati dalla sequenza genomica completa di suino Sscrofa9 assembly ([http://www.ensembl.org/Sus\\_scrofa/Info/Index](http://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Info/Index)) è stato possibile determinare la distribuzione degli SNP nelle tre QTLR e la distanza media tra cluster UniGene (tab. 2).

Sono state calcolate le frequenze alleliche per tutti gli SNP analizzati. In tabella 4 sono riportati i polimorfismi che segregano nelle razze studiate e che presentano una frequenza dell'allele minore (FAM) superiore alle soglie del 5%, 10%, 15% e 20%. Tale dato è indicativo della variabilità esistente nelle regioni genomiche analizzate nelle tre razze.

Dai dati riportati in tabella 3 si evince che per tutte le razze gli SNP segreganti e che presentano una FAM superiore al 5% è meno del 50% dei loci studiati. In particolare, per i soggetti Duroc italiani questa percentuale è pari al 30,5%, e questo dato mette in evidenza che questa razza presenta per i loci studiati la variabilità genetica minore rispetto alle altre razze. I loci con FAM

CROMOSOMA SUINO (SSC)	CROMOSOMA UMANO (HSA) OMOLOGO	CLUSTER SUINI UNIGENE ENTRO QTLR	CLUSTER SUINI UNIGENE SCELTI	CLUSTER SUINI UNIGENE CON SNP	SNP ENTRO QTLR
1	18	232	154	23	34
	15	224	157	41	53
	14	331	250	37	54
2	11	232	188	35	67
	19	563	444	83	104
3	16	425	340	61	35
	9	105	81	2	2
	2	297	208	71	30
Totali		2.409	1.822	353	379

Tab. 1 *Descrizione delle fasi di lavoro che hanno portato all'identificazione degli SNP inseriti nel pannello GoldenGate*

SSC	QTLR (CM)	QTLR (NT)	DISTANZA MEDIA TRA CLUSTER (NT)
1	20	$1,90 \times 10^8$	$2,35 \times 10^6$
2	10	$0,35 \times 10^8$	$0,42 \times 10^6$
3	18	$0,38 \times 10^8$	$0,92 \times 10^6$

Tab. 2 *Distribuzione degli SNPs nelle 3 QTLR analizzate*

FAM	N. SNP - LWI	N. SNP - DI	N. SNP - LAI
>0,05	177 (46,1%)	117 (30,5%)	161 (41,9%)
>0,10	147 (38,3%)	91 (23,7%)	142 (37,0%)
>0,15	131 (34,1%)	74 (19,3%)	115 (30,0%)
>0,20	117 (30,5%)	62 (16,1%)	94 (24,5%)

Tab. 3 *Numero di SNP con frequenze dell'allele minore (FAM) superiore alle soglie del 5%, 10%, 15% e 20%, determinate per le tre razze considerate*

superiore al 20% risultano essere 117 per la Large White italiana, 62 per la Duroc italiana e 94 per la Landrace Italiana. Tali loci sono quelli che saranno utilizzati per le analisi di associazione che sono in corso. Per tutti i polimorfismi è stato calcolato l'equilibrio di Hardy-Weinberg entro razza verificando che vi sono 6-7 SNP per razza che si discostano dall'equilibrio ( $p < 0,001$ ).

L'approccio proposto ha consentito di identificare circa 400 SNP nelle regioni trascritte di geni che mappano in tre regioni QTL del genoma. I polimorfismi individuati poiché sono nella parte trascritta dei geni potrebbero essere utili per risalire rapidamente al gene con effetto sul carattere studiato senza dover ricorrere a ulteriori studi di associazione che sono indispensabili quando si effettuano ricerche basate su pannelli di marcatori anonimi.

## BIBLIOGRAFIA

- NGUYEN N.H., MCPHEE C.P., TROUT G.R. (2006): *Responses in carcass lean pH at 24 hours post-mortem in lines of Large White pigs selected for growth rate on a fixed ration over a set time*, «Livest. Sci.», 100, pp. 84-90.
- ROSENDO A., DRUET T., PÉRY C., BIDANEL J.P. (2010): *Correlative responses for carcass and meat quality traits to selection for ovulation rate or prenatal survival in French Large White pigs*, «J Anim Sci.», 88 (3), pp. 903-11.
- SELLIER P. (1998): *Genetics of meat and carcass trait in "The genetics of the pig"*, Edited by MF Rothschild, pp. 463-510.

## COLLABORATORI DELLA RICERCA

Roberta Davoli (Professore ordinario)  
 Paolo Zambonelli (Ricercatore)  
 Luigi Francesco de Paolis (Assegnista)  
 Silvia Braglia (Assegnista)  
 Carlo Annaratone (Assegnista)

## PRODOTTI

Con la presente ricerca è stato messo a punto un sistema di individuazione di SNP nelle parti trascritte dei geni presenti in una precisa regione genomica che potrà essere proficuamente utilizzato per altri studi.

Sono stati identificati circa 400 SNP nelle regioni trascritte di geni che mappano in tre regioni QTL del genoma suino.

L'analisi di associazione consentirà di individuare all'interno di regioni genomiche ampie alcune decine di cM, porzioni più delimitate in cui si trovano i polimorfismi più strettamente associati con i valori di pH della carne. In questo modo si potrà focalizzare la ricerca entro queste aree ristrette per arrivare a identificare i geni che sono implicati nella determinazione del parametro qualitativo studiato.

## PUBBLICAZIONI

*Su Atti di Convegni*

- 1) ZAMBONELLI P., DAVOLI R., BRAGLIA S., COMELLA M., RUSSO V. (2009): *In silico large scale discovery of SNPs to fine map meat quality QTL regions in porcine genome*, ASPA 18th Congress, Palermo 9-12 June 2009, «Italian Journal of Animal Science», 8, p. 239.
- 2) ZAMBONELLI P., DAVOLI R., DE PAOLIS L.F., BUTTAZZONI L., RUSSO V. (2009): *In silico SNP detection in transcribed sequences mapping in QTL regions for pork pH and localisation of the SNP on porcine genomic sequence*, PIG Genome III conference, Abstract 30.



BRUNO STEFANON\*

## Individuazione di geni associati con la velocità di crescita in razze suine italiane\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Gli studi di associazione hanno evidenziato che i polimorfismi presenti in alcuni geni sono statisticamente correlati con lo sviluppo del tessuto muscolare e con i processi cellulari di deposizione proteica. Gran parte delle ricerche sono state realizzate su razze e ibridi commerciali di suini con attitudine alla produzione di carne magra, mentre le informazioni sono ancora limitate per quanto riguarda il suino per la produzione di prosciutto DOP e di insaccati. Alcuni studi realizzati dall'unità di ricerca hanno permesso di identificare dei geni candidati per l'accrescimento, coinvolti in alcune pathways cellulari di rilievo per il metabolismo delle fibre. In base alle indicazioni della letteratura e a queste informazioni, sono stati identificati un set di geni con un ruolo chiave sulla crescita muscolare. L'obiettivo della ricerca è stato di studiare la variabilità delle sequenze di questi geni e di verificare il loro livello di associazione con l'accrescimento corporeo e altre variabili fenotipiche collegate.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Sono stati analizzati 16 geni candidati per l'associazione con l'accrescimento medio giornaliero: eIF4E, FABP4, FTO, ID3, ITGA7, LEP, MYF6, MYOD, OPN, PIK3R2, PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ BP, SCD, RPS6KB1, RAF1, TGF $\beta$ 2. Me-

\* *Università di Udine, Dipartimento di Scienze Animali*

\*\* *Unità di ricerca Università di Udine, responsabile scientifico prof. Bruno Stefanon*

dante analisi *in silico* su database genetici, in questi geni sono stati individuati 27 SNP di cui 13 nella regione del promotore e 14 nella regione codificante. Il DNA è stato estratto da campioni di sangue di 600 individui appartenenti a Large White italiana (LW), Duroc italiana (DU), Landrace italiana (LA) del libro genealogico ANAS. Ciascuna razza era suddivisa in due gruppi di 100 animali con EBV estremi per l'incremento ponderale medio giornaliero. Le genotipizzazioni sono state condotte mediante chimica KASPar. Il software statistico SPSS® è stato usato per le analisi di associazione tra genotipi e gli EBVs ottenuti dall'ANAS: spessore del lardo dorsale (mm), incremento medio giornaliero (gr.), tagli magri (Kg), peso cosce (Kg), indice conversione alimentare (unità).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Le sequenze sono state allineate su Ensembl e 6 dei 14 SNP presenti nella regione codificante sono risultati sinonimi, mentre 8 sono risultati non sinonimi. Le posizioni degli altri SNP analizzati sono state confermate nella regione del promotore. 17 dei 27 SNP analizzati sono risultati polimorfici. Per molti di questi polimorfismi sono state evidenziate differenze significative nella distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche tra minus e plus varianti all'interno delle singole razze. Il test del chi quadro (tab. 1) è risultato significativo per molti dei geni analizzati, con diversi gradi di significatività per le tre razze considerate. L'analisi della varianza ha inoltre messo in evidenza associazioni significative tra i genotipi rilevati e gli EBV degli individui analizzati. I geni di maggior interesse sulla base dei risultati ottenuti sono ID3, ITGA7, MYF6, TGFB2, LEP MYOD, PI3KR2 e SCD. Per questi geni, ulteriori studi dovranno essere condotti sui polimorfismi analizzati per verificare le associazioni statistiche risultanti dalla presente ricerca.

L'approccio del gene candidato negli studi di associazione è risultato efficace per verificare l'effetto sul fenotipo entro suini della stessa razza. Le diverse frequenze entro individui della stessa razza e fra razze diverse sono probabilmente il risultato della diversa azione di selezione effettuata. I risultati dell'attività di ricerca svolta indicano che alcune varianti (SNP) di determinati geni sono legate a caratteri di interesse commerciale per l'allevamento suino. Il campione di suini disponibile è tuttavia limitato e riflette la situazione di soggetti con caratteristiche estreme. L'applicazione dei risultati nei programmi di selezione richiede un ulteriore conforto, anche solo bibliografico. La conoscenza della sequenza del genoma suino e della posizione dei singoli geni permetterà di verificare l'effetto causativo del gene o la sua funzione di marcatore di QTL.

SNP	Large White			Duroc			Landrace		
	valore	sig.	*	valore	sig.	*	valore	sig.	*
EIF4EL3_seq1	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
EIF4EL3_seq2	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
ID3_seq1	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
ID3_seq2	10.61	0.01	**	monomorfico			33.35	0.00	**
ID3_seq3	2.01	0.37		13.51	0.00	**	31.12	0.00	**
ITGA7_seq1	29.71	0.00	**	16.55	0.00	**	9.47	0.01	**
MYF6_seq1	2.42	0.30		0.55	0.76		14.66	0.00	**
MYF6_seq2	2.72	0.26		0.97	0.62		13.80	0.00	**
MYF6_seq3	0.31	0.21		1.06	0.59		14.29	0.00	**
PAF1_seq1	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
TGFB2_seq1	1.06	0.30		1.01	0.32		monomorfico		
TGFB2_seq2	9.80	0.01	**	66.75	0.00	**	3.25	0.20	
TGFB2_seq3	34.16	0.00	**	63.73	0.00	**	6.86	0.03	*
PPS6KB1_seq8	monomorfico			0.91	0.34		1.00	0.32	
PPS6KB1_seq9	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
FABP4_snp1	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
FABP4_snp2	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
FTO_snp1	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
FTO_snp2	1.96	0.16		monomorfico			3.96	0.05	*
LEP_snp12	5.33	0.07		13.59	0.00	**	13.22	0.00	**
LEP_snp5	12.50	0.00	**	34.35	0.00	**	6.55	0.04	*
MYOD_snp1	6.64	0.04	*	22.03	0.00	**	7.28	0.03	*
OPN_snp1	monomorfico			31.66	0.00	**	monomorfico		
PI3KF2_snp1	15.98	0.00	**	1.69	0.43		11.64	0.00	**
PPARBP_snp1	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
PPARG_snp1	monomorfico			monomorfico			monomorfico		
SCD_snp7	3.16	0.21		54.12	0.00	**	monomorfico		

Tab. 1 *Test del chi quadro*

## COLLABORATORI DELLA RICERCA

Denis Guiatti (Assegnista)  
Sandy Sgorlon (Ricercatore)

## PRODOTTI

- Frequenze alleliche dei geni analizzati nelle razze Duroc, Landrace e Large White in soggetti estremi per il carattere incremento medio giornaliero.
- Identificazione di polimorfismi di geni candidati e di marcatori di QTL associati al carattere di interesse nelle tre razze.

## TRASFERIMENTO

Le conoscenze acquisite possono essere utilizzate per programmi di selezione assistita da geni o marcatori al fine di migliorare il carattere incremento medio giornaliero nelle razze oggetto di studio.

## PUBBLICAZIONI

- 1) GUIATTI D., SGORLON S., STEFANON B. (2010): Association Study Of Candidate Genes For Porcine Carcass Traits, Proceedings of Plant & Animal Genomes XVIII Conference – San Diego, CA, U.S.A. [http://www.intl-pag.org/18/abstracts/P05n\\_PAGXVIII\\_611.html](http://www.intl-pag.org/18/abstracts/P05n_PAGXVIII_611.html).
- 2) GUIATTI D., SGORLON S., STEFANON B. (2009): *Genetic variation in candidate genes associated with porcine carcass traits*, Proceedings of Pig Genome III Conference - Swine Genome Sequencing Consortium and PigNet Genome Conference - The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK.

PAOLO AJMONE-MARSAN\*

## Ricerca e analisi polimorfismi in geni candidati per l'incremento ponderale giornaliero (IGM) e lo spessore del lardo dorsale\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Nonostante sia possibile effettuare una scansione approfondita del genoma con pannelli di SNPs ad alta densità per identificare geni utili e QTL, l'approccio del gene candidato rimane un metodo efficace in particolare nelle specie dove le informazioni genomiche sono dettagliate grazie ai progetti di sequenziamento completo.

I geni candidati sono scelti sulla base di conoscenze *a priori* perché coinvolti a qualsiasi livello nella fisiologia del carattere/i di interesse (candidati per funzione) o perché si trovano posizionati nelle mappe genetiche vicino a QTL noti (candidati per posizione).

L'approccio del gene candidato prevede l'analisi diretta delle associazioni tra i polimorfismi dei geni e i caratteri produttivi senza necessità di analizzare il genoma con migliaia di marcatori. L'unità di Piacenza ha contribuito agli obiettivi della linea "carne suina" ricercando e studiando polimorfismi in geni candidati per l'incremento ponderale giornaliero (IGM) e lo spessore del lardo dorsale (SLD).

### MATERIALI E METODOLOGIE

È stata condotta una ricerca bibliografica in banche dati elettroniche (*e.g.* PubMed, Highwire, ecc.) per redigere una lista di geni e QTL di *Sus scrofa* coinvol-

\* Università Cattolica di Piacenza, Istituto di Zootecnica

\*\* Unità di ricerca Università Cattolica di Piacenza, responsabile scientifico Prof. Paolo Ajmone-Marsan

ti nella determinazione dell'accrescimento ponderale medio giornaliero e dello spessore del lardo dorsale. Le informazioni sono state combinate con un'analisi matematico-statistica (meta-analisi) per la scelta dei geni candidati per funzione.

Materiale biologico di 600 individui estremi per gli EBV relativi a IGM e lardo dorsale appartenenti a Large White italiana (LW), Duroc italiana (DU) e Landrace italiana (LA) è stato campionato con la collaborazione di ANAS che ha anche fornito i valori degli indici genetici di ciascun soggetto.

Le genotipizzazioni sono state effettuate in outsourcing (Kbiosciences UK) e le analisi di associazione calcolate utilizzando un modello GLM in cui si è tenuto conto dell'effetto dello SNP, della razza, del sesso e della interazione SNP\*razza (software SAS).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

La meta-analisi della letteratura ha permesso di individuare 75 differenti informazioni bibliografiche riguardanti geni potenzialmente associati al carattere di interesse e 89 informazioni riguardanti QTL da cui sono stati identificati 28 geni candidati.

Questi geni sono stati quindi classificati in relazione alle relative vie metaboliche in suino in base alle informazioni fornite dal database GenomeNet (<http://www.genome.jp/en/>) e, ove non fosse possibile, in base alle funzioni putative come emerso da valutazioni sulla ortologia con *Homo sapiens* e *Mus musculus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Da questo gruppo sono stati selezionati 10 geni candidati successivamente studiati mediante ricerca *in silico* di mutazioni.

I geni scelti sono stati:

- **AGRP: agouti related protein homolog (1 SNP)** Questo gene codifica per un antagonista della melanocortina-3 e della melanocortina-4 recettore. Sembra regolare il controllo ipotalamico del comportamento alimentare, svolgendo quindi un ruolo nell'omeostasi del peso. Le mutazioni in questo gene sono state associate con l'obesità.
- **MC3R: melanocortin 3 receptor (2 SNP)** Topi knock-out per questo gene hanno mostrato un aumento della massa grassa nonostante la diminuita assunzione di cibo, suggerendo un suo ruolo nella regolazione dell'omeostasi energetica. Le mutazioni in questo gene sono associate nell'uomo a una predisposizione all'obesità.
- **MC4R: melanocortin 4 receptor (1 SNP)** Difetti in questo gene sono noti causare obesità.
- **GH: growth hormone (4 SNP)** La proteina codificata da questo gene è un membro della famiglia di ormoni somatotropina/prolattina che svolgono un

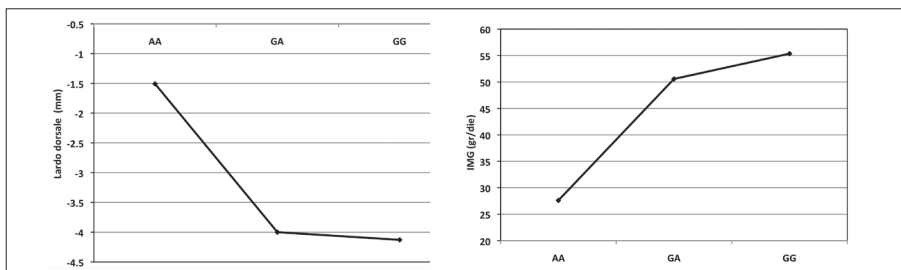


Fig. 1 Media degli EBV per lo spessore del lardo dorsale in funzione del genotipo allo SNP identificato nel gene *FTO* (sinistra) e per l'incremento medio giornaliero (destra)

ruolo importante nel controllo della crescita. Mutazioni o delezioni del gene portano a deficit dell'ormone della crescita con conseguente bassa statura.

- **GHRH: growth hormone releasing hormone (1 SNP)** La proteina codificata da questo gene è una pre-proproteina che viene prodotta nell'ipotalamo e che agisce per stimolare la liberazione dell'ormone della crescita dall'ipofisi. I difetti in questo gene sono causa di nanismo, mentre ipersecrezione della proteina codificata è causa di gigantismo.
- **GHRL: ghrelin/obestatin prepropeptide (2 SNP)** Questo gene è coinvolto nella regolazione del rilascio dell'ormone della crescita. L'obestatina inizialmente è stata coinvolta nella sazietà e in una diminuzione dell'assunzione di cibo, tuttavia, questi risultati sono ancora controversi.
- **CCKAR: cholecystokinin A receptor (2 SNP)** Il gene codifica per un recettore mediatore fisiologico importante della secrezione di enzimi pancreatici e della contrazione della muscolatura liscia della cistifellea e dello stomaco. A livello del sistema nervoso centrale e periferico questo recettore regola la sazietà e il rilascio di beta-endorfine e di dopamina
- **LEP: leptin (3 SNP)** Questo gene codifica per una proteina che svolge un ruolo importante nella regolazione del peso corporeo. Le mutazioni in questo gene e / o nelle sue regioni regolative possono causare obesità grave.
- **LEPR: leptin receptor (2 SNP)** Questa proteina è un recettore per la leptina (un ormone specifico degli adipociti che regola il peso corporeo), ed è coinvolta nella regolazione del metabolismo dei grassi. Le mutazioni in questo gene sono state associate con l'obesità e disfunzione ipofisaria.
- **FTO: fat mass and obesity associated (2 SNP)** L'esatta funzione di questo gene non è nota. Mutazioni in questo gene sono state associate a ritardo della crescita, ritardo dello sviluppo, lineamenti grossolani, e morte precoce.

Lo studio *in silico* di questi geni, sfruttando le informazioni contenute nelle banche dati genetiche, ha portato all'identificazione di 20 polimorfismi SNP che sono poi stati impiegati nell'analisi di associazione con i caratteri oggetto di studio.

I risultati delle analisi di associazione, benché preliminari, sono confortanti.

Per esempio, uno SNP identificato nel gene FTO (fat mass and obesity associated), è risultato significativamente associato sia al carattere “spessore del lardo dorsale” che all’incremento medio giornaliero.

Come si può vedere nella figura 1- sinistra, nella razza Duroc, il genotipo AA risulta diminuire lo spessore del lardo dorsale di circa 1.5 mm rispetto alla media di popolazione, mentre i genotipi AG e GG di oltre 4 mm.

Lo stesso SNP è risultato associato anche all’incremento medio giornaliero (fig. 1- destra). In questo caso, in accordo alla fisiologia dei suini e ai risultati precedenti, il genotipo AA è risultato associato a un minor incremento medio giornaliero (26 gr/die versus 55 gr/die)

I risultati dell’attività di ricerca svolta confermano l’efficacia dell’approccio del gene candidato per identificare geni e QTL con effetto su caratteri di interesse economico. Oltre al valore scientifico, questi risultati possono anche avere un risvolto pratico, poiché, se confermati da esperimenti indipendenti, possono essere integrati negli schemi di selezione assistita dai marcatori con ricadute positive sul progresso genetico e quindi sulla competitività del comparto suinicolo nazionale.

Ulteriori analisi statistiche sono in corso sui dati prodotti, i cui risultati saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste specializzate e divulgati in articoli tecnici a tutti gli operatori del settore.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Riccardo Negrini (Ricercatore)  
Rosanna Marino (Assegnista)  
Ezequiel Luis Nicolazzi (Dottorando)  
Raffaele Mazza (Assegnista)

#### PRODOTTI

- Frequenze alleliche dei geni analizzati nelle razze Duroc, Landrace e Large White.
- Identificazione e verifica in popolazioni italiane di polimorfismi in geni candidati per l’incremento medio giornaliero e lo spessore del lardo dorsale.

#### TRASFERIMENTO

Le conoscenze acquisite, previa opportuna validazione in popolazioni indipendenti, potranno essere applicate al miglioramento genetico dei caratteri oggetto di studio in programmi di selezione assistita da marcatori.



GIULIO PAGNACCO\*

## Identificazione di polimorfismi in geni che potenzialmente influenzano la qualità della carne\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

L'identificazione di marcatori molecolari utili per il miglioramento genetico della produzione e della qualità della carne suina e l'integrazione di queste informazioni con i sistemi di selezione tradizionali potranno portare a importanti innovazioni nel settore, con vantaggi sul piano dell'efficienza della selezione. In quest'ottica l'obiettivo dell'UR è stato l'identificazione di polimorfismi in cinque geni differenzialmente espressi identificati nel corso del progetto FIRB: PK3, CAPSN1, INPP1, PTPRD, CRADD. Questi geni sono stati scelti perché appartengono a categorie funzionali che possono influenzare la qualità della carne. Inoltre, questi geni sono stati da noi mappati su pannelli di ibridi somatici e sono risultati localizzati nelle stesse regioni cromosomiche di QTL per la qualità della carne.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Dagli animali in analisi è stato estratto RNA e DNA, utilizzando sia protocolli per l'estrazione manuale, sia metodi di estrazione automatizzata. I geni (esoni, regioni introniche e di regolazione) sono stati amplificati mediante primer appositamente disegnati. I frammenti amplificati sono stati analizzati mediante PCR-SSCP e sequenziamento delle regioni risultate polimorfiche.

\* *Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria - CNR*

\*\* *Unità di ricerca IBBA-CNR, responsabile scientifico Prof. Giulio Pagnacco*

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Al momento della macellazione sono stati raccolti campioni di muscolo da una popolazione di 240 suini italiani ibridi Large White x Landrace, allevati in condizioni omogenee. Di questi suini si è proceduto al rilievo di caratteri fenotipici inerenti la qualità delle cosce, alla macellazione e al momento della rifilatura. I caratteri fenotipici valutati sono stati: lo spessore del lardo dorsale (misurato in mm), il peso della coscia rifilata (misurato in kg), lo spessore del lardo sottonoce (misurato in mm), la compattezza, la difformità di colorazione, la marezzatura, la rete venosa e la copertura in corona. È stata inoltre effettuata una valutazione finale complessiva per ogni coscia. Si è deciso di studiare individui estremi nella distribuzione di tre caratteri: la prima componente principale (ottenuta da una analisi multivariata dei fenotipi sopra indicati), lo spessore del lardo e la compattezza delle masse muscolari. Questi ultimi due sono caratteri ben definiti dal punto di vista biologico. Questi caratteri sono risultati fortemente correlati fra loro: infatti, quando inizialmente sono stati selezionati i 12 individui estremi per ogni carattere considerato (sei appartenenti alla coda positiva e sei appartenenti a quella negativa) è stato notato come, a causa delle forti correlazioni che legano questi caratteri, il numero di animali da analizzare complessivamente era 22 anziché 36, in quanto gli stessi animali si ritrovano agli estremi delle curve di distribuzione di più caratteri.

I cinque geni candidati sono stati oggetto di ricerca di variabilità per l'identificazione di polimorfismi informativi. Gli SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) in questi geni candidati sono stati cercati attraverso analisi PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms) e sequenziamento di frammenti amplificati. Nella tabella 1 sono riportati gli SNP identificati nei geni in analisi.

I polimorfismi identificati sono quindi stati tipizzati sulla popolazione dei 240 suini. Quattro di questi SNP sono stati validati, come riportato nella tabella 2.

In collaborazione con UNIBO, i quattro polimorfismi validati nei 240 suini sono stati quindi tipizzati su 550 animali di razza Large White che si collocano agli estremi della curva di distribuzione dei valori di EBV per lo spessore del lardo dorsale e su un centinaio di animali di razza Duroc, di cui però non erano disponibili i valori di EBV.

Nella figura 1 sono riportate le immagini di clusterizzazione degli SNP in esame nella popolazione analizzata.

Come si può osservare, a parte lo SNP2 (30194[G/T]) del gene PTPRD che in questa popolazione è risultato omozigote per G, gli altri SNP testati sono risultati polimorfici.

INPPI	CAPNS1	PIK3R2	PTPRD	CRADD
6 SNPs	2 SNPs	2 SNPs	10 SNPs	3 SNPs
g856[A/G]	g165 [C/A]	g3008[C/T]	g29730[A/C]	g343[A/G]
g862[T/C]	g652 [C/T]	g3304[A/C]	g29962[A/G]	g859[C/T]
g934[G/C]			g29991[A/ins]	g879 [A/G]
g935[T/C]			g30034[G/C]	
g948[A/T]			g30051[A/T]	
g953[C/T]			g30132 [C/T]	
			g30194[GT]	
			g30224[C/T]	
			g30286[A/G]	
			g30459[G/C]	

Tab. 1

GENE	SNP	POSIZIONE	FREQUENZA ALLELICA
PTPRD	g29962[A/G]	29962	A=0,54 G=0,46
PTPRD	g30194[G/T]	30194	G=0,54 T=0,46
CRADD	g343[A/G]	343	A=0,39 G=0,61
CRADD	g859[C/T]	859	C=0,40 T=0,60

Tab. 2

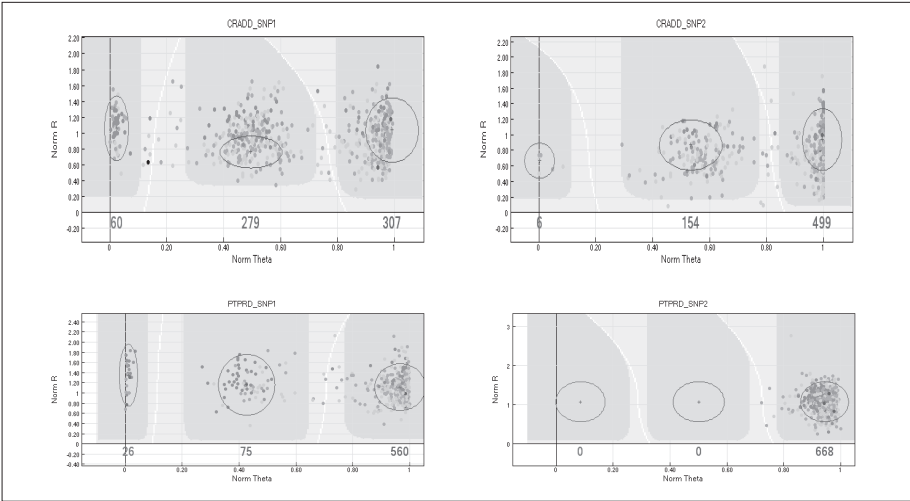


Fig. 1

Coefficienti di correlazione di Pearson			
Prob >  r  con H0: R=0			
Numero osservazioni			
	PRIN1	FAT	MUSCLE
CR1	-0.32678	0.02941	<b>0.42310</b>
CR1	0.1377	0.8966	<b>0.0498</b>
	22	22	22
CR2	-0.18173	-0.25051	0.37715
CR2	0.5341	0.3877	0.1837
	22	22	22
PT1	0.11895	0.16106	-0.37988
PT1	0.6277	0.5101	0.1087
	22	22	22
PT2	0.37024	<b>0.53616</b>	<b>-0.55963</b>
PT2	0.1435	<b>0.0265</b>	<b>0.0195</b>
	22	22	22
PK3	0.16713	<b>0.55693</b>	<b>-0.64972</b>
PK3	0.4690	<b>0.0087</b>	<b>0.0014</b>
	22	22	22

Fig. 2

Dalla tipizzazione della popolazione di 240 suini era risultato interessante uno dei due polimorfismi identificati nel gene PK3R2. Poiché il gene PK3R2 svolge un ruolo di primaria importanza nei processi metabolici coinvolti nell'accrescimento muscolare, si è deciso di testare, in collaborazione con UNIUD, lo SNP g.3008 [C/T] in una popolazione di 600 individui appartenenti a tre razze italiane diverse, Large White, Duroc e Landrace, che presentavano valori estremi per l'incremento medio ponderale giornaliero. In particolare, di ogni razza, sono stati tipizzati per questo SNP i 200 individui che risultavano costituire gli estremi della curva di distribuzione per l'incremento medio giornaliero (100 individui appartenenti alla coda positiva e 100 appartenenti alla coda negativa). Come mostrato nella tabella 3, lo SNP è risultato polimorfico in ciascuna delle tre razze analizzate. UNIUD ha inoltre compiuto analisi di associazione di questo SNP con i fenotipi disponibili, riportate nella relazione di questa UR

Mediante il programma SAS 9.2 sono state effettuate analisi di associazione dei polimorfismi individuati nei 22 soggetti che costituiscono gli estremi nella distribuzione dei tre caratteri considerati, come mostrato nella figura 2, dove si può osservare una buona associazione dello SNP1 del gene CRADD 1 con la compattezza delle masse muscolari, e dello SNP2 del gene PTPRD con la compattezza delle masse muscolari e lo spessore del lar-

PIK3R2 SNP G.3008 [C/T]			
SNP	Duroc	Landrace	Large White
C:C	13	65	2
C:T	76	89	49
T:T	105	37	135

Tab. 3

COEFFICIENTI DI CORRELAZIONE DI PEARSON PROB >  R  CON HO: RHO=0 NUMERO OSSERVAZIONI			
	CR1	CR2	PTI
INDLARDO	0.01319 0.7614	0.00351 0.9350	-0.03461 0.4183
INDLARDO	532	543	549
INDIMG	-0.03452 0.4269	-0.05670 0.1871	0.01794 0.6749
INDIMG	532	543	549
INDTMA	-0.02115 0.6264	-0.03404 0.4286	0.03109 0.4673
INDTMA	532	543	549
INDCOS	0.02260 0.6030	0.00170 0.9685	0.09559 0.0251
INDCOS	532	543	549
INDICA	0.00327 0.9400	-0.00043 0.9920	-0.00699 0.8702
INDICA	532	543	549

Tab. 4

do dorsale, mentre lo SNP del gene PIK3R2 mostra un'ottima associazione con questi due fenotipi.

L'associazione tra gli SNP validati e caratteri di interesse è stata inoltre valutata sulla popolazione di 550 suini Large White di cui si disponevano degli EBV del lardo dorsale. I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 4.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Bianca Castiglioni (Ricercatore IBBA-CNR)  
Marta Raschetti (Assegnista IBBA-CNR e Dottoranda UNIMI-VSA)  
Stefania Chessa (Ricercatore IBBA-CNR)

# PRODOTTI

- Sono state messe a punto delle metodica PCR-SSCP per la ricerca di polimorfismi nei cinque geni indagati.

# PUBBLICAZIONI

- 1) IACUANIELLO S., STELLA A., LIAUBET L., GORNI C., MARIANI P., PAGNACCO G., CASTIGLIONI B. (2008): *RH mapping and real time evaluation of seven porcine candidate genes for meat quality previously identified by means of microarray*, «Chromosome Research», 16, pp. 1050-1051.
- 2) RASCHETTI M., IACUANIELLO S., CASTIGLIONI B., RIGNANESE D., PAGNACCO G., CHESSA S. (2008): *La metodica PCR-SSCP per la ricerca di SNP in geni candidati per la qualità della carne suina*, III Workshop: metodologie di genotipizzazione e di diagnostica molecolare per le produzioni agroalimentari, Lodi, 22 ottobre 2008.
- 3) RASCHETTI M., RIGNANESE D., PAGNACCO G., CASTIGLIONI B., CHESSA S. (2009): *Polymorphisms in swine candidate genes for meat quality detected by PCR-SSCP*, «Italian Journal of Animal Science», 8, pp. 129-131
- 4) RASCHETTI M., CHESSA S., PAGNACCO G., GUIATTI D., SGORLON S., CASTIGLIONI B.: *Investigation and validation of SNP in swine candidate genes for meat quality*, ISAG Conference, Edimburgo (GB), 26-30 luglio 2010.

FABIO PILLA\*

## Studio della variabilità genetica ai loci coinvolti nell'accrescimento e nella qualità della carne nella razza Casertana\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

Il patrimonio suino italiano comprende diversi tipi genetici autoctoni che, sia pur poco significativi per numerosità, risultano utili per qualificare la produzione nazionale con prodotti caratteristici per tipicità e qualità. Inoltre in queste razze possono rinvenirsi alleli che conferiscono qualità assenti o poco sviluppate nelle razze maggiormente diffuse quali rusticità, capacità di accumulo di grasso dorsale, resistenza allo stress, ecc., per cui possono essere considerate come un utile serbatoio di variabilità genetica. Tra le razze autoctone un posto di rilievo è occupato dalla Casertana per la sua storia e perché studi precedenti hanno fornito promettenti indicazioni sulla qualità dei prodotti e adattabilità a condizioni di allevamento rispettose del benessere animale e dell'ambiente.

L'obiettivo generale dell'unità operativa è quello di accertare nella razza Casertana la variabilità genetica per i loci coinvolti nell'accrescimento e nella qualità della carne e il confronto con le razze cosmopolite del livello di espressione di geni candidati per gli stessi caratteri.

### MATERIALE E METODOLOGIE

È stato prelevato il sangue di 96 soggetti iscritti al libro genealogico di entrambi i sessi in 6 allevamenti diversi. Dai campioni è stato estratto il DNA

\* *Università degli Studi del Molise, Dipartimento Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente*

\*\* *Unità di ricerca Università di Campobasso, responsabile scientifico Prof. F. Pilla*

e determinato l'allele presente in 768 loci SNP in geni coinvolti principalmente nel deposito di grasso. Sono stati anche raccolti campioni di tessuto di soggetti macellati di razza Casertana e Large White allevati a parità di condizioni ambientali. In questi campioni è stato determinato con la tecnica della real-time PCR il livello di espressione per i geni SCD, ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, UCP2 e UCP3.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

Come primo risultato deve essere riportato il fatto che il campionamento dei soggetti di razza Casertana ha permesso di costituire una banca di DNA e tessuto (sangue nel caso specifico) per questo tipo genetico. Si tratta di una banca rappresentativa della realtà della razza in quanto sono stati campionati soggetti da 6 allevamenti in 4 diverse provincie (Caserta, Benevento, Isernia e Campobasso) e si è cercato per quanto possibile di includere soggetti di entrambi i sessi, non imparentati. Poiché il tessuto raccolto è stato il sangue in questo modo la quantità di DNA disponibile è abbondante (molto più di quella ottenibile dal tessuto normalmente campionato e cioè il pelo) e permetterà quindi future analisi genetiche.

Relativamente all'analisi strutturale è stato determinato con successo il genotipo dei 96 soggetti di razza Casertana in 679 dei 768 loci selezionati. I dati prodotti sono in primo luogo disponibili per la gestione della variabilità genetica, in quanto è possibile avere una misura "molecolare" della consanguineità e della diversità genetica tra allevamenti e zone di allevamento. In secondo luogo le frequenze alleliche osservate nella Casertana daranno la possibilità di validare associazioni tra polimorfismi e fenotipi rinvenute nelle razze in selezione. Infatti poiché nelle razze in selezione sempre nel progetto sono stati analizzati gli stessi loci sarà possibile verificare se nella razza Casertana sono presenti e in che misura gli alleli che sono risultati associati con il deposito di grasso nelle razze cosmopolite.

Per quanto relativo all'analisi dell'espressione genica questa è stato condotta con successo per tutti i geni considerati (stearoly Co A SCD, adiponectina ADIPOQ, recettore 1 dell'adiponectina ADIPOR1, recettore 2 dell'adiponectina ADIPOR2, proteina di disaccoppiamento 2 UCP2 e proteina di disaccoppiamento 3 UCP3). L'analisi è stata condotta a partire da campioni di muscolo, tessuto adiposo dorsale e fegato prelevati al macello da soggetti di razza Casertana e di razza Large White. Gli animali in questione per un totale di 32 di entrambi i sessi contemporanei per età erano stati allevati in un'azien-



da sperimentale nelle stesse condizioni e con la stessa alimentazione, in modo che fosse possibile mettere in evidenza una eventuale differenze nell'espressione genica determinata da fattori genetici. I geni scelti per l'analisi sono stati individuati in base alla loro funzione. Infatti l'adiponectina agisce nell'ambito del metabolismo del glucosio e dei lipidi, contribuendo al controllo del bilancio energetico dell'organismo. Le UCP sono un gruppo di proteine di trasporto di protoni presenti nella membrana mitocondriale interna la cui attività determina un incremento della produzione di calore e diminuzione della sintesi di ATP e in definitiva influenzano accumulo di grasso. Nelle analisi svolte è stata riscontrata una differenza tra i livelli di espressione dei geni analizzati nei tessuti considerati.

In definitiva:

- lo studio delle frequenze che questi hanno nella razza Casertana potrà essere utile al fine di recuperare questa razza in schemi di selezione e incrocio per l'aumento della competitività del sistema suinicolo nazionale anche in zone marginali in allevamento estensivo e con una alimentazione di recupero sfruttando la rusticità e resistenza del tipo genetico, senza rinunciare alla qualità del prodotto ed economicità dell'allevamento;
- il confronto delle frequenze geniche per i loci che sono risultati associati con i caratteri produttivi nelle razze in selezione tra la Casertana e le altre razze permetterà un'ulteriore validazione delle associazioni trovate;
- le differenze nell'espressione genica riscontrate tra la Casertana e Large White daranno l'opportunità di conoscere meglio le basi genetiche delle evidenti differenze nelle performance zootecniche tra le due razze.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Mariasilvia D'Andrea (Ricercatore tempo determinato)

#### PUBBLICAZIONI

- 1) D'ANDREA M., CAMPANELLA A., PILLA F. (2008): *UCP2: Structural and expression studies in Casertana pigs*, 31th Conference of the International Society for Animal Genetics (ISAG), 20-24 July 2008 P 2071.
- 2) D'ANDREA M., CAMPANELLA A., PILLA F. (2009): *Differences in Stearoly- CoA Desaturase (SCD) gene expression between Casertana and Large White pig breeds associated with gene polymorphisms*, Proceeding of ASPA 18<sup>th</sup> Congress June 9-12-2009.



VINCENZO RUSSO\*

## Ricerca di geni differenzialmente espressi in suini di diverse razze sottoposte a stress premacellazione\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Lo stress è una reazione di risposta a stimoli esterni che influenza sia il metabolismo che il comportamento. La risposta allo stress può determinare effetti negativi su accrescimento, prestazioni produttive e riproduttive, resistenza a malattie. Terlouw et al. (2005) riportano che lo stress premacellazione nel suino può influenzare negativamente la qualità della carne. Una migliore conoscenza dei processi metabolici che regolano la risposta allo stress e l'identificazione di geni responsabili della suscettibilità/resistenza allo stress, sono elementi molto importanti anche per conoscere i geni che controllano la qualità della carne. Lo scopo di questa linea di ricerca è stato l'identificazione dei profili di trascrizione di geni espressi nel muscolo scheletrico e nel tessuto epatico in suini di tre razze (Large White Italiana, LWI; Duroc Italiana, DI; Pietrain, PI) sottoposti a stress fisico acuto immediatamente prima della macellazione, confrontati con quelli di suini non stressati.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Trentotto suini maschi castrati non parenti di tre razze (LWI, DI, PI) sono stati allevati nella struttura zootecnica del DIPROVAL e divisi in due gruppi per razza di cui uno sottoposto a stress fisico appena prima della macellazione. La descrizione dei soggetti (razza, genotipo al *locus* Alotano, presenza/assenza

\* Università di Bologna, Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare

\*\* Unità di ricerca Università di Bologna, responsabile scientifico prof. Vincenzo Russo

RAZZA	<i>RYR1</i> G.1843C>T	STRESSATI	NON STRESSATI
LWI	CC	5	5
DI	CC	5	5
PI	CC	4	4
PI	CT	4	3
PI	TT	-	3

Tab. 1 Numero di suini per razza loro genotipo per il polimorfismo *RYR1* g.1843C>T

di stress) è riportata in tabella 1. Il protocollo sperimentale era in accordo con le regole approvate dal Comitato Etico dell'Università di Bologna.

Per ogni animale sono stati misurati alcuni parametri qualitativi della carne (pH e colore). Alla macellazione sono stati inoltre prelevati campioni di tessuto muscolare e di fegato per l'estrazione dell'RNA e il profilo di espressione è stato determinato mediante analisi microarray e real time PCR quantitativa. Per le analisi statistiche si è utilizzato il software SAS 9.2.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

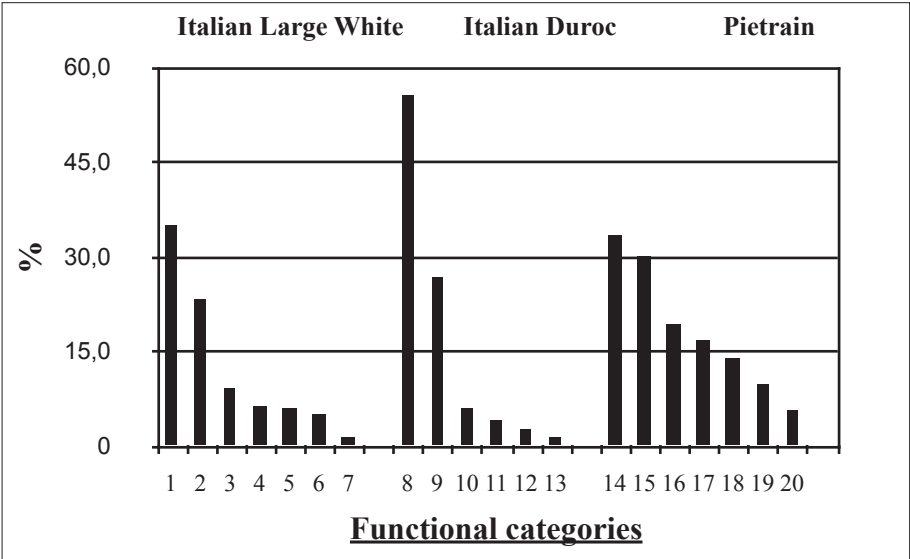
La prova microarray effettuata sul tessuto muscolare scheletrico ha evidenziato liste diverse di geni differenzialmente espressi (DE) tra le razze analizzate e tra stressati e non stressati entro razza. Il numero totale di geni individuati come DE nel muscolo scheletrico in ogni razza suina e la loro suddivisione in sovraespressi e sottoespressi è riportata in tabella 2.

L'elevato numero di geni DE osservato in particolare per le razze LWI, DI e PI Hal CT, indica che i processi metabolici e fisiologici del tessuto muscolare nella risposta allo stress sono molteplici e complessi in accordo con quanto già segnalato da diversi Autori (Hazard et al., 2008; Terlouw et al., 2005; Terlouw and Rybarczyk, 2008). Sulla base dell'elevato numero di geni coinvolti in tale risposta indicato dalla presente ricerca è possibile ipotizzare che si instauri una complessa rete di interazioni tra cellule e che parecchie vie metaboliche intervengano. In figura 1 è riportata la classificazione dei geni sovra-regolati nel muscolo dei suini stressati nelle principali categorie funzionali.

In figura 1 si osserva che per ogni razza vengono attivate specifiche categorie funzionali. Nei soggetti LWI sono principalmente presenti geni del metabolismo dei lipidi, e dell'attivazione di segnali cellulari. Nei suini DI diversi geni per i quali è stato osservato un maggiore livello di espressione sono coinvolti nel metabolismo di proteine e carboidrati. Nei suini PI Hal CT si osserva un numero di geni sovraespressi molto più elevato sia rispetto

RAZZA E GENOTIPO	NUMERO TOTALE DI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI	GENI SOVRAESPRESSI NEI SUINI STRESSATI	GENI SOTTOESPRESSI NEI SUINI STRESSATI
LWI Hal CC	980	414	499
DI Hal CC	1388	553	762
PI Hal CC	187	72	104
PI Hal CT	3383	1586	1455

Tab. 2 Numero di geni sovraespressi e sottoespressi nei suini stressati e numero totale di geni differenzialmente espressi nel tessuto muscolare



ITALIAN LARGE WHITE		ITALIAN DUROC		PIETRAIN	
N	Functional categories	N	Functional categories	N	Functional categories
1	Cytoplasm	8	Metabolic process	14	Regulation of cellular processes
2	Hydrolase activity / Proteolysis	9	Protein metabolic process	15	Nucleus
3	Protein transport	10	Carbohydrate metabolism	16	Response to stimulus
4	Enzyme regulator activity	11	Signal transduction	17	Intracellular signal cascade
5	Lipid metabolic process	12	Response to stimulus	18	Stress response
6	Signal transduction	13	Stress response	19	Signal transduction
7	Stress response			20	Blood vessels angiogenesis

Fig. 1 Principali categorie funzionali dei geni sovraespressi nel muscolo nelle tre razze

alla DI che alla LWI (tab. 1). I geni DE nei suini PI Hal CT sono codificanti per proteine coinvolte in vari processi metabolici, oltre che nella regolazione cellulare, si trovano geni che codificano per proteine che regolano la trascrizione e l'espressione genica. I suini PI Hal CC presentano un numero di geni sovraespressi notevolmente inferiore rispetto a LWI, DI e PI Hal CT. La maggior parte dei geni DE è coinvolta nella regolazione di processi del nucleo e processi metabolici. Il numero molto limitato di geni sovraespressi nei suini stressati di razza PI non sensibili ad Alotano potrebbe essere determinato da una più ridotta o più lenta reazione di risposta a situazioni di stress con conseguente minore o più lenta attivazione dei processi metabolici e fisiologici di riparazione cellulare.

In comune tra i quattro gruppi (LWI, DI, PI Hal CC, PI Hal CT) ci sono geni compresi nelle categorie "risposta allo stress" e "trasduzione del segnale". Diversi geni codificanti per alcune *Heat shock protein (HSP)* sono presenti in tutte le razze e nei diversi genotipi HAL entro razza PI considerati. Le HSP sono proteine la cui sintesi è stimolata in seguito a eventi stressanti e che hanno la funzione di proteggere le cellule da danneggiamenti. Analisi sulla qualità della carne dei 38 suini utilizzati per la prova hanno messo in evidenza un effetto negativo dello stress su pH e colore. Una successiva analisi microarray è stata effettuata su campioni di tessuto epatico degli stessi 38 soggetti. I dati ottenuti dalle analisi microarray che sono stati fino a ora parzialmente elaborati (tab. 3) indicano per i campioni di razza LWI 348 geni differenzialmente espressi nel tessuto epatico. Nei campioni DI 345 geni presentano differenze a livello trascrizionale. In comune tra le due razze ci sono 14 geni differenzialmente espressi nei due tessuti esaminati: tessuto muscolare e tessuto epatico.

Per validare i risultati ottenuti è in corso l'analisi Real Time PCR quantitativa (qRT-PCR) su alcuni geni (NOS2, HSP27, HSP70, IGF1, TPM2, TGFB1) scelti tra quelli DE dell'analisi microarray in base alla funzione del gene e al valore del Fold Change. I risultati preliminari su alcuni di questi gene confermano le differenze di espressione osservate con l'analisi microarray sul tessuto muscolare.

Razza	Numero totale di geni differenzialmente espressi	Geni sovraespressi nei suini stressati	Geni sottoespressi nei suini stressati
LWI	348	156	192
DI	345	174	171

Tab. 3 *Numero di geni sovraespressi e sottoespressi nei suini ILW e DI stressati e numero totale di geni differenzialmente espressi nel tessuto epatico*

L'analisi dei profili di espressione con la tecnica microarray ha consentito di individuare che nelle diverse razze considerate specifiche categorie funzionali e complesse interazioni geniche vengono attivate in seguito a stress. I geni che hanno presentato differenze a livello trascrizionale tra soggetti stressati e non stressati possono rappresentare interessanti candidati per la ricerca di marcatori genetici da utilizzare in studi di associazione con la qualità della carne suina.

#### BIBLIOGRAFIA

- DOMINIQUE HAZARD, LAURENCE LIAUBET, MAGALI SANCRISTOBAL AND PIERRE MOR-MÈDE (2008): *Gene array and real time PCR analysis of the adrenal sensitivity to adreno-corticotrophic hormone in pig*, «BMC Genomics», 9, pp. 101.
- TERLOUW C. (2005): *Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience: A brief review of recent findings*, «Liv. Prod. Sci.», 94, pp. 125-135.
- TERLOUW EM, PORCHER J, FERNANDEZ X. (2005): *Repeated handling of pigs during rearing. II. Effect of reactivity to humans on aggression during mixing and on meat quality*, «J Anim Sci.», 83 (7), pp.1664-72.
- TERLOUW E.M.C. , RYBARCZYK P. (2008): *Explaining and predicting differences in meat quality through stress reactions at slaughter: The case of Large White and Duroc pigs*, «Meat Sci.», 79, pp. 795-805.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Roberta Davoli (Professore ordinario)  
Paolo Zambonelli (Ricercatore)  
Luca Fontanesi (Ricercatore)  
Silvia Braglia (Assegnista)  
Michela Colombo (Dottoranda)  
Marco Comella (Dottorando)  
Carlo Annaratone (Assegnista)

#### PRODOTTI

- Definizione di protocolli di analisi microarray e qRT-PCR per l'analisi dei profili di espressione genica.
- Profilo di espressione genica del tessuto muscolare e del tessuto adiposo in suini di diverse razze sottoposti a stress.

## TRASFERIMENTO

Individuazione di geni/marcatori coinvolti nella resistenza/suscettibilità allo stress utilizzabili in schemi selettivi.

## PUBBLICAZIONI

*Su Atti di Convegni*

- 1) ZAMBONELLI P, DAVOLI R, FONTANESI L., STELLA A., HEDEGAARD J., HORNSHØJ H., COLOMBO M., NANNI COSTA L., RUSSO V. (2008): *A microarray-based approach for the identification of skeletal muscle genes related to stress in pigs*, XXXI Conference of the International Society for Animal Genetics (20-24 July 2008), Amsterdam, The Netherlands, Poster 2131.
- 2) DAVOLI R., ZAMBONELLI P., HEDEGAARD J., HORNSHØJ H., NANNI COSTA L., STELLA A., FONTANESI L., COLOMBO M., BENDIXEN C., RUSSO V. (2009): *Transcriptome analysis of skeletal muscle tissue to identify genes involved in pre-slaughter stress response in pigs*, Atti XVIII Congresso Nazionale ASPA. Palermo 9-12 Giugno 2009, «Italian Journal of Animal Science», 2009, 8, pp. 69-71.
- 3) SCHIAVINA S., COLOMBO M., HEDEGAARD J., HORNSHØJ H., DAVOLI R., FONTANESI L., STELLA A., NANNI COSTA L., BENDIXEN C., RUSSO V. (2007): *Analysis of skeletal muscle tissue expression profiles in pig to identify genes involved in meat quality traits: effect of stress conditions before slaughtering in different pig breeds*, Atti XVII Congresso Nazionale ASPA, «Italian Journal of Animal Science», 2007, 6, p. 205.
- 4) DAVOLI R., ZAMBONELLI P., BRAGLIA S. (2009): *A transcriptional profiling approach to identify functional genes affecting pig meat quality*, in Atti Convegno “Genomics, Biotechnology and quality of animal products in sustainable production systems with consideration of animal welfare”, Jastrebiec, Poland, 22-23 October 2009, JASTRZEBIEC N/WARSAW, pp. 24-33.



ALESSIO VALENTINI\*

## Ricerca di polimorfismi nei promotori di geni candidati per la qualità della carne e valutazione della loro efficienza trascrizionale in colture cellulari trasfettate, mediante geni reporter\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Il primo livello di regolazione dell'espressione di un gene avviene a livello trascrizionale. La trascrizione dipende principalmente da una regione chiamata "promotore", caratterizzata da specifiche sequenze di DNA in grado di legare i fattori di trascrizione. Mutazioni che interessano le regioni promotrici possono determinare differenze nell'inducibilità di un gene, e quindi nella sua espressione. I Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNP) sono variazioni di sequenza del DNA, dovute all'alterazione di un singolo nucleotide nella sequenza del genoma, e possono cadere, in una regione codificante oppure in una regione non codificante del gene, ma anche in una regione regolativa. La ricerca di polimorfismi nei promotori di geni candidati per la qualità della carne ha lo scopo di studiare se e quanto varia l'attività di tali geni per i diversi aplotipi, identificati in individui differenti.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Fasi della procedura sperimentale:

1. scelta di geni candidati per la qualità della carne
2. estrazione di gDNA da fegato di 10 animali di Large White e 10 di Casertana

\* *Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Produzioni Animali*

\*\* *Unità di ricerca Università di Viterbo, responsabile scientifico prof. A. Valentini*

3. disegno di primer per amplificare regioni promotrici da 500-2000bp e l'identificazione degli SNP tramite sequenziamento
4. clonaggio delle varianti alleliche del promotore in un vettore T/A
5. clonaggio delle varianti alleliche a monte del gene *luc2P* (pGL4.17) che codifica per la luciferasi, una proteina che emette luminescenza nel verde. Il sistema utilizzato è il *dual-luciferase reporter assay system* (Promega); per normalizzare viene cotrasfettato un secondo vettore (pGL4.75) con il gene *hRluc*, che codifica per una diversa proteina luminescente, sotto un promotore costitutivo (CMV).
6. trasfezione di tali costrutti in colture stabilizzate CHO e C2C12, mediante liposomi (Transfectam, Promega)
7. rilevazione della luminescenza
8. analisi statistica per valutare una differenza di espressione genica *in vitro*.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Tra i geni che abbiamo scelto, alcuni come FABP4 (*fatty acid binding protein 4*), FABP3 (*fatty acid binding protein 3*), SCD (*Steroyl-CoA desaturase*), LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*), LIPE (*gene HLS*), DGAT1 (*Diacylglycerol acyltransferase*) e ACACA (*Acetyl-Coenzyme A carboxylase Alpha*), sono coinvolti nei processi metabolici lipidici; altri come GDF8 (*myostatin*), MYF5 (*myogenic factor 5*), MYOD1 (*myogenic differentiation 1*), OPN (*osteopontin*), LEP (*leptin*), PLN (*Phospholamban*), CAST (*calpastatin*) e CALP (*calpain*) sono implicati nei processi di sviluppo muscolare e accrescimento corporeo.

Per ogni gene abbiamo disegnato diverse coppie di primer in grado di amplificare la regione genomica al promotore (500-2000bp). L'amplificazione per PCR e il sequenziamento dei frammenti ci ha permesso di individuare diverse varianti alleliche in più geni. Sono stati identificati SNP nei geni SCD, LEP, LDLR, OPN, GDF8, MYOD, MYF.

Per tutti e quattro i geni OPN (A/G), MyoD1 (A/G), Myf (C/G) e GDF8 (A/G), l'allele selvatico e l'allele mutato sono stati isolati dagli eterozigoti tramite clonaggio in TOPO-cloning. Le due forme alleliche per tutti e quattro i geni sono state successivamente clonate nel vettore di trasfezione pGL4.17, a monte del gene *luc+* (Promega). Sono ancora in corso gli esperimenti di trasfezione. Mentre le varianti alleliche identificate per SCD, LDLR e LEP sono state anche saggiate *in vitro* tramite trasfezione.

## SCD

Dall'allineamento delle sequenze di SCD è emersa la presenza di un aplotipo costituito da due SNP nelle posizioni 1367 e 1387. In entrambe le posizioni si tratta di una transversione C→A (C1367A e C1387A). Per le successive analisi, è stato isolato l'allele selvatico da un eterozigote (il campione di razza Casertana CAF2) tramite clonaggio in TOPO-cloning; mentre l'allele portatore degli SNP è stato isolato da un campione in cui si presentava in omozigosi (CAF7). Le due forme alleliche, così isolate, sono state successivamente clonate in vettori di trasfezione a monte del gene *luc+* (Promega). I plasmidi, SCD9-21 (selvatico) e SCDF73 (promotore con i due SNP), sono stati utilizzati per trasfettare cellule in coltura della linea CHO. In particolare, ciascuno dei due plasmidi è stato co-trasfettato nelle cellule con il plasmide pGL4.75 e sono state fatte tre trasfezioni in triplicato per ciascun clone. L'analisi statistica delle misure di luminescenza effettuate al luminometro ha evidenziato una differenza significativa nei profili di espressione genica determinati dai due diversi alleli del promotore. L'analisi della varianza, in questo caso, è stata eseguita utilizzando un modello che oltre all'attività del promotore ha considerato anche il ruolo della piastra, in quanto, è stato osservato che il contributo delle diverse piastre ha avuto un effetto sui risultati. Come si può vedere nella tabella sotto (tab. 1) il valore-P è inferiore al valore di 0.05, scelto come limite del livello di significatività. Il grafico seguente (fig. 1) mostra la dispersione delle misurazioni relative ai due cloni. Il promotore con i due SNP, inserito nel costrutto SCDF73, ha dimostrato un'efficienza minore di quello con la sequenza depositata in banca dati.

ANALYSIS OF VARIANCE: EFFECTS TESTS SIGNIFICANCE STRENGHT						
SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P-VALUE	R-SQUARE
PROMO	0.14	1	0.14	9.17	0.0097	0.34
PIASTRA	0.08	1	0.08	5.10	0.0418	0.19
All Sources	0.22	2	0.11	7.14	0.0081	0.52
Error	0.20	13	0.02			
Total	0.42	15				

Tab. 1 *Analisi della varianza*

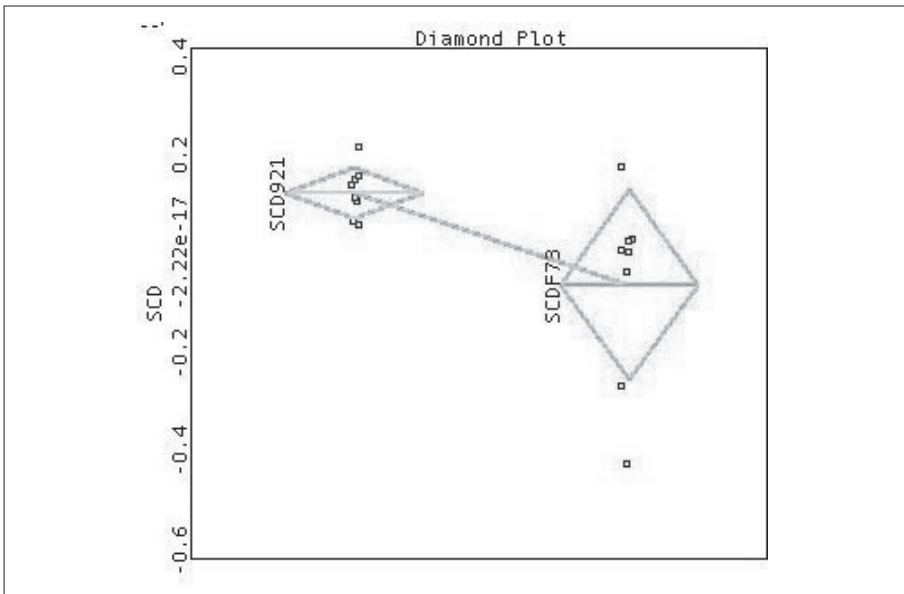


Fig. 1 Distribuzione delle misurazioni dell'attività dei promotori SCD921 e SCDF73. Ascisse: i due costrutti con i due promotori; ordinate:  $\log(iL)-\log(iR)$ , dove  $iL$  e  $iR$  sono rispettivamente le intensità di luminescenza della luciferasi e della renilla.

#### LDLR

Il sequenziamento delle sequenze di LDLR ha identificato uno SNP in posizione 555; in particolare una transversione G→T (G555T). L'allele selvatico, con la G, è stato isolato da un campione della razza Large White (LWF1) mentre l'allele con la T è stato isolato da un campione di Casertana (CAF2), in entrambi i casi si presentavano in omozigosi. In seguito alla clonazione nei vettori di trasfezione, i due cloni sono stati chiamati rispettivamente LDLR1-31 e LDLR2-51. Lo stesso protocollo di trasfezione precedentemente descritto per SCD è stato applicato per i due cloni LDLR1-31 e LDLR2-51. Anche in questo caso l'analisi statistica della varianza ha mostrato un'espressione differenziale significativa. Il valore-P è pari a 0.024 e ricade quindi sotto il limite di 0.05 scelto come livello di significatività (tab. 2). Il grafico sotto si riferisce alla distribuzione dei punti relativi alle misurazioni (fig. 2). Il promotore che ha mostrato maggiore efficienza è stato quello nel costrutto LDL2-51, cioè quello con la sequenza depositata in banca dati.

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F-RATIO	P
APLOTYPES	0.309	1	0.309	5.801	0.024
REPLICATE(EXP)	0.297	16	0.019	0.348	0.984
EXP(APLOTYPES)	0.543	5	0.109	2.036	0.110
Error	1.280	24	0.053		

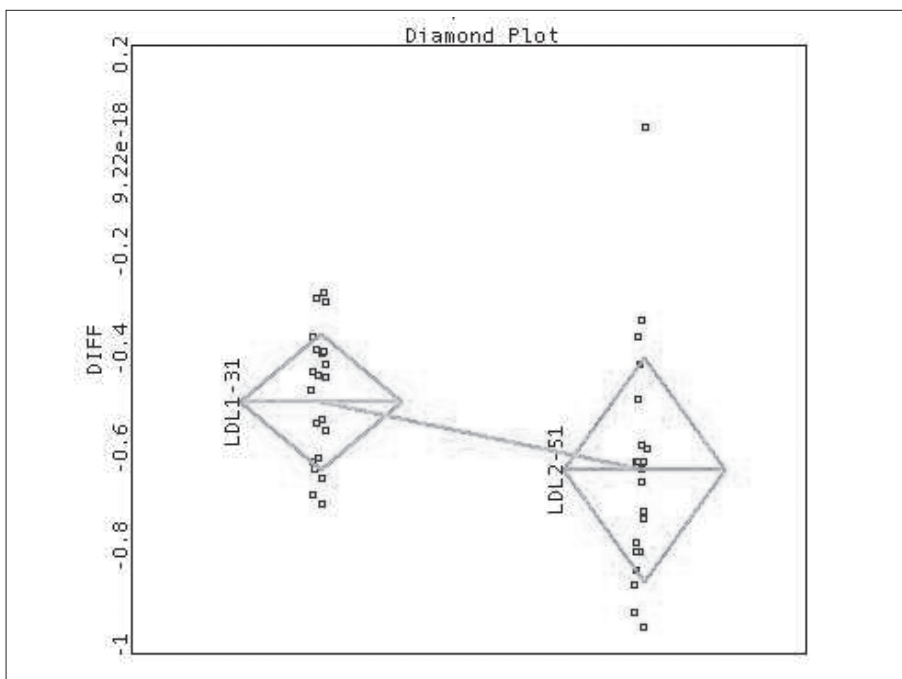
Tab. 2 *Analisi della varianza*

Fig. 2 *Distribuzione delle misurazioni dell'attività dei promotori LDL1-31 e LDL2-51. ascisse: i due costrutti con i due promotori; ordinate:  $\log(iL)-\log(iR)$ , dove  $iL$  e  $iR$  sono rispettivamente le intensità di luminescenza della luciferasi e della renilla.*

## LEP

L'analisi delle sequenze del promotore per il gene LEP ha portato all'identificazione di due alleli, di cui uno selvatico e uno con 16 polimorfismi di cui 14 SNP e 2 delezioni (del14: 4532 CTTGTGACAAATGGC→del e delTCC: 4650TCC→del) (tab. 3). I due alleli sono stati isolati tramite TOPO-cloning da campioni di Large White in cui si presentavano in eterozigosi e sono stati chiamati LEPF3 (selvatico) e LEPF46 (aplotipo mutante) (tab. 3).

LEPTIN Promoter															
Nucleotide:	4532	4565	4594	4620	4650	4699	4826	4841	4865	4924	5112	5127	5202	5344	5374
Alleles:	/del14	TG/CA	A/G	C/A	/delTCC	T/A	A/G	T/C	T/A	G/A	T/G	G/C	C/T	A/G	C/A
LEPF3	/	CA	A	C	/	T	A	T	T	G	T	G	C	A	C
LEPF46	del14	TG	G	A	delTCC	A	G	C	A	A	G	C	T	G	A

Tab. 3 Polimorfismi negli alleli del promotore della leptina

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F-RATIO	P
APLOTYPES	0.017	1	0.017	0.804	0.382
EXP(APLOTYPES)	0.294	4	0.074	3.449	0.029
REPLICATE(EXP)	0.067	14	0.005	0.224	0.997
Error	0.384	18	0.021		

Tab. 4 Analisi della varianza

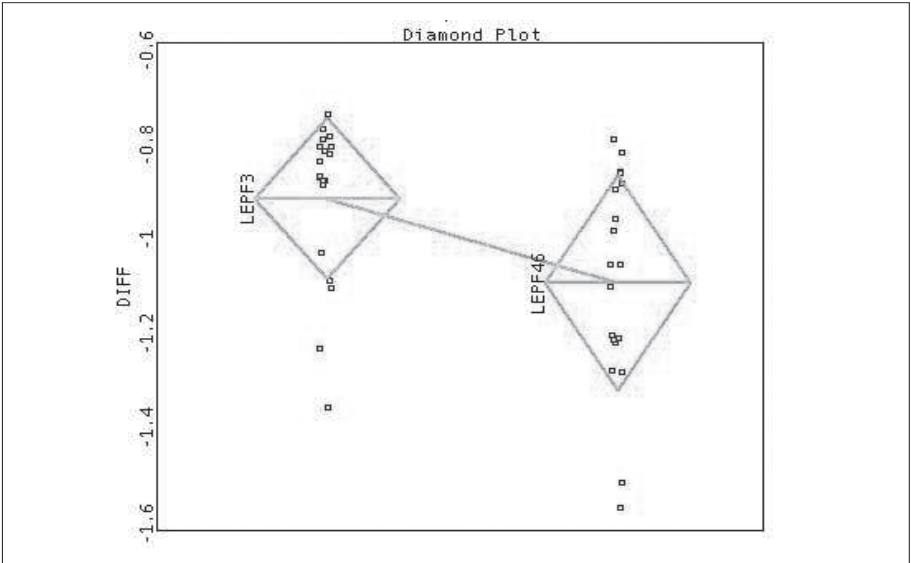


Fig. 3 Distribuzione delle misurazioni dell'attività dei promotori LEPF3 e LEPF46. Ascisse:  $i$  due costrutti con  $i$  due promotori; ordinate:  $\log(iL)-\log(iR)$ , dove  $iL$  e  $iR$  sono rispettivamente le intensità di luminescenza della luciferasi e della renilla.

Le letture al luminometro, effettuate in seguito agli esperimenti di trasfezione sia in cellule CHO che nella linea cellulare muscolare C2C12, non hanno portato a risultati statisticamente significativi. La tabella 4 mostra i risultati dell'analisi statistica, mentre la figura 3 mostra la distribuzione dei punti. Il

valore-P legato all'aplotipo, cioè alla differenza dei promotori, è 0.382, al di sopra del limite di significatività del 5%.

#### PRODOTTI

- È stata messa a punto la metodica di trasfezione mediante geni reporter, per la valutazione dell'efficienza trascrizionale di polimorfismi nel promotore di geni candidati.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Silvia Bongiorno (Assegnista)  
Silvia Bicorgna (Dottoranda)





VINCENZO RUSSO\*

## Validazione mediante real time-PCR (qRT-PCR) di geni differenzialmente espressi all'analisi microarray in suini estremi per potenziale glicolitico\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Il parametro potenziale glicolitico (PG) influenza le più importanti caratteristiche tecnologiche della carne quali pH ultimo, capacità di ritenzione idrica e colore. Nonostante l'importanza del PG per la qualità della carne suina la conoscenza dei geni che influenzano la variazione di tale parametro è molto limitata e non è noto se il PG varia in funzione del livello di trascrizione dei geni del tessuto muscolare scheletrico. Entro il progetto FIRB mediante analisi microarray era stato individuato un set di geni con espressione differenziale in pool di campioni di suini di razza Large White Italiana utilizzati per la produzione di prosciutti DOP che erano divergenti per livello di PG. L'obiettivo della presente ricerca è la validazione dei risultati microarray mediante analisi quantitative real time-PCR (qRT-PCR).

### MATERIALI E METODOLOGIE

Per l'estrazione dell'RNA sono stati utilizzati 16 campioni individuali di muscolo Semimembranoso prelevati alla macellazione da suini Large White Italiani (ILW) nell'ambito di prove sib test dell'ANAS (Associazione Nazionale Allevatori Suini). Dei campioni scelti 8 avevano valore di GP <65 umol lattato equivalente/g di muscolo e 8 valore di GP >145 umol lattato equivalente/g di muscolo. I campioni non presentavano la mutazione R200Q

\* Università di Bologna, Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare

\*\* Unità di ricerca Università di Bologna, responsabile scientifico prof. Vincenzo Russo

nel gene PRKAG3 (Milan et al. 2000). Il livello di trascrizione di 10 geni, selezionati tra quelli che erano risultati differenzialmente espressi (DE) nel precedente esperimento microarray nell'ambito del progetto FIRB, è stato analizzato mediante qRT-PCR utilizzando SYBR Green e curva di calibrazione. La quantificazione relativa dell'mRNA di ogni gene nei campioni è stata ottenuta con due geni normalizzanti (B2M e POLR2A). I dati dei due pool sono stati confrontati mediante t test e Mann-Whitney U test. La ricerca di polimorfismi è stata effettuata con Rotor GENE 6000 Instrument.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti confermano la sovraespressione di geni associati con importanti processi metabolici del muscolo in campioni con basso PG, già osservata da analisi microarray. Nessuno dei geni trovati sovraregolati nel pool con alto potenziale glicolitico da analisi microarray ha invece presentato nell'analisi qRT-PCR differenze significative di espressione tra i campioni con basso e alto livello di PG (fig. 1).

I risultati delle analisi quantitative sull'RNA dei geni scelti (MYOZ2, PLN, SCD, TNNC1, TNNT1) che codificano per proteine con ruoli importanti per il metabolismo del tessuto evidenziano una più elevata trascrizione di questi geni in presenza di ridotto livello di glicogeno. I dati indicano in particolare una modulazione dei cicli metabolici che portano a variazioni dei livelli di calcio intracellulare, trasmissione di segnali tra cellule a opera degli ioni calcio e a variazioni del livello energetico. Tutti i geni trovati differenzialmente espressi con real time codificano per proteine coinvolte in modo specifico nel metabolismo e nella fisiologia del tessuto muscolare.

Il gene fosfolambano (PLN), che codifica per una proteina che forma un importante canale del calcio attraverso la membrana della cellula muscolare, partecipa attivamente alla regolazione del livello di calcio intracellulare. Inoltre la proteina codificata da PLN è un importante substrato per una chinasi c-AMP dipendente (Protein Kinase-A o PKA) nel tessuto muscolare e ha il doppio ruolo di inibire o attivare l'enzima SerCa(2+) ATPasi del reticolo sarcoplasmatico del muscolo scheletrico. Tale doppio ruolo di inibitore o attivatore dipende rispettivamente dallo stato di fosforilazione della proteina codificata.

Il gene Miozenina 2 (MYOZ2) codifica per una fosfatasi che riveste una importante funzione nella transduzione calcio dipendente del segnale tra cellule in diversi tessuti non solo nel tessuto muscolare. Troponina C

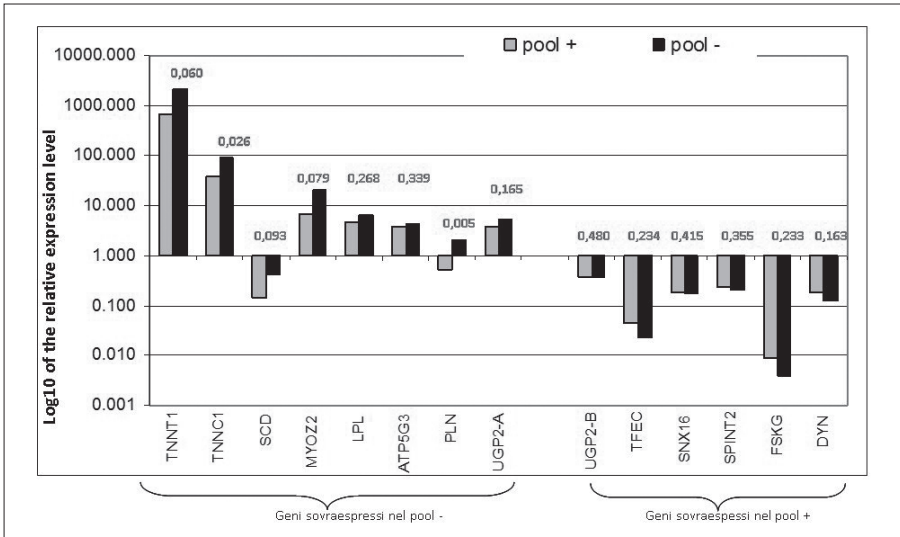


Fig. 1 *Livelli di espressione dei geni differenzialmente espressi in pool di campioni (pool+ e pool-) di suini ILW estremi per Potenziale glicolitico nel muscolo. (Al di sopra delle barre sono indicati i valori di probabilità del test T)*

(TNC) e Troponina T1 (TNNT1) sono due importanti proteine strutturali del muscolo che intervengono nella contrazione muscolare e TNC in particolare è coinvolta nel passaggio di calcio all'interno del sarcoplasma della miofibrilla attivando una serie di processi e interazioni tra proteine miofibrillari che portano alla interazione di actina con miosina, a idrolisi di ATP e a contrazione del muscolo. Stearoyl-CoA-desaturasi (SCD) è un gene che ha un ruolo rilevante nel metabolismo energetico della cellula. Stearoyl-CoA desaturasi è considerato un enzima chiave regolatore in pathways lipogenici. SCD codifica per l'enzima limitante che catalizza principalmente la sintesi di acido oleico (C18:1) e acido palmitico (C16:1) che sono acidi grassi monoinsaturi utilizzati dalla cellula in modo preferenziale rispetto agli acidi grassi saturi per la sintesi di fosfolipidi di membrana, per la sintesi di trigliceridi e del colesterolo. La regolazione dell'espressione di SCD nel tessuto muscolare e l'attività dell'enzima codificato hanno un significato fisiologico molto importante. In letteratura alcuni autori (Lehnert et al., 2007; Da Costa et al., 2004) hanno riportato che la trascrizione del gene è più elevata in soggetti di diverse specie (bovino e topo) sottoposti a restrizione alimentare con effetti sul bilancio energetico cellulare. In base a ciò è possibile ipotizzare che la più elevata espressione del gene SCD nel tessuto muscolare di suini con un basso

livello di glicogeno e di conseguenza caratterizzato anche da un ridotto livello energetico, potrebbe rappresentare una specifica risposta adattativa (trascrizionale e metabolica) a tale condizione con una incrementata sintesi di acidi grassi insaturi. È importante inoltre segnalare i risultati di lavori recenti che descrivono in specie diverse un legame tra l'attività di SCD e il metabolismo dei carboidrati in diversi tessuti (Dobrzyn et al., 2008). Questi lavori supportano l'ipotesi che la ridotta espressione del gene SCD e la conseguente riduzione di attività dell'enzima codificato sembra essere associata con aumentata sensibilità all'insulina nel tessuto adiposo e nel tessuto muscolare cardiaco, aumentato uptake di glucosio, più elevata attività dell'enzima glicogeno sintetasi e accumulo di glicogeno. Tale ipotesi potrebbe anche spiegare quanto osservato nella presente ricerca dove si osserva una ridotta espressione del gene in campioni con più elevato livello di glicogeno.

Con l'obiettivo di individuare polimorfismi SNP da utilizzare come marcatori per lo studio di associazione tra i geni trovati differenzialmente espressi tra campioni con alto e basso valore di potenziale glicolitico e caratteristiche qualitative della carne sono stati individuati SNP nei geni PLN, SCD, MYOZ2 sia mediante ricerca *in silico* sia mediante analisi di prodotti PCR su Rotor Gene 6000. Questi polimorfismi sono stati quindi tipizzati in una popolazione di circa 300 suini di razza Large White Italiana e sono in corso le elaborazioni dei dati ottenuti e lo studio di associazione con il parametro PG e altre caratteristiche qualitative della carne.

Le tecniche di analisi della espressione genica sono uno strumento molto utile per la comprensione dei processi fisiologici e metabolici che regolano il livello di glicogeno nel muscolo e per individuare i geni che rivestono un ruolo chiave nei processi molecolari alla base di questi meccanismi di regolazione. Tali geni potranno essere considerati importanti geni candidati da utilizzare in studi di associazione con la qualità della carne.

#### BIBLIOGRAFIA

DENIS MILAN, JIN-TAE JEON, CHRISTIAN LOOFT, VALERIE AMARGER, ANNIE ROBIC, MATTIAS THELANDER, CLAIRE ROGEL-GAILLARD, SVEN PAUL, NATHALIE IANNUCELLI, LARS RASK, HANS RONNE, KERSTIN LUNDSTRÖM, NORBERT REINSCH, JOEL GELLIN, ERNST KALM, PASCALE LE ROY, PATRICK CHARDON AND LEIF ANDERSSON (2000): *A Mutation in PRKAG3 Associated with Excess Glycogen Content in Pig Skeletal Muscle*, «Science», 288, pp. 1248-1251.

- S. A. LEHNERT, K. A. BYRNE, A. REVERTER, G. S. NATTRASS, P. L. GREENWOOD, Y. H. WANG, N. J. HUDSON, AND G. S. HARPER (2007): *Gene expression profiling of bovine skeletal muscle in response to and during recovery from chronic and severe undernutrition*, «J. Anim. Sci.», 84, pp. 3239-250.
- NUNO DA COSTA, CHRISTINE MCGILLIVRAY, QIANFAN BAI, JEFFREY D. WOOD, GARY EVANS, AND KIN-CHOW CHANG (2004): *Restriction of Dietary Energy and Protein Induces Molecular Changes in Young Porcine Skeletal Muscles*, «J. Nutr.», 134 (9), pp. 2191-2199.
- DOBRYN P, SAMPATH H, DOBRYN A, MIYAZAKI M, NTAMBI JM. (2008): *Loss of stearyl-CoA desaturase 1 inhibits fatty acid oxidation and increases glucose utilization in the heart*, «Am J Physiol Endocrinol Metab.», 294 (2), pp. E357-64.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Roberta Davoli (Professore ordinario)  
 Paolo Zambonelli (Ricercatore)  
 Luca Fontanesi (Ricercatore)  
 Silvia Braglia (Assegnista)  
 Marco Comella (Dottorando)  
 Michela Colombo (Dottoranda)

#### PRODOTTI

- Studio di espressione di geni del muscolo scheletrico di suino;
- Contributo alla conoscenza dei processi che regolano il livello di glicogeno nel muscolo scheletrico di suino;
- Geni candidati per il potenziale glicolitico del muscolo;
- Identificazione di marcatori SNP in geni candidati.

#### TRASFERIMENTO

Conoscenze trasferibili sono rappresentate dalla possibilità di utilizzare SNP di geni candidati per il potenziale glicolitico del muscolo in schemi di selezione per la qualità della carne.

#### PUBBLICAZIONI

*Su Atti di Convegni*

- 1) DAVOLI R., ZAMBONELLI P., BRAGLIA S., COMELLA M., FONTANESI L., STELLA A., COLOMBO M., BUTTAZZONI L., RUSSO V. (2008): *Microarray analysis of skeletal muscle genes in pigs divergent for glycolytic potential*, Atti xxxi Conference of the International Society for Animal Genetics (20-24 July 2008), Amsterdam, *Poster 2119*.
- 2) DAVOLI R., ZAMBONELLI P., BRAGLIA S. (2009): *A transcriptional profiling approach to identify functional genes affecting pig meat quality*, in Atti Convegno “Genomics,

Biotechnology and quality of animal products in sustainable production systems with consideration of animal welfare”, Jastrzebiec, Poland, 22-23 October 2009, Jastrzebiec N/Warsaw, pp. 24-33.

- 3) DAVOLI R., M. COLOMBO, S. SCHIAVINA, L. FONTANESI, L. BUTTAZZONI, V. RUSSO (2007): *Transcriptome analysis of porcine skeletal muscle: differentially expressed genes in Italian Large White pigs with divergent values for glycolytic potential*, «Italian Journal of Animal Science», 6, pp. 113-115.
- 4) ZAMBONELLI P., BRAGLIA S., ZAPPAVIGNA A., COMELLA M., RUSSO V., DAVOLI R.: *Expression analysis of porcine UPG2 gene splice variants in skeletal muscle tissue*, Associazione Scientifica di Produzione Animale, XVIII Congresso Nazionale Palermo, 9-12 giugno 2009.

DONATO MATASSINO\*

## Confronto tra Fiocco fresco e Fiocco stagionato ottenuti dal TGAA Casertana e dall'ibrido commerciale PEN AR LAN\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

L'approccio genetico allo studio della qualità della carne, basato sul rilevamento di geni polimorfici, o quello funzionale (fisiologia) del 'gene', basato sul monitoraggio dell'espressione di un numero limitato di geni, non può non tener conto della complessità e della molteplicità di meccanismi biochimici quali a esempio quelli che avvengono durante la proteolisi nel corso della frollatura della carne o della maturazione dei prodotti derivati e che sono evidenziabili mediante applicazione delle tecniche di proteomica. Scopo della ricerca è quello di confrontare il '*Fiocco*' ottenuto dal tipo genetico autoctono antico (TGAA) '*Casertana*' e dall'ibrido commerciale PEN AR LAN (a mantello bianco, ascendenti Large White e Landrace) mediante:

- a) individuazione di proteina/e associata/e ad alcune caratteristiche qualitative del prodotto;
- b) individuazione di segmenti di DNA codificanti le proteine;
- c) sequenziamento di segmenti di DNA/geni.

Il '*Fiocco*' è un prodotto locale tradizionale costituito, sostanzialmente, da tre muscoli: *Semimembranosus*, *Biceps femoris* e *Semitendinosus*.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Al fine di indagare la differenza di espressione semiquantitativa di *spot* discri-

\* Consorzio per la Sperimentazione, Divulgazione e Applicazione di Biotecnologie Innovative

\*\* Unità di ricerca CONSDABI, responsabile scientifico prof. Donato Matassino

minanti, ogni campione di '*Fiocco fresco*' è stato prelevato, distintamente per soggetto, da 20 suini [ 10 del TGAA '*Casertana*' e 10 dell' ibrido commerciale]. I campioni dei suddetti tipi genetici, processati in parallelo, sono stati analizzati mediante: (a) tecniche a elevata risoluzione [2D-IPG-SDS-PAGE (elettroforesi bidimensionale)] al fine di frazionare la componente proteica; (b) analisi d'immagine (Image Master 2D-Platinum) al fine di evidenziare eventuali variazioni nell'espressione proteica mediante l'analisi della variazione relativa di intensità (vol.,%); (c) tecniche di rivelazione a livello strutturale (MS) al fine di caratterizzare le proteine di interesse.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

L'analisi dell'immagine sulla frazione solubile delle proteine muscolari (fig. 1) ha rilevato un valore medio del numero degli *spot* pari a  $332,4 \pm 49,5$  (C.V., % = 15) per la Casertana e a  $307,6 \pm 75,2$  (C.V., % = 24) per l'ibrido. Il confronto tra le medie delle due popolazioni, mediante test t, non è risultato significativo. Le misure allo spettrometro di massa MALDI-TOF, hanno permesso di identificare 57 *spot* (tab. 1) alcuni dei quali risultano essere eterogenei con differenze nella massa [ $M_w$  (kDa)] e/o nel punto isoelettrico (pI) (Adenylate kinase, Carbonic Anhydrase, DJ-1, Enolase, HSP 60, HSP 70, Muscle Creatine kinase, Myoglobin, Peroxiredoxin, Phosphoglycerate mutase, Similar Parvalbumin, Transferrin, Triosephosphate isomerase). Tale eterogeneità potrebbe essere ascrivibile a:

- a) polimorfismo genetico (a esempio mutazioni puntiformi);
- b) modifiche post-trascrizionali (a esempio splicing alternativo);
- c) modifiche post-traduzionali (a esempio fosforilazioni e glicosilazioni).

Trentasette *spot* (65% di quelli identificati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF) sono in comune alla quasi totalità dei campioni (tab. 1).

In base alla loro funzione, i suddetti *spot* sono ascrivibili ai seguenti gruppi:

- a) proteine metaboliche  
l'enolasi (1 e 3), la triosofosfato isomerasi e la fosfoglicerato mutasi sono proteine citosoliche coinvolte nel metabolismo glicolitico del muscolo. Differenze statisticamente significative sono state riscontrate solo per uno *spot* della enolasi 3 (tab. 1 *spot* 34,  $P < 0,05$ ) il quale è risultato più abbondante nel PEN AR LAN;
- b) proteine per il trasporto di ossigeno  
emoglobina e mioglobina sono maggiormente presenti nella Casertana (tab. 1 *spot* 101, 104, 105,  $P < 0,001$ ). Una maggiore presenza di emo-



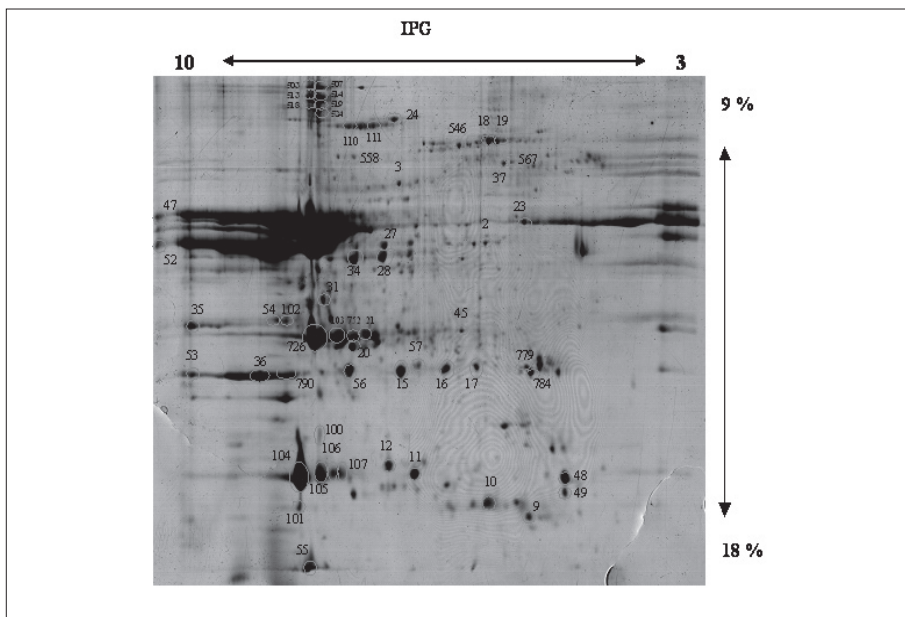


Fig. 1

globina può essere collegata a un suo maggior contenuto nel sangue e/o al grado di sanguinamento o a una maggiore vascolarizzazione tipica dei muscoli a metabolismo ossidativo;

c) indicatori di proteolisi

sono state osservate la leucina aminopeptidasi (LAP) e un frammento della creatina chinasi. Differenze statisticamente significative sono state riscontrate solo per la LAP (tab. 1 *spot* 3,  $P < 0,01$ ) la quale è risultata più abbondante nella Casertana. L'abbondanza di questo enzima nel tessuto muscolare è correlata positivamente con il valore  $L^*$  della carne;

d) fostransferasi

tale gruppo annovera la creatina chinasi con sette isoforme e l'adenilato chinasi con quattro. Differenze statisticamente significative, però, sono state riscontrate solo per uno *spot* relativo all'adenilato chinasi (tab. 1 *spot* 790,  $P < 0,05$ ) il quale è risultato più abbondante nella Casertana;

e) difesa cellulare

le proteine identificate sono le HSP 70 e 60, la tioredossina, la perossiredossina, la DJ-1, la gliossalasi e la superossido dismutasi. Differenze statisticamente significative ( $P < 0,01$ ) sono state riscontrate per la DJ-1 (tab. 1 *spot* 16 e 17) e l'HSP 70 (tab. 1 *spot* 18 e 546), tutte più abbondanti nella Casertana. L'HSP 70 e la DJ-1 offrono una protezione alla denaturazione

IDENTIFIED SPOT, N	SPOT, N	PROTEIN NAME	IDENTIFIED SPOT, N	SPOT, N	PROTEIN NAME
1	2	Zinc finger protein	30	55	Similar to polyubiquitin
2	3	Leucine aminopeptidase	31	56	Adenylate kinase
3	9	Thioredoxin	32	57	Adenylate kinase
4	10	FABP	33	100	Muscle Creatine kinase fragment
5	11	Myoglobin	34	101	Haemoglobin $\beta$ -chain
6	12	Superoxide dismutase	35	102	Carbonic anhydrase
7	15	DJ-1 protein	36	103	Triosephosphate isomerase
8	16	DJ-1 protein	37	104	Myoglobin
9	17	DJ-1 protein	38	105	Myoglobin
10	18	HSP 70	39	106	Myoglobin
11	19	HSP 70	40	107	Myoglobin
12	20	Adenylate kinase	41	110	Transferrin
13	21	Triosephosphate iso- merase	42	111	Transferrin
14	23	Haptoglobin	43	503	Muscle Creatine kinase
15	24	Muscle Creatine kinase	44	507	Muscle Creatine kinase
16	27	Enolase 3	45	513	Muscle Creatine kinase
17	28	Enolase	46	514	Muscle Creatine kinase
18	31	Muscle Creatine kinase	47	518	Muscle Creatine kinase
19	34	Enolase 3	48	519	Muscle Creatine kinase
20	35	Phosphoglycerate mutase	49	524	Muscle Creatine kinase
21	36	Adenilate kinase	50	546	HSP 70
22	37	HSP 60	51	558	Phosphoglycerate mutase
23	38	Muscle Creatine kinase	52	567	HSP 60
24	45	Peroxiredoxin	53	726	Triosephosphate isomerase
25	48	Similar Parvalbumin	54	752	Triosephosphate isomerase
26	49	Similar Parvalbumin	55	779	Peroxiredoxin
27	52	Aldolase	56	784	Glyoxalase
28	53	Adenylate kinase	57	790	Adenilate kinase
29	54	Carbonic anhydrase			

Tab. 1

proteica; tale denaturazione comporta, a esempio, perdita di colore e minore capacità di legare l'acqua, fenomeni osservabili in carne PSE.

Ai fini della qualità della carne, *spot* differenzialmente espressi sono quelli appartenenti ai gruppi della difesa cellulare e degli indicatori di proteolisi. In particolare, l'attenzione si è focalizzata sulla DJ-1. Questa proteina sarcoplasmatica è coinvolta in:

- processi cellulari
  - a) controllo dalla stabilità dell'mRNA;
  - b) oncogenesi;
- risposta allo stress ossidativo
  - a) come antiossidante e/o proteina chaperone;
- qualità della carne
  - a) correlata negativamente alla perdita di acqua per gocciolamento (Hwang, 2004).

Nei limiti del campo di osservazione, sono stati identificati tre *spot* della proteina DJ-1, differenti per punto isoelettrico e vol.,%. Lo *spot* più basico (pI ~ 7) non presenta differenze significative ( $P < 0,95$ ) tra le due popolazioni suine; al contrario, gli altri due *spot*, (pI ~ 6,4 e pI ~ 6) mostrano un volume percentuale che risulta significativamente maggiore nella Casertana ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,01$ , rispettivamente). La differenza di punto isoelettrico, 0,6 unità di pH tra la forma con punto isoelettrico di circa 7 e quella più acida (pI ~ 6,4) è, probabilmente, da attribuire a una modifica post-traduzionale (acetilazione della lisina) (Choudhary et al., 2009; Rush et al., 2005). A nostra conoscenza, nel suino non sono stati segnalati polimorfismi genetici per la DJ-1. Sono in corso ulteriori analisi immunochimiche e strutturali al fine di confermare questa ipotesi e spiegare la natura del polimorfismo osservato.

#### BIBLIOGRAFIA

- CHOUDHARY C ET AL. (2009): «Science», 325, pp. 834-840.  
HWANG I (2004): «Food Sci. Biotechnol.», 13, pp. 208-214.  
RUSH J ET AL. (2005): «Nat. Biotechnol.», 23, pp. 94-101.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Aldo Di Luccia (Professore associato)  
Roberta Boscaino (Amministrativo)  
Nadia Castellano (Ricercatore)  
Vincenzo Golia (Tecnico)  
Fabiola Del Grosso (Ricercatore)  
Carmen Di Prisco (Ricercatore)  
Domenico Falasca (Ricercatore)  
Gianluca Gigante (Ricercatore)  
Simona Gramazio (Tesista)  
Michela Grasso (Ricercatore)  
Caterina Incoronato (Ricercatore)  
Filomena Inglese (Ricercatore)

Marianna Manzone (Ricercatore)  
Mariaconsiglia Occidente (Ricercatore)  
Francesca Pane (Ricercatore)  
Rolando Pasquariello (Ricercatore)  
Luigina Rillo (Ricercatore)  
Francesco Romagnuolo (Ricercatore)  
Cristofaro Emilio Rossetti (Ricercatore)  
Giovanna Varricchio (Ricercatore)

#### PUBBLICAZIONI

- 1) MATASSINO D., DI PRISCO C., INGLESE F., ROMAGNUOLO F., DI LUCCIA A: *Differential expression of sarcoplasmic proteins in Casertana, Calabrese and Pen Ar Lan pork*, 7th International Symposium on Mediterranean Pig, 14-16 October 2010, Cordoba, España (Poster - Abstract).

Unità operativa carne bovina e altre specie



## Relazione del coordinatore

### DESCRIZIONE DEGLI OBIETTIVI GENERALI E DELLE LINEE DI RICERCA DELLA UO

Molti caratteri di importanza economica nella produzione della carne sono sotto controllo genetico. Molti pochi geni sono conosciuti e ancor meno usati in schemi di selezione. Molti caratteri, come quelli della qualità della carcassa e della carne sono misurati post mortem. Perciò, l'identificazione di geni legati a tali caratteri e la selezione per alleli favorevoli sarebbero particolarmente utili nella selezione per la produzione della carne. La disponibilità di varianti genetiche in loci delle caratteristiche della carne aiuta anche a adattare gli obiettivi della selezione in un mercato dove consumatori e produttori/distributori richiedono cambi anche in tempi brevi dei prodotti.

Nella presente linea di ricerca, chiamata brevemente Selmol-Carne, abbiamo voluto testare le più recenti metodiche di biologia molecolare nelle principali specie e razze da carne allevate in Italia per verificare se tali strumenti potessero essere utili nella selezione. In Selmol-Carne sono state considerate le specie Bovina, Ovina e Bufalina. Le tecniche impiegate sono state varie e tutte di recentissima invenzione. Sono stati impiegati: geni candidati, SNP ad alta densità, microarray e proteomica.

### AVANZAMENTI BASILARI DELLE CONOSCENZE

L'analisi dei geni candidati ha rilevato importanti effetti di alcuni di essi sulle performance produttive di bovini e ovini. Risultano statisticamente significa-

\* *Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Produzioni Animali*

tive le associazioni con i geni GDF8 e GHR (e similari) in entrambe le specie. Per i bovini risultano interessanti anche i geni LEP, OB-R, UCPX e altri, che presentano effetti di sostituzione allelica di un certo rilievo.

L'impiego del chip bovino da 54k Illumina ha consentito lo sviluppo di procedure per il calcolo dell'indice genomico (Genomic Selection), ma anche la scansione fine del genoma e ha portato, in particolare nella Piemontese, a identificare un gene (o una porzione stretta di cromosoma intorno a esso) altamente associato alla facilità di parto.

I microarray hanno consentito l'inizio di una indagine sull'effetto potenziale della selezione di individui omozigoti per alleli opposti ai geni candidati di cui sopra. I risultati preliminari mostrano una differenza di espressione soprattutto a carico di geni segnalatori e leganti acidi nucleici.

È stata messa a punto la tecnica di analisi proteomica del muscolo e sono state prodotte le mappe di base sulle quali saranno confrontati gli individui di cui al punto precedente in modo da avere una visione contemporanea delle modificazioni di trascrittoma e proteoma.

È in corso di svolgimento il sequenziamento del genoma e del trascrittoma del bufalo per avere gli strumenti di base per iniziare studi approfonditi sulla produzione e qualità della carne prodotta da questa specie.



ALESSIO VALENTINI\*

## Genome Selection per caratteri *post mortem* nella razza bovina Marchigiana\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Discendenti da un medesimo ceppo originario, i bovini italiani da carne Chianina, Marchigiana, Romagnola, Maremmana e Podolica sono diffusi su tutto il territorio italiano, con prevalenza nelle regioni centro meridionali. Le aziende, che seguono la linea vacca-vitello, sono di piccole o medie dimensioni e situate per la maggior parte in zone collinari-montane. Attualmente le razze autoctone contano in totale 120.000 capi in selezione. Le loro ottime caratteristiche produttive e riproduttive, l'eccellente qualità delle carni le hanno rese famose in tutto il mondo, dove sono allevate con successo sia in purezza che in incrocio.

La selezione attuale si basa sostanzialmente su caratteri rilevati in vita. Inoltre, dato il basso numero di torelli che possono essere messi in prova nelle strutture dell'ANA, la pressione di selezione non può essere molto alta. Da ciò ne deriva l'interesse per l'applicazione di strumenti di genetica molecolare per la selezione che potrebbe dare risposte valide in aggiunta agli schemi di valutazione tradizionali. In particolare test semplici e di basso costo potrebbero essere applicati su un'ampia popolazione. Sarebbe possibile inoltre effettuare test costosi post-macellazione da cui ricavare geni o marcatori molecolari vantaggiosi da ricercare nella popolazione in vita dei riproduttori.

Lo scopo di questa linea di ricerca è stato quello di calcolare un indice genetico complessivo per caratteri post-mortem utilizzando numerosi marcatori

\* Università degli Studi della Toscana, Dipartimento di Produzioni Animali

\*\* Unità di ricerca Università di Viterbo, responsabile scientifico prof. Alessio Valentini

SNP per poter predire le caratteristiche degli animali in vita. Allo scopo di avere una metodologia “in house” è stato messo a punto un modello statistico originale e su questo è stato sviluppato un software specifico.

#### MATERIALI E METODOLOGIE

Sono stati campionati circa 700 soggetti maschi macellati nello stesso mattatoio. Sono state rilevate numerose misure pre e post mortem, il DNA è stato estratto e genotipizzato con 54001 marcatori SNP. I risultati sono stati filtrati rispetto al numero di genotipi mancanti entro individuo ed entro marcatore ( $<0.05$  in entrambi i casi), alla frequenza allele minore ( $>0.02$ ), equilibrio Hardy Weinberg, trasmissione mendeliana (ove si conoscevano i genitori). Per le analisi di associazione con gli SNP sono disponibili i Delta per il peso vivo netto, la carcassa e gli AMG. Per le parti del quinto quarto sono state invece calcolate le regressioni sui pesi vivi netti e sull'età (per la sola pelle anche la copertura in grasso della carcassa) e quindi i Delta, che saranno considerati nelle analisi di associazione. Per tutti questi caratteri sono poi stati calcolati gli EBV con il metodo BLUP-AM. Le analisi degli SNP sono state condotte in un primo momento su un primo sotto-campione di circa 290 animali, presi nelle code della distribuzione dei caratteri, e successivamente su altri 300 capi, per cui le analisi di associazione sono ancora in corso. Il primo carattere analizzato, per il quale si riportano i risultati, è stato la resa alla macellazione.

Poiché i marcatori sono molti di più della variabile dipendente, il problema è considerato “overfitted”. Inoltre è attesa una correlazione tra i marcatori che sono in “linkage disequilibrium”. In questi casi il metodo della regressione multipla semplice fornisce risultati errati e con ampia varianza. In letteratura sono stati considerati metodi che utilizzano la varianza a priori degli effetti genetici, in particolare il BLUP e il Bayes A e B (Meuwissen et al., 2001). Nel primo metodo la varianza genetica è uguale per tutti i marcatori, negli altri può essere variata lungo i cromosomi in base alle informazioni che si hanno, per es. la presenza di QTL. Tali metodi sono molto complessi dal punto di vista computazionali e spesso richiedono tempi lunghi di esecuzione. Abbiamo sviluppato un nuovo metodo per la Genomic Selection basato sugli stimatori di “shrinkage”, che fa uso della Single Value Decomposition e risulta particolarmente veloce. La procedura inoltre si presta per la compilazione in parallelo, consentendo velocità anche maggiori.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Dato un sistema di equazioni  $Ax = b$ , la soluzione è trovata con il minimo di  $\|Ax - b\|^2$ . Purtroppo nel nostro caso la soluzione è distorta e ha larga varianza. Un migliore stimatore si ottiene introducendo un fattore di shrinkage  $\|Ax - b\|^2 + \|\Gamma x\|^2$ . Spesso  $\Gamma$  è la matrice unità. La soluzione è facilitata se si procede attraverso la Single Value Decomposition (SVD)  $A = U\Sigma V^T$ , in cui la matrice  $A$  è decomposta in tre matrici, di cui  $\Sigma$  è diagonale. Risulta pertanto agevole anche invertire la matrice originale  $A^{-1} = V\Sigma^{-1}U^T$ , e quindi anche risolvere le equazioni del modello. C'è una grande affinità tra SVD e componenti principali in quanto se  $A^TA$  è una matrice di varianza/covarianza, la SVD è  $A = U\Sigma\Sigma^TV^T$  e  $V$  contiene gli autovettori di  $A^TA$ . Nel metodo da noi sviluppato basta quindi invertire gli elementi diagonali di  $\Sigma$  e rapidamente si ottiene la soluzione.. È stato sviluppato un software di facile uso con interfaccia grafica (fig. 1) nel quale possono essere variati i parametri della regressione. Per velocizzare ulteriormente la procedura, il software consente all'operatore di scegliere di ritenere solo una parte delle componenti principali in quanto rappresentano la maggior parte della varianza spiegata. Il software e il metodo sono stati testati per predire la resa alla macellazione. Lo 80% o il 90% dei campioni erano utilizzati come popolazione di "training" e il rimanente 20% o 10% erano invece predetti utilizzando i coefficienti di

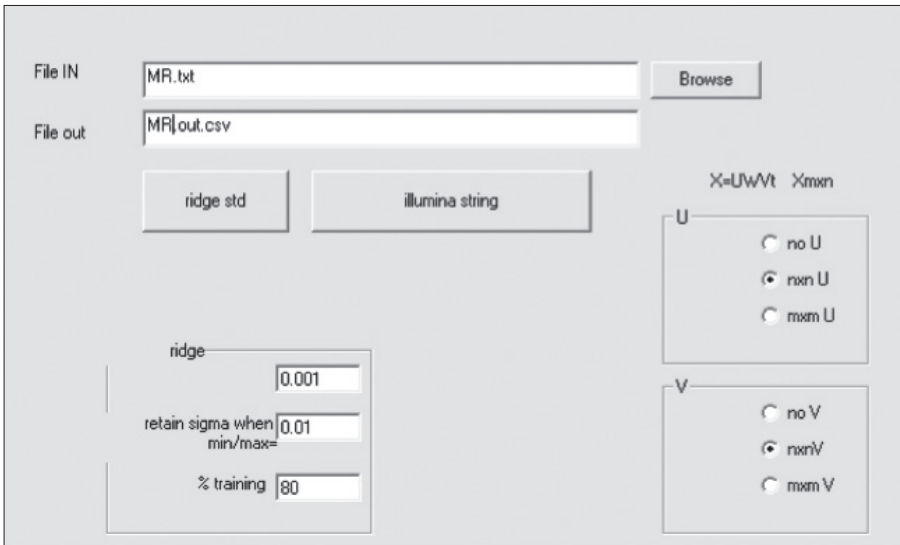


Fig. 1 *Front end del software per il calcolo dei GEBV*

regressione stimati nella popolazione di “training”. La correlazione tra valore vero e valore predetto è stata rispettivamente di 0.45 e 0.46. Si tratta indubbiamente di dati incoraggianti, vicini ai valori di ereditabilità del carattere. Va notato però che il campione aveva una variabilità ambientale molto bassa, in quanto gli animali erano stati macellati in un unico mattatoio e avevano un intervallo basso di età alla macellazione. È da aspettare che la correlazione si abbassi con dati più eterogenei.

#### BIBLIOGRAFIA

- GOLUB G.H. (1965): «Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics», Series B, Numerical Analysis, (2), pp. 205-224.  
 MEUWISSEN T.H.E. ET AL. (2001): «Genetics», 157, pp. 1819-1829.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Giovanni Chillemi (Primo tecnologo)  
 Roberta Guarcini (Direttore ANABIC)  
 Francesco Filippini (Responsabile tecnico)  
 Maria Federica Trombetta (Professore associato)

#### PRODOTTI

- Nuovo metodo per il calcolo dei GEBV.
- Software per il calcolo di GEBV.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) AJMONE-MARSAN P., NICOLAZZI E.L., NEGRINI R., MACCIOTTA N.P.P., FONTANESI L., RUSSO V., BAGNATO A., SANTUS E., VICARIO D., VAN KAAM J.B.C.H.M., ALBERA A., FILIPPINI F., MARCHITELLI C., MANCINI G., NARDONE A., VALENTINI A. (2010): *Integrating Population Genomics and Genomic Selection*, in Proceedings of the Interbull International Workshop, Paris, France, 4-5 marzo, 2010, UPPSALA, Interbull, vol. 41, ISBN/ISSN, 1011-6079.

JOHN WILLIAMS\*

## Genome wide scan per la facilità di parto nella razza bovina Piemontese\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

L'esito del parto è influenzato sia dalle dimensioni del vitello che dall'attitudine della madre, determinata a sua volta dalla sua area pelvica e dalla sua predisposizione fisiologica al parto. La contemporanea presenza di questi due effetti biologici si estrinseca in due caratteri, la facilità di nascita e la facilità di parto.

La facilità di nascita esprime dunque il valore genetico di un riproduttore in rapporto alla predisposizione a generare vitelli che nascono bene. La facilità di parto esprime invece il valore genetico di un riproduttore in rapporto alla capacità di produrre femmine che partoriscono bene.

Il rilievo dei parti viene effettuato negli allevamenti iscritti al Libro Genealogico mediante visite mensili da parte dei controllori delle Associazioni Provinciali Allevatori. Ogni anno vengono registrati oltre 80.000 dati di parto.

Scopo della presente linea di ricerca è stato di trovare zone nel genoma della razza Piemontese implicate nella facilità di parto.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Circa 400 tori sono stati campionati, il DNA è stato estratto e genotipizzato con 54001 marcatori SNP. I risultati sono stati filtrati rispetto al numero di genotipi mancanti entro individuo ed entro marcatore ( $<0.05$  in entrambi i

\* *Consorzio di Ricerca e Sperimentazione degli Allevatori*

\*\* *Unità di ricerca CRSA, responsabile scientifico dott. John Williams*

casi), alla frequenza allele minore ( $>0.02$ ), equilibrio Hardy Weinberg, trasmissione mendeliana (ove si conoscevano i genitori).

La scansione genome wide è stata effettuata con il software plink (Purcell et al., 2007) trattando gli EBV come caratteri continui. È stata usata la correzione Benjamini & Hochberg (1995) per tenere conto dei confronti multipli.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

La scansione genomica ha portato all'individuazione di molti picchi di probabilità di associazione appena al di sopra della soglia di significatività. Fa eccezione un picco particolarmente elevato nel cromosoma 6 (fig. 1) in corrispondenza della zona tra 37 e 39 Mbasi.

In letteratura, numerosi studi in diverse popolazioni di bovini hanno riportato che il cromosoma bovino 6 contiene loci di caratteri quantitativi (QTL) che incidono sulla crescita fetale (Gutiérrez-GIL et al., 2009). Questi risultati sono in linea con altri studi che forniscono prove di QTL che interessano mortalità neonatale, distocia, facilità di parto sullo stesso cromosoma (Olsen et al., 2008). Inoltre nella zona del picco sono localizzati due geni potenzialmente candidati a determinare il carattere preso in considerazione, LAP3 e NCAPG. LAP3 è una leucina amminopeptidasi ed è conosciuta anche con il nome di ossitocinasi. L'ossitocina è un ormone chiave nella gravidanza e soprattutto nel parto e l'enzima responsabile dell'idrolisi dell'ossitocina è proprio la LAP3 o altre LAP. Studi precedenti hanno dimostrato che nel siero

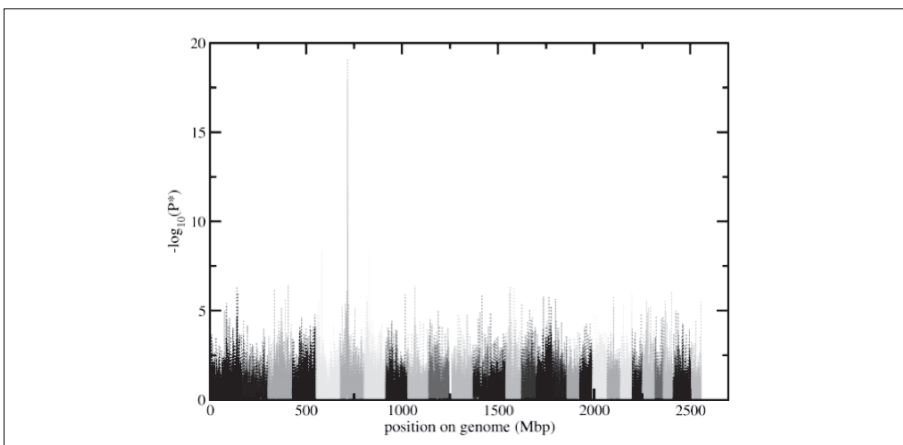


Fig. 1 *Probabilità di associazione del carattere facilità di parto lungo il genoma. I cromosomi sono indicati da sinistra a destra in colori differenti*

materno l'attività delle LAP è aumentata con l'età gestazionale poco prima dell'inizio del travaglio (Mizutani S. et al., 1976). Inoltre, le LAP svolgono un ruolo importante nella regolazione dei livelli funzionali di diversi altri ormoni, come la vasopressina e l'angiotensina (Tsujimoto M. et al., 1992) che sono coinvolti nel controllo della circolazione feto-placentare da vasocostrizione. Così si pensa che le LAP siano critiche per il mantenimento della condizione fisiologica di gestazione e possano influenzare il parto. L'altro gene è il "non-SMC condensin I complex, subunit G" (NCAPG). Questo gene è stato associato alla statura nell'uomo ma particolarmente importante è il lavoro di Eberlain A. et al. (2009), che dimostra come un polimorfismo nel gene (*1326T>G*) è fortemente coinvolto nella crescita fetale.

#### BIBLIOGRAFIA

- BENJAMINI & HOCHBERG (1995): «Journal of the Royal Statistical Society», Series B 57 (1), pp. 289-300.  
 EBERLAIN A. ET AL. (2009): «Genetics», 183, pp. 951-964  
 GUTIÉRREZ-GIL ET AL. (2009): «J. Anim. Sci.», 87, pp. 24-36.  
 MIZUTANI S. ET AL. (1976): «Clin. Biochem.», 9, p. 228.  
 OLSEN ET AL. (2008): «J. Dairy Sci.», 91, pp. 4312-4322.  
 PURCELL S. ET AL. (2007): «American Journal of Human Genetics», 81.  
 TSUJIMOTO M. ET AL. (1992): «Arch. Biochem. Biophys.», 292, pp. 388-392.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Giordano Mancini (Dottorando)  
 Andrea Quagliano (Direttore ANABORAPI)  
 Andrea Albera (Responsabile ricerca e sviluppo)  
 Marco Bona (Responsabile area tecnica)  
 Alessio Valentini (Professore ordinario)

#### PRODOTTI

- Identificazione di una regione genomica implicata nella facilità di parto e di nascita.
- Identificazione di geni candidati per la facilità di parto e di nascita.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) AJMONE MARSAN P., MARINO R., PERINI D., NEGRINI R., NICOLAZZI E., PARISET L., VALENTINI A., VICARIO D., SANTUS E., BLASI M., FONTANESI L., SCHIAVINI F.,

- BAGNATO A., MACCIOTTA N., NARDONE A. (2009): *Identification of selection signature across genome based on a 54,000 SNP panel*, 60th EAAP Barcelona, Spain, 24 to 27 of August 2009.
- 2) VALENTINI A., PARISSET L., BONGIORNI S., WILLIAMS J.L., AJMONE MARSAN P., D'ANDREA M.S., PILLA F., QUAGLINO A., ALBERA A. AND NARDONE A. (2009): *Signature of selection around the myostatin locus in Piedmontese cattle typed by a 54,000 SNP panel*, 60th EAAP Barcelona, Spain, 24 to 27 of August 2009.
  - 3) AJMONE-MARSAN P., NICOLAZZI E.L., NEGRINI R., MACCIOTTA N.P.P, FONTANESI L., RUSSO V., BAGNATO A., SANTUS E., VICARIO D., VAN KAAM J.B.C.H.M, ALBERA A., FILIPPINI F., MARCHITELLI C., MANCINI G., NARDONE A., VALENTINI A. (2010): *Integrating Population Genomics and Genomic Selection*, in Proceedings of the Interbull International Workshop, Paris, France, 4-5 Marzo, 2010, UPPSALA, Interbull, vol. 41, ISBN/ISSN: 1011-6079.



FABIO PILLA\*

## Genome wide scan per l'accrescimento e la facilità di parto nella razza bovina Pezzata Rossa\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

La Pezzata Rossa Italiana (PRI) è una razza a “duplice attitudine”, ove l'attività di miglioramento genetico è finalizzata alla contemporanea ottimizzazione delle produzioni di latte e carne. Tale duplice attitudine conferisce a questa razza una tipicità in grado di diversificarla dalle altre razze da latte e soprattutto la rendono competitiva in contesto in cui la sola produzione di latte non è sufficientemente remunerativa. È di fondamentale importanza strategica quindi per gli allevatori considerare entrambe le attitudini. Il mercato odierno si caratterizza per un prezzo del latte non sufficientemente remunerativo e la riduzione dei costi di produzione si configura, quindi, come una necessità imprescindibile al fine di ottenere dei guadagni dall'attività di allevamento. Questa può avvenire non solo aumentando la quantità di latte prodotta e riducendo quindi il costo unitario del litro latte, ma anche ottenendo reddito dalla carne.

Inoltre poter disporre di animali che oltre a produrre latte e carne di qualità, sono facili da gestire, fertili, resistenti alle mastiti e che garantiscono comunque un reddito soddisfacente derivante dalla carne (vitelli e animali a fine carriera), può rappresentare una valida strada da seguire per incrementare la redditività dell'impresa.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Sono stati campionati 488 tori, il DNA è stato estratto e genotipizzato con 54001 marcatori SNP. I risultati sono stati filtrati rispetto al numero di geno-

\* *Università degli Studi del Molise, Dipartimento Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente*

\*\* *Unità di ricerca Università di Campobasso, responsabile scientifico prof. F. Pilla*

tipi mancanti entro individuo ed entro marcatore ( $<0.05$  in entrambi i casi), alla frequenza allele minore ( $>0.02$ ), equilibrio Hardy Weinberg, trasmissione mendeliana (ove si conoscevano i genitori).

La scansione genome wide è stata effettuata con il software plink (Purcell et al., 2007) trattando gli EBV come caratteri continui. È stata usata la correzione Benjamini & Hochberg (1995) per tenere conto dei confronti multipli.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

La scansione genomica ha portato all'individuazione di molti picchi di probabilità di associazione appena al di sopra della soglia di significatività per l'EBV accrescimento giornaliero. In particolare si notano picchi di significatività sui cromosomi 6 e 28. Nel cromosoma 6 (fig. 1) il gene più vicino alla regione identificata codifica per la N-deacetylase/N-sulfotransferase 4 (NDS4), enzima che è stato trovato associato al diabete e al metabolismo lipidico (Williams et al., 2005). Nel cromosoma 28 la regione identificata reca il gene "dual specificity phosphatase 13" (DUSP13) anch'esso trovato associato al diabete (Almind et al., 2003).

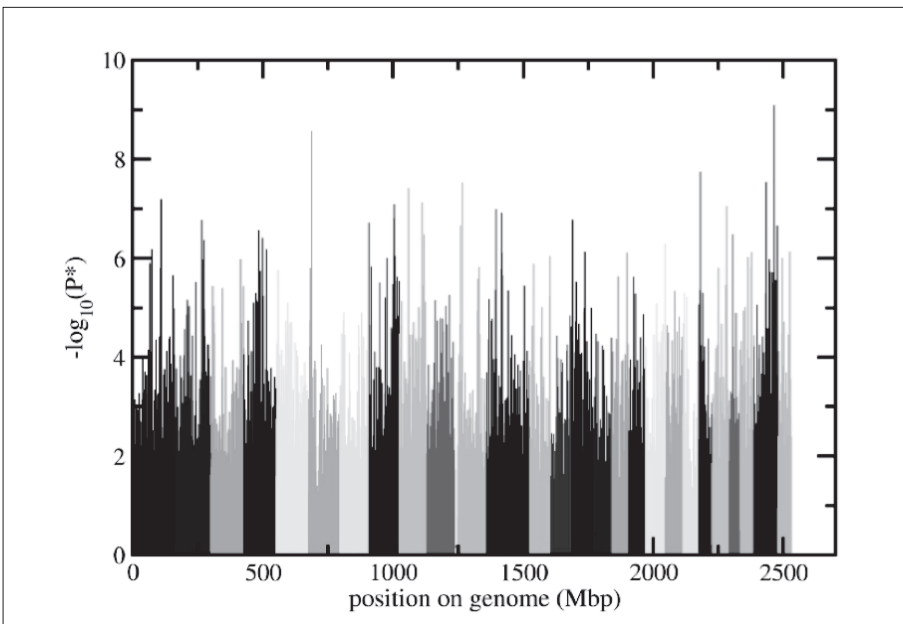


Fig. 1 Probabilità di associazione del carattere accrescimento lungo il genoma. I cromosomi sono indicati da sinistra a destra in colori differenti

In letteratura, numerosi studi in diverse popolazioni di bovini hanno riportato che il cromosoma bovino 6 contiene loci di caratteri quantitativi (QTL) che incidono sulla crescita fetale (Gutiérrez-GIL et al., 2009). Tuttavia nella PRI, a differenza che nella Piemontese esaminata sempre in Selmol, non risulta associata la regione intorno ai 37 Mb di questo cromosoma. Risulta invece piuttosto associata la regione intorno ai 21.5Mb del cromosoma 18, che reca il “gene fat mass and obesity associated” (FTO). Tale gene è espresso anche nel feto e potrebbe determinare la massa complessiva dello stesso, con possibili conseguenze sulla facilità di parto (Wählén et al., 2008).

#### BIBLIOGRAFIA

- ALMIND K. ET AL. (2003): «Diabetes», 52, pp. 1535-1543.  
 BENJAMINI & HOCHBERG (1995): «Journal of the Royal Statistical Society», Series B 57 (1), pp. 289-300.  
 GUTIÉRREZ-GIL ET AL. (2009): «J. Anim. Sci.», 87, pp. 24-36.  
 PURCELL S. ET AL. (2007): «American Journal of Human Genetics», 81.  
 WÄHLÉN K. ET AL. (2008): «Journal of Lipid Research», 49, pp. 607-611.  
 WILLIAMS K.J. ET AL. (2005): «Diabetes», 54, pp. 1116-1124.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Giordano Mancini (Dottorando)  
 Maria Silvia D'Andrea (Ricercatore tempo determinato)  
 Tullio Luttmann (Direttore ANAPRI)  
 Daniele Vicario (Responsabile area tecnica)  
 Alessio Valentini (Professore ordinario)

#### PRODOTTI

- Identificazione di una regione genomica implicata nella facilità di parto e di nascita.
- Identificazione di geni candidati per la facilità di parto e di nascita.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) AJMONE MARSAN P., MARINO R., PERINI D., NEGRINI R., NICOLAZZI E., PARISET L., VALENTINI A., VICARIO D., SANTUS E., BLASI M., FONTANESI L., SCHIAVINI F., BAGNATO A., MACCIOTTA N., NARDONE A. (2009): *Identification of selection signature across genome based on a 54,000 SNP panel*, 60th EAAP Barcelona, Spain, 24 to 27 of August 2009.

- 2) AJMONE-MARSAN P., NICOLAZZI E.L., NEGRINI R., MACCIOTTA N.P.P., FONTANESI L., RUSSO V., BAGNATO A., SANTUS E., VICARIO D., VAN KAAM J.B.C.H.M, ALBERA A., FILIPPINI F., MARCHITELLI C., MANCINI G., NARDONE A., VALENTINI A. (2010): Proceedings of the Interbull International Workshop, Paris, France, 4-5 marzo, 2010, UPPSALA: Interbull, vol. 41, ISBN/ISSN: 1011-6079.

## Identificazione delle tracce lasciate dalla selezione differenziale per la produzione di carne e di latte nei bovini\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

La disponibilità di pannelli di decine di migliaia di marcatori SNP ordinati sui genomi sequenziati ha permesso l'applicazione della genomica alla genetica di popolazione. Uno dei possibili risultati di questa applicazione è l'identificazione di regioni genomiche soggette a selezione, che contengono geni interessanti per le produzioni, la fitness e l'adattamento degli animali. Le tracce della selezione possono essere cercate attraverso un'analisi dei profili di diversità genetica lungo i cromosomi. La selezione infatti agisce su specifiche varianti geniche o di regolazione, mentre deriva genetica ed eventi demografici operano in modo omogeneo su tutto il genoma. Obiettivo di questo studio è l'identificazione delle tracce lasciate dalla selezione differenziale per la produzione di carne e di latte nei bovini.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Un totale di 2295 animali appartenenti a 5 razze bovine sono stati genotipizzati con il pannello da 54001 SNP Illumina BovineSNP50 BeadChip: 775 Brune italiane (BRW), 419 Frisone italiane (FRI), 379 Piemontesi (PIM), 229 Marchigiane (MCG) e 493 Pezzate Rosse italiane (SIM).

Il dataset di dati genotipici è stato quindi editato per eliminare i marcatori o i soggetti con più del 5% di dati mancanti. Il dataset finale ha incluso 2266

\* *Università Cattolica del Sacro Cuore, Istituto di Zootecnica*

\*\* *Unità di ricerca Università Cattolica di Piacenza, responsabile scientifico prof. P. Ajmone-Marsan*

individui e 45087 SNP. Di questi, 43771 sono localizzati sui 29 autosomi e sul BTA X, mentre i rimanenti 1316, non ancora mappati sulla sequenza completa del genoma bovino (versione 4.0), sono stati esclusi dalle analisi statistiche.

L'indice  $F_{st}$  è stato calcolato secondo la formula  $F_{st} = 1 - H_s/H_t$ , dove  $H_s$  è l'eterozigosi attesa secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg calcolata entro subpopolazione, mentre  $H_t$  è l'eterozigosi attesa totale, calcolata assumendo assenza di differenziazione tra le subpopolazioni. L'eterozigosi osservata  $H_o$  è stata calcolata per conta diretta dei genotipi.

I valori di  $H_o$  e di  $F_{st}$  calcolati per singolo locus sono stati poi mediati entro finestre consecutive di 9 marcatori adiacenti e il valore risultante attribuito allo SNP centrale della serie. Il numero di finestre consecutive per cromosoma può essere calcolato con la formula  $SW_i = N_i - (N_{sw} - 1)$  in cui  $SW_i$  è il numero di finestre consecutive sul cromosoma  $i$ ,  $N_i$  è il numero di marcatori sul cromosoma  $i$  mentre  $N_{sw}$  è il numero di marcatori che compongono la finestra. In totale sono state create 43531 finestre consecutive di 9 marcatori SNP. Il valore soglia di significatività statistica di  $F_{st}$  è stato fissato al 1% genome-wide, e calcolato permutando casualmente con una procedura di "shuffling" i marcatori lungo il genoma, calcolando il valore  $F_{st}$  medio di 9 marcatori consecutivi e quindi identificando il valore che divideva il 1% dal 99% della distribuzione.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

L'attività proposta in questa linea del progetto Selmol ha avuto come obiettivo quello di identificare, attraverso un approccio di population genomics, le regioni del genoma sotto selezione comparando bovini da latte e da carne. A questo scopo si è scelto di confrontare i valori degli indici  $H_o$  e  $F_{st}$ . Una improvvisa diminuzione di eterozigosi lungo il genoma di una delle razze studiate, un picco dell'indice  $F_{st}$  o entrambi gli eventi nella stessa regione suggeriscono la presenza di loci sotto selezione. Poiché stime puntuali dei parametri genetici studiati relativi a marcatori SNP anche adiacenti sono soggette ad ampie fluttuazioni che generano un intenso rumore di fondo, si è utilizzato un sistema a finestre di 9 marcatori. Queste sono state fatte "slittare" di un marcatore alla volta (1-9, 2-10, 3-11, ecc.) lungo il genoma.

Le 43771 finestre di 9 marcatori sono risultate di ampiezza media di circa 500Kb, fornendo quindi una copertura del genoma dettagliata. Di queste, 1195 sono risultate avere una ampiezza di oltre 1 MB e solo 118 di oltre 2

Mb. L'indice  $H_o$  è stato calcolato per ogni singola razza, mentre  $F_{st}$  è stato calcolato comparando a coppie le 5 razze tra loro.

A titolo di esempio descriviamo i risultati ottenuti dai confronti tra Piemontese e Bruna con particolare riferimento a due cromosomi (BTA2 e BTA6) e a due regioni specifiche di questi cromosomi dove sono localizzati geni notoriamente selezionati nelle due razze.

La figura 1a descrive la regione compresa tra l'inizio del cromosoma e il nucleotide 9.958.808 di BTA2. Una brusca diminuzione di  $H_o$  nella Piemontese e un picco  $F_{st}$  sono evidenti nella zona tra i 6,5 e 7,3 milioni di nucleotidi, in corrispondenza del gene della miostatina (posizione 6.532.638-6.539.265), responsabile del fenotipo "doppia coscia" da tempo selezionato in questa razza.

La figura 1b mostra la regione di BTA6 compresa tra 31,7 e 42,4 milioni di nucleotidi. Sono evidenti due picchi  $F_{st}$  nelle regioni 33,6-33,9 milioni e 38,0-38,3 milioni. Il secondo picco è sovrapposto a un'ampia regione monomorfa in Bruna tra i nucleotidi 37,6 e 38,8 milioni. Nelle vicinanze sono localizzati i geni *ABCG2*, fissato nella razza Bruna (posizione 37.304.738-37.421.681) e *OPN* (posizione 37.511.674-37.518.672) significativamente associati a caratteri produttivi nelle razze da latte e quindi sotto selezione. Non è escluso però che questo blocco di omozigosi sia dovuto a pressione selettiva anche su altri geni. In questa regione monomorfa sono infatti stati annotati altri 8 trascritti di funzione ignota. Il picco  $F_{st}$  a 33,6-33,9 milioni è associato a una minore  $H_o$  nella Bruna ma soprattutto a un segnale di selezione divergente tra le razze. In questa regione infatti marcatori adiacenti hanno nelle due razze gli alleli opposti come alleli più frequenti. Un solo gene è annotato in questa regione del genoma bovino, il gene che codifica per la fidgetina, una ATPasi associata a numerose funzioni cellulari che in topi mutanti è associata a diverse anomalie, compresi difetti nello sviluppo scheletrico. Una possibile ipotesi, da verificare, è che il segnale rilevato sia dovuto a selezione divergente per la conformazione delle due razze.

In totale 54 finestre hanno  $F_{st}$  significativo su BTA2 e 318 su BTA6. Queste sono raggruppate in 5 regioni di BTA2 e in 25 di BTA6 che sono probabilmente sottoposte a selezione divergente in Bruna e Piemontese. Estendendo l'analisi a tutto il genoma le finestre significative diventano 435. La loro distribuzione tra i diversi cromosomi ha bassa correlazione con il numero di marcatori per cromosoma ( $r=0,34$ ). Il cromosoma 6 è quello che porta il maggior numero di segnali della selezione ( $N=318$ ), seguito da BTA5 ( $N=168$ ), mentre alcuni cromosomi hanno meno di 5 finestre con  $F_{st}$  al di sopra del livello di significatività (BTA10, BTA23, BTA25, BTA27 e BTA29).

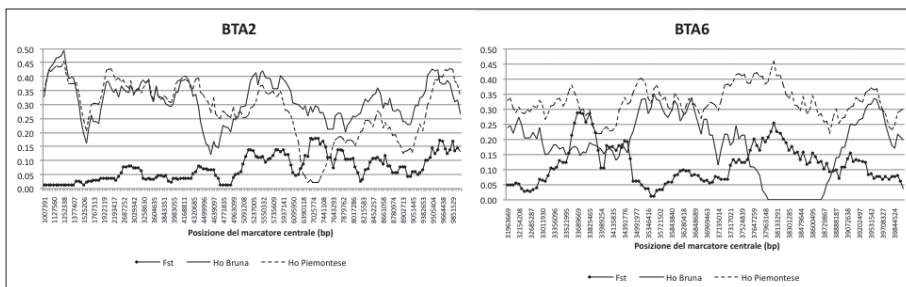


Fig. 1a Profili  $F_{st}$  e di eterozigosi osservata in una regione del cromosoma BTA2

Fig. 1b Profili  $F_{st}$  e di eterozigosi osservata in una regione del cromosoma BTA6

Estendendo l'analisi a tutte le coppie di razze, aumenta il numero di regioni sotto selezione. Alcune sono comuni a tutti i confronti che coinvolgono una determinata razza, e sono probabilmente dovute a pressioni selettive razza-specifiche. Altre si ripetono nei confronti tra razze da latte e razze da carne e sono probabilmente dovute a selezione divergente tra i due indirizzi produttivi. Altre ancora sono specifiche di un singolo confronto. Alcuni segnali derivano da effetti della selezione che hanno fissato alcuni geni nelle singole razze, per esempio la miostatina nella Piemontese e *ABCG2* nella Bruna. Queste regioni genomiche hanno grande interesse per comprendere a livello molecolare alcune delle differenze che ora osserviamo tra le razze. Altri segnali identificano effetti della selezione tuttora in corso, che hanno portato a una divergenza delle frequenze alleliche in razze diverse, ma non ancora alla fissazione di alleli specifici. Questi, una volta confermati, potrebbero avere un interesse applicativo nella selezione.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Ezequiel L. Nicolazzi (Dottorando)  
 Riccardo Negrini (Ricercatore)  
 Raffaele Mazza (Assegnista)

#### PRODOTTI

- Programmi per il controllo qualità e la formattazione di dati genomici.
- Programmi per l'analisi della struttura di popolazione (Frequenze alleliche, eterozigosi e statistiche  $F$  di Wright).



## TRASFERIMENTO

I programmi utilizzati per il controllo qualità e i dati genotipici degli animali dopo il controllo qualità sono stati resi disponibili a tutti i partecipanti al progetto e alle ANA. Stretta collaborazione con l'Unità Modelli Statistici sui risultati di questa linea di ricerca (controllo qualità dei dati, Linkage Disequilibrium, studi di associazione) e sui modelli utilizzati/da utilizzare per le analisi.

## BREVETTI

Nessun brevetto è stato prodotto da questa linea di ricerca.

## PUBBLICAZIONI

- 1) AJMONE-MARSAN P., NICOLAZZI E.L., NEGRINI R., MACCIOTTA N.P.P., FONTANESI L., RUSSO V., BAGNATO A., SANTUS E., VICARIO D., VAN KAAM J.B.C.H.M., ALBERA A., FILIPPINI F., MARCHITELLI C., MANCINI G., NARDONE A., VALENTINI A. (2010): *Integrating Population Genomics and Genomic Selection*, in Proceedings of the Interbull International Workshop, Paris, France, 4-5 Marzo, 2010, UPPSALA: Interbull, vol. 41, ISBN/ISSN: 1011-6079.
- 2) AJMONE-MARSAN P., MARINO R., PERINI D., NEGRINI R., NICOLAZZI E.L., PARISSET L., VALENTINI A., VICARIO D., SANTUS E., BLASI M., FONTANESI L., SCHIAVINI F., BAGNATO A., RUSSO V., MACCIOTTA N.P.P., NARDONE A. (2009): *Identification of selection signatures across dairy cattle genome based on the Illumina 54,000 SNP panel*, in *Book of abstracts of the 60th EAAP meeting*, Barcelona, Spain, Agosto, 24-27 2009EAAP, vol. 15, p. 609, ISBN/ISSN: 978-90-8686-121-7.
- 3) AJMONE-MARSAN P., MARINO R., PERINI D., SIBELLA F., NICOLAZZI E.L., PARISSET L., DALL'OLIO S., FONTANESI L., BAGNATO A., SCHIAVINI F., SAMORÈ A.B., LUTTMANN T., SANTUS E., BLASI M., MACCIOTTA N.P.P., NARDONE A. (2009): *Analysis of BTA6 in Bruna Italiana and Pezzata Rossa cattle assayed with 2,535 SNPs*, «Italian Journal of Animal Science», vol. 8, p. 183, ISSN: 1594-407.



LILIANA DI STASIO\*

## Analisi di geni candidati per caratteri *in vivo* nella razza bovina Piemontese\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Le acquisizioni nel campo della genetica molecolare hanno aperto nuove prospettive anche nel settore del miglioramento genetico dei caratteri connessi alla produzione di carne, finora in larga misura basato sui classici metodi della genetica quantitativa, grazie alla possibilità di individuare singoli geni o cluster di geni a effetto maggiore, la cui variabilità sia associata a una quota rilevante della variabilità di caratteri di interesse economico. A oggi, il numero di geni candidati, suggeriti in base alla loro posizione o funzione dei loro prodotti, è molto elevato, ma solo per un numero limitato di essi sono state analizzate le relazioni con la produzione di carne, con risultati spesso contraddittori. Il programma di ricerca della UR prevedeva, quindi, di verificare l'effetto di alcuni geni, selezionati dalla letteratura, sull'accrescimento e sullo sviluppo muscolare nella razza bovina Piemontese.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Sono stati analizzati (Kbiosciences, UK) per 24 SNP localizzati in 13 geni candidati (GDF8, GH, GHR, GHRL, IGF2, LEP, LEPR, MYF5, NPY, POMC, PSMC1, UCP2, UCP3) 227 soggetti Piemontesi sottoposti al *performance test* fra aprile 2007 e maggio 2008. Nel corso del test sono stati rilevati: IGM, altezza, lunghezza, circonferenza toracica, taglia, muscolosità

\* Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Zootecniche

\*\* Unità di ricerca Università di Torino, responsabile scientifico prof. Liliana Di Stasio

garrese, muscolosità spalle, larghezza lombi, spessore lombi, muscolosità coscia, profilo natica, finezza scheletro. Le frequenze alleliche, l'equilibrio di Hardy-Weinberg e il disequilibrio da *linkage* per gli SNP nello stesso gene o sullo stesso cromosoma sono stati stimati mediante il software FSTAT. Le associazioni con i caratteri rilevati sono state analizzate stimando gli effetti additivi e di dominanza per i singoli SNP, o l'effetto degli aplotipi per gli SNP associati. La rilevanza degli effetti è stata valutata calcolando, la probabilità a posteriori per un effetto superiore a  $0.1\sigma_A$ .

## RISULTATI E CONCLUSIONI

L'analisi del polimorfismo è stata effettuata con successo per 19 SNP (tab. 1). Di questi, 5 sono risultati monomorfi nella razza Piemontese (2 in GDF8, 1 in GH, 1 in GHR e 1 in NPY). Tale situazione rientra nel quadro generale riportato in letteratura, poiché i suddetti SNP hanno in genere una variabilità molto limitata, in quanto osservati in una o poche razze con basso grado di polimorfismo. L'assenza di variabilità nel campione esaminato può essere, quindi, interpretata come una caratteristica della razza, piuttosto che come l'effetto di selezione contro alleli sfavorevoli. È, tuttavia, da sottolineare l'assenza di polimorfismo al nt 365 dell'esone 1 del gene GDF8, in quanto studi precedenti avevano descritto l'allele A nella razza Piemontese (McPherron e Lee, 1997), pur riportando una frequenza molto bassa (Vankan et al., 2010). Anche l'assenza di polimorfismo al promotore dello stesso locus merita di essere segnalata, considerato che uno studio precedente aveva riportato per l'allele A una frequenza pari a 0.061, su un campione di numerosità molto più ridotta (Crisà et al., 2003).

I 14 SNP polimorfi hanno mostrato un grado di variabilità molto differente, con la frequenza dell'allele meno rappresentato compresa fra 0.08 e 0.45.

Per tutti gli SNP le frequenze genotipiche sono risultate in equilibrio di Hardy-Weinberg, nonostante i soggetti analizzati rappresentassero un campione non casuale della popolazione.

Poiché alcuni SNP si trovano nello stesso gene e alcuni geni sullo stesso cromosoma, è stato necessario testare se ci fossero associazioni preferenziali. I risultati hanno rivelato un significativo disequilibrio da *linkage* fra SNP4-SNP5 nel gene GHR, SNP9-SNP10-SNP11 nel gene LEP e SNP15-SNP16 nel gene NPY. Pertanto, in questi casi le relazioni con i caratteri quantitativi sono state analizzate sia per gli SNP singoli che per gli aplotipi. Nessuna associazione è stata, invece, osservata fra gli SNP nei geni LEP e NPY, entrambi sul cromosoma 4, e fra quelli nei geni UCP2 e UCP3, entrambi sul cromosoma 15.

SNP	GENE	POSIZIONE	ALLELE	FREQUENZA
1	GDF8	prom/-371	A	0.00
2		ex1/365	A	0.00
3	GH	prom/-120	T	0.00
4	GHR	prom/149	A	0.45
5		in4/300	G	0.35
6	GHRL	prom/-887	T	0.00
7		in3/446	G	0.20
8		ex2/150	T	0.25
9	LEP	prom/528	T	0.42
10		prom/1759	C	0.14
11		ex2/305	T	0.17
12	LEPR	ex20/115	T	0.08
13	MYF5	in2/1948	A	0.42
14	NPY	in2/284	G	0.00
15		in2/666	A	0.23
16		in2/3032	C	0.32
17	POMC	in2/254	T	0.17
18	UCP2	in5/380	G	0.18
19	UCP3	in3/1099	G	0.23

Tab. 1 *Frequenza dell'allele minore ai 19 SNP analizzati*

Le relazioni con i caratteri rilevati nel corso del *performance test* sono state analizzate con lo stesso modello utilizzato per le valutazioni genetiche, cui è stato aggiunto l'effetto del singolo SNP o dell'aplotipo. Fra gli effetti inclusi nel modello rientrano il gruppo di contemporanei, l'ordine di parto della madre, il peso all'ingresso (per accrescimento e misure somatiche) o il peso alla valutazione (per muscolosità), oltre all'effetto animale. Per gli SNP singoli sono stati stimati gli effetti additivo e di dominanza, utilizzando come stima puntuale la mediana della distribuzione marginale a posteriori e considerando l'effetto come rilevante quando era superiore al 10% della  $\sigma_A$  in oltre il 90% della distribuzione a posteriori. Per gli aplotipi è stata stimata la regressione del carattere sul numero di copie dell'aplotipo e gli effetti sono stati stimati come deviazioni rispetto a un aplotipo di riferimento; anche per gli aplotipi è stata utilizzata come stima puntuale la mediana della distribuzione marginale a posteriori, considerando l'effetto rilevante quando superiore al 10% della  $\sigma_A$  in oltre il 90% della distribuzione a posteriori.

Relativamente agli SNP singoli, non sono state osservati effetti rilevanti su alcun carattere per SNP7 (GHRL), SNP10 (LEP), SNP13 (MYF5) e SNP19

(UCP3), per i quali la letteratura riportava associazioni con caratteri legati alla produzione di carne (Sherman et al., 2008; Li et al., 2004).

Dei restanti, SNP5 (GHR), SNP8 (IGF2), SNP11 (LEP), SNP15 (NPY) e SNP18 (UCP2) hanno mostrato un effetto rilevante su un solo carattere, e quindi, sembrano di scarsa utilità ai fini pratici. Altri, invece, sembrano più promettenti, perché influenzano più caratteri fra di loro coerenti. Ad esempio, gli SNP9 (LEP) e SNP12 (LEPR) sono risultati associati a vari caratteri di muscolosità, oltre che alla muscolosità aggregata, mentre lo SNP16 (NPY) influenza le misure somatiche. Questi SNP, quindi, sembrano meritevoli di ulteriori approfondimenti.

Dai risultati relativi all'analisi degli aplotipi emerge una situazione in parte modificata rispetto a quella relativa agli SNP singoli. Infatti, gli SNP4 e SNP5 del gene GHR, che singolarmente non erano risultati associati a IGM, considerati congiuntamente mostrano un effetto rilevante sul carattere, con l'aplotipo GA superiore di circa 34g rispetto a GG. L'effetto favorevole dell'allele A allo SNP5 è in accordo con i dati bibliografici (Sherman et al., 2008) ma, nel caso della razza Piemontese, assume rilevanza soltanto se rafforzato dalla contemporanea presenza dell'allele G allo SNP4. Riguardo al gene LEP, l'analisi degli aplotipi evidenzia un minor numero di effetti importanti, mentre per NPY la situazione rimane pressoché invariata.

Nel complesso, l'indagine condotta ha permesso da un lato di arricchire di nuovi SNP la caratterizzazione genetica della razza Piemontese e dall'altro di individuare nel gene GHR un promettente marcatore, il cui inserimento nei programmi di selezione dovrà, tuttavia, essere valutato in un'ottica più ampia e integrata.

#### BIBLIOGRAFIA

- CRISÀ ET AL. (2003): «Cytogenet Genome Res», 102, pp. 48-52.  
 LI ET AL. (2004): «J Anim Sci», 82, pp. 1-7.  
 MCPHERRON E LEE (1997): «Proc Natl Acad Sci», 94, 12457-61.  
 SHERMAN ET AL. (2008): «J Anim Sci», 86, pp. 1-16.  
 VANKAN ET AL. (2010): «Animal», 4, pp. 530-4.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Claudio Lisa (Ricercatore)  
 Andrea Albera (Ricercatore ANABORAPI)  
 Paolo Carnier (Professore ordinario)

#### PRODOTTI

Caratterizzazione genetica della razza Piemontese per geni finora mai analizzati.

#### TRASFERIMENTO

Individuazione di SNP potenzialmente utili ai fini selettivi.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) *Variability of candidate genes for meat production and associations with performance traits in the Piemontese breed* (in preparazione).





FRANCESCO PANELLA\*

## Associazione tra SNPs e caratteri morfologici e produttivi nelle razze ovine italiane da carne\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Negli ultimi anni le razze ovine in Italia si sono orientate verso un ben preciso indirizzo produttivo: alcune sono state selezionate per produrre latte, in altre ci si è rivolti verso il miglioramento dell'attitudine carne. Nel secondo caso il target selettivo è quello di migliorare, in agnelli di età compresa tra i 2 e i 4 mesi, gli incrementi ponderali, la conformazione e la resa al macello. I tradizionali metodi di miglioramento genetico non risultano soddisfacentemente efficaci, va pertanto considerata con interesse la possibilità di utilizzare delle tecniche innovative, quale lo studio dei marcatori molecolari o dei geni candidati. Relativamente a quest'ultimi sarebbe di grande ricaduta pratica l'uso degli SNPs, qualora ne venisse accertata una concreta associazione con i caratteri produttivi.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Dopo consultazione bibliografica sono stati individuati 8 SNPs in 8 geni legati alla produzione della carne ovina (tab. 1). Al fine di valutare l'eventuale associazione tra il loro polimorfismo e alcune performance produttive, si è provveduto a estrarre DNA da 271 arieti valutati in test attitudinale, appar-

\* *Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Biologia Applicata*

\*\* *Unità di ricerca Università di Perugia, responsabile scientifico prof. Francesco Panella*

GENE	SNP E POSIZIONE	ACCESSION NUMBER	FUNZIONI
GHR	Esone 10 122 A>G	AY292283	crescita e mantenimento dell'individuo peso in generale dell'individuo
GHRHR	Introne 10 339 G>T	AY292289	crescita e mantenimento dell'individuo peso in generale dell'individuo
IGF1	Esone III 211 C>T	AY737509	crescita e differenziazione dei tessuti incrementi medi giornalieri nel pre- svezzamento indice di conversione nella fase di crescita
GDF8	Esone III 2156 C>T	AY032689	regolazione delle masse muscolari
MEG3	3'UTR 379 G>T	AY017222	ipertrofia muscolare a livello degli arti pelvici
LEP_2	Esone III 476 >G	U43943	peso dell'animale alle età tipiche
MC1R_1	Esone 361 G>A	Y13965	colore del vello; capacità di ingestione
MYH1	Introne I 295 A>G	AY737517	sviluppo del muscolo scheletrico

Tab. 1

tenenti alle seguenti razze: Appenninica (93), Bergamasca (18), Biellese (4), Gentile di Puglia (17), Laticauda (38) e Merinizzata (101). Tale materiale è stato inviato, per la determinazione degli SNPs, a KBioscences (UK). I risultati ottenuti sono stati associati a: pesi a età tipiche (0, 30, 45, 60, 180, 360d) e relativi incrementi ponderali, indici di performance e valutazioni morfologiche (caratteristiche di razza e attitudinali, conformazione e vello). Vista l'esiguità del campione l'elaborazione dei dati è stata eseguita senza tenere conto del fattore razza, fatta eccezione per le valutazioni morfologiche che sono state considerate solo per Appenninica e Merinizzata.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

Degli SNPs studiati per uno (IGF1) non sono stati ottenuti risultati per problemi tecnici di laboratorio e due (LEP2 e MC1R\_1) sono risultati monomorfici. Solo 5, pertanto, sono stati quelli in cui è stato valutato l'effetto sui caratteri considerati. In tabella 2, in cui sono riportate le frequenze genotipiche e geniche, nonché la significatività del test di disequilibrio H.W.: si osserva che GDF8 ha una preponderanza di genotipi "CC" (92,25%), mentre è completamente assente il genotipo "TT"; situazione analoga si riscontra nel gene MYH1, in cui a un'elevata frequenza di "GG" (88,93%), si associa

GENE/ SNPS	GENOTIPO									HWE	P	Q
	CC	TC	TT	GG	GT	TT	AA	GA	GG			
GDF8	92,25	7,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GHRHR	-	-	-	7,01	35,42	57,56	-	-	-	ns	0,75	0,25
GHR1	-	-	-	-	-	-	26,94	57,20	15,87	ns	0,56	0,44
MEG3	-	-	-	47,23	42,07	10,70	-	-	-	ns	0,68	0,32
MYH1	-	-	-	-	-	-	-	11,07	88,93	-	-	-

Tab. 2

assenza di genotipo “AA”; nei restanti 3 SNPs (GHRH, GHR1 e MEG3) sono stati osservati tutti e tre i genotipi e in nessun caso si è registrato un significativo scostamento dall’equilibrio H.W. In tabella 3 vengono riportate le medie dei caratteri ponderali negli SNPs che si sono mostrati significativi: i pesi a 90 e 180 d non hanno mai fatto registrare differenze significative, così come GHRHR non ha mai determinato pesi o incrementi diversi in funzione dei suoi genotipi. Il GDF8 ha dato i risultati più favorevoli nell’eterozigote “CT” rispetto all’omozigote “CC” per il peso a 45 d (17,50 vs 16,07 kg), per il peso a 60 d (21,23 vs 19,54 kg) e per l’incremento ponderale da 45 a 60 d (275,24 vs 247,61 g). Questi incrementi sono risultati significativamente diversi anche tra i genotipi dell’MYH1 in cui sono stati registrati valori più favorevoli in “GG” rispetto a “GA” (270,09 vs 246,18 g). In questi caratteri le significatività più frequenti si osservano per GHR, in cui “GG” prevale su “AG” e “AA” nel peso alla nascita (5,08 vs 4,66 vs 4,56 kg), nel peso a 1 anno (68,27, vs 66,47 vs 64,16 kg) e negli incrementi da 90 a 180 d (181,99 vs 179,39 vs 163,54 g) e da 180 a 360 d (171,44 vs 166,34 vs 149,81 g). Lo SNP GHR ha mostrato lo stesso trend anche nell’indice di performance (tab. 4) in cui gli arieti omozigoti “GG” hanno conseguito mediamente un indice di 0,50, gli eterozigoti “AG” un indice pari a 0,45 e gli omozigoti “AA” un indice pari a 0,43. Sempre negli indici, differenze significative sono state riscontrate per GHRHR, in cui “TT” (0,50) prevale su “GT” (0,37) e su “GG” (0,44). Le valutazioni morfologiche riportate nelle tabelle 5 e 6, non mostrano trend decisi nei diversi SNPs in nessuna delle due razze considerate, in particolare non si denota alcuna differenza di rilievo nelle voci di maggiore interesse produttivo (caratteristiche attitudinali e conformazione).

Le considerazioni sopra riportate, consentono di trarre solo delle indicazioni di massima sulla possibilità che vengano individuati dei geni candidati utili per il miglioramento genetico degli ovini da carne. La limitata disponibilità di fenotipi certi da associare ai genotipi testati non permette al momento di trarre conclusioni più concrete.

GENE/SNPS	GEN	CARATTERI							
		PN	P45	P60	P360	IP 45-60d	IP 90-180 d	IP 180-360 d	
GDF8	CC	ns	16,07±0,33	19,54±0,40	ns	247,61±6,43	ns	ns	
	CT	ns	17,50±0,75	21,23±0,90	ns	275,24±14,63	ns	ns	
GHR	AA	4,56±0,11	ns	ns	64,16±0,82	ns	163,54±5,03	149,81±5,96	
	AG	4,66±0,10	ns	ns	66,47±0,70	ns	179,39±4,55	166,34±5,11	
	GG	5,08±0,14	ns	ns	68,27±1,04	ns	181,99±6,75	171,44±7,59	
MYH1	GG	ns	ns	ns	ns	270,09±12,15	ns	ns	
	GA	ns	ns	ns	ns	246,18±6,58	ns	ns	

Tab. 3

GENE/SNPS	GEN	INDICE
GDF8	CC	ns
	CT	ns
GHRHR	GG	0,44±0,01
	GT	0,37±0,01
	TT	0,51±0,04
GHR	AA	0,43±0,02
	AG	0,45±0,02
	GG	0,50±0,02
MEG3	GG	ns
	GT	ns
	TT	ns
MYHI	GG	ns
	GA	ns

Tab. 4

GENE/SNPS	GEN	APPENNINICA				
		CR	CA	C	V	TOTALE
GHR	AA	26,0	26,8	26,8	8,0	87,6
	AG	26,0	26,7	26,7	8,0	87,3
GHRHR	GG	26,0	26,3	26,7	8,0	87,0
	GT	26,0	26,9	26,8	8,0	87,7
GDF8	CC	26,1	26,9	26,9	8,0	87,9
	CT	25,5	26,0	26,0	8,0	85,5
MEG3	GG	26,0	26,9	26,8	8,0	87,7
	GT	26,5	25,5	27,5	8,0	88,5
	TT	25,0	26,0	25,0	8,0	84,0
MYHI	GG	26,0	27,0	27,0	8,0	88,0
	GA	26,0	26,7	26,7	8,0	87,4

Tab. 5

GENE/SNPS	GENOTIPO	MERINIZZATA				
		CR	CA	C	V	TOTALE
GHR	AA	25,4	25,7	25,7	8,3	85,2
	AG	24,9	25,8	25,7	8,2	84,6
	GG	26,0	25,8	25,8	8,2	85,7
GHRHR	GG	25,5	25,7	25,5	8,2	85,0
	GT	25,5	25,7	25,7	8,3	85,3
	TT	25,1	25,7	25,7	8,2	84,8
GDF8	CC	25,2	25,7	25,7	8,3	85,0
	CT	26,0	25,5	26,0	8,0	85,5
MEG3	GG	25,3	25,9	25,9	8,3	85,4
	GT	25,3	25,7	25,6	8,3	84,9
	TT	25,0	25,6	25,6	8,2	84,4
MYHI	GG	25,2	25,6	25,8	8,3	84,8
	GA	25,5	26,3	25,7	8,2	85,9

Tab. 6

## BIBLIOGRAFIA

- BUCHANAN F.C., FITZSIMMONSB C.J., VAN KESSELA A.G., THUEA T.D., WINKELMAN-SIMA D.C., SCHMUTZA S.M. (2002): «Genetic Selection and Evolution», pp. 105-16.
- DEVUYST E.A., BAUER M.L., CHENG F.C., MITCHELL J., LARSON D. (2008): «Anim Genet.», 39 (3), pp. 284-286.
- LAGONIGRO R., WIENER P., PILLA F., WOOLLIAMS J.A., WILLIAMS J.L. (2003): «Anim Genet», 34, pp. 371-374.
- PARISET L., CAPPUCCIO, AJMONE MARSAN P., BRUFORD M., DUNNER S., CORTES O., ERHARDT G., PRINZENBERG E.M., GUTSCHER K., JOOST S., PINTO JUMA G., NIJMAN I.J., LENSTRA J.A., PEREZ T., VALENTINI A. (2006): Encogene Consortium, «J of Heredity», 97 (5), pp. 531-534.
- LI C., BASARAB J., SNELLING W.M., BENKEL B., MURDOCH B., HANSEN C., MOORE S.S. (2004): «J. Anim. Sci.», 82, pp. 1-7.
- SHERMAN E.L., NKRUMAH J.D., MURDOCH B.M., MOORE S.S. (2008): «Anim Genet», 39 (3), pp. 225-231.

## COLLABORATORI DELLA RICERCA

Francesca Maria Sarti (Professore associato)  
 Emiliano Lasagna (Ricercatore)  
 Vincenzo Landi (Dottore di ricerca)  
 Simone Ceccobelli (Dottorando)  
 Matteo Bianchi (Assegnista)  
 Salvatore Murru (Direttore AssoNaPa)

## PRODOTTI

- Individuazione in razze ovine italiane da carne di SNPs con effetto sulla variabilità di caratteri coinvolti nell'accrescimento.

## TRASFERIMENTO

Le attuali acquisizioni, relativamente alla funzione di alcuni SNPs sulla produzione di carne ovina, sono al momento solo indicative; la loro pratica trasferibilità sarà possibile alla luce di concertate verifiche con ASSO.NA.PA.

## PUBBLICAZIONI

- 1) LASAGNA E., LANDI V., FILIPPINI F., MURRU S., SANGALLI S., SARTI F.M., PANELLA F. (2009): *SNPs in candidate genes for meat production traits in Italian cattle and sheep*, Proceedings of the A.S.P.A. XVIII Congress, Bologna, Avenue media, giugno 2009, 213.

FRANCESCO PANELLA\*

## Geni candidati, effetto e loro utilizzazione nelle razze bovine Chianina e Marchigiana\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Lo sforzo selettivo in Chianina e Marchigiana, durante gli ultimi anni, si è incentrato nell'ottenere un miglioramento degli accrescimenti giornalieri e della muscolosità; a questo proposito, nuove strategie che integrino le attuali, sono offerte dallo studio dei marcatori genetici SNPs. Questi, messi a confronto con i dati fenotipici (morfologia dell'animale, performance in allevamento e in prova attitudinale), possono essere utilizzati per rendere la valutazione dei soggetti più efficace sia in termini di affidabilità della stima che in termini di tempo impiegato nella scelta degli animali. Tale metodica (*Genome Selection*) è già sperimentata in altri paesi ed è oramai provata la sua efficacia nel migliorare le tecniche di valutazione dei riproduttori nelle specie di interesse zootecnico; sono già state evidenziate, infatti, alcune correlazioni esistenti tra SNPs e parametri di efficienza economica quali l'utilizzazione metabolica della razione, l'incremento medio giornaliero, ecc.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Un'indagine bibliografica ha permesso di individuare 17 SNPs in 12 geni legati alla produzione della carne bovina (tab. 1). Al fine di valutare l'eventuale associazione tra il loro polimorfismo e le performance produttive, si è provveduto a estrarre DNA da 243 tori di razza Marchigiana e 353 di razza Chianina valutati in test attitudinale, nonché da 903 vacche Chianine. Tale

\* Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Biologia Applicata

\*\* Unità di ricerca Università di Perugia, responsabile scientifico prof. Francesco Panella

GENE	SNP E POSIZIONE	ACCESSION NUMBER	FUNZIONI
GHR_I	Promotore 149 G>A	AF126288	crescita e mantenimento dell'individuo
GHR_2	Introne IV 300 G>A	AY643807	deposito del grasso bilancio energetico dell'organismo peso in generale dell'individuo
GDF8_I	Promotore -371 T>A	AF348479	sviluppo e regolazione delle masse muscolari, fenotipo ipertrofico
GDF8_2	Promotore -805 G>C	AJ438578	o <i>double muscle</i> , peso alla nascita, peso corporeo
GHRL	Introne III 446 G>A	AY455980	crescita dell'individuo attività di regolazione del rilascio del GH
LEPTIN_I	Esone II 305 C>T	AY138588	metabolismo dei lipidi corporei
LEPTIN_2	Promotore 528 C>T	AB070368	crescita e sviluppo degli adipociti
LEPTIN_3	Promotore 1759 C>G	AB070368	dimensioni corporee capacità di ingestione controllo dell'appetito
MYF5	Introne II 1948 A>G	M95684	sviluppo muscolare incremento medio giornaliero
IGF1	Esone I 198 C>T	AF017143	regolatore della crescita, indice di conversione alimentare nella fase di crescita
IGF2	Esone II 150 T>C	AY237543	crescita muscolare, effetti positivi sullo sviluppo somatico degli animali
OB-R	Esone 20 115 C>T	AJ580799/800/801	livello dell'ormone leptina nel sangue nel periodo parto
NPY_I	Introne II 666 A>G	AY491054	crescita dell'animale
NPY_2	Introne II 3032 T>C	AY491054	efficienza energetica del metabolismo marezzatura delle carni
POMC	Introne II 254 C>T	J00021	peso alla macellazione peso a caldo della carcassa
UCP2	Introne V 380 G>C	AY147821	maggior efficienza nell'utilizzo dell'energia di mantenimento
UCP3	Introne III 1099 G>A	AF127030	conversione della razione

Tab. 1

materiale è stato inviato, per la determinazione degli SNPs, a KBioscences (UK). I risultati ottenuti sono stati associati nei tori ai caratteri rilevati in performance (peso a 365 d, caratteri di morfologia valutati linearmente) e ai relativi indici genetici; nelle vacche alla valutazione lineare e agli indici genetici stimati da pedigree. Nell'elaborazione statistica i dati relativi ai tori sono stati elaborati separatamente per razza o senza tenere conto del tipo genetico. Nel caso della Marchigiana alcune elaborazioni hanno considerato il genotipo al locus del gene miostatina (mh).



INDICE AMG	INDICE MUSCOLOSITÀ	INDICE DIMENSIONI	INDICE FINEZZA
GHRL (2)	GHR_I (2)	GDF8_2 (2)	GHR_I (3)
LEPTIN_I (4)	GDF8_I (2)	GHRL (2)	GDF8_I (4)
LEPTIN_2 (2)	GHRL (3)	LEPTIN_2 (2)	GDF8_2 (3)
OB-R (2)	LEPTIN_I (2)	IGF1 (3)	GHRL (4)
POMC (2)	IGF2 (2)	POMC (3)	MYF5 (2)
UCP3 (2)	POMC (2)	-	IGF2 (2)
-	UCP2 (3)	-	UCP3 (2)
-	UCP3 (2)	-	-

Tab. 2

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Nei quattro campioni considerati (tori chianini CHT, tori marchigiani MAT, tori totali, vacche chianine CHV), alcuni SNPs hanno mostrato ripetutamente significatività (valore tra parentesi) sugli indici genetici (tab. 2). Per l'accrescimento (AMG) sono: GHRL, LEPTIN\_1, LEPTIN\_2, Ob-R, POMC, UCP3, presenti in geni coinvolti nello sviluppo dell'animale e nel metabolismo dei grassi che incidono sulla capacità di accrescimento. Per la Muscolosità: GHR\_1, GDF8\_1, GHRL, LEPTIN\_1, IGF2, POMC, UCP2, UCP3, legati sia alle funzioni di crescita e sviluppo dell'animale che a quelle di trasformazione degli alimenti e all'utilizzo dell'energia di mantenimento. Per l'Indice DIMENSIONI sono significativi gli SNPs: GDF8\_2, GHRL, LEPTIN\_2, IGF1, POMC, tutti legati allo sviluppo corporeo e muscolare e al metabolismo dei grassi. Per l'indice FINEZZA (riferito a pelle e scheletro) sono significativi GHR\_1, GDF8\_1, GDF8\_2, GHRL, MYF5, IGF2, UCP3, legati allo sviluppo delle masse muscolari e dell'organismo e alla sua efficienza metabolica.

Sui tori testati in performance (tab. 3) per i tre caratteri considerati: PESO a 365 giorni, AMG in TEST, MUSCOLOSITÀ i seguenti SNPs sono risultati avere un effetto medio di sostituzione di un gene significativo: per il PESO365 gli SNPs GHR\_1, GHR\_2, MYF5 e NPY\_1 nella Marchigiana, LEPTIN\_1 nella Chianina. Per l'AMG in test gli SNPs: GHR\_1, LEPTIN\_2, MYF5, Ob-R nella Marchigiana, GDF8\_2, POMC, UCP2 nella Chianina. Per la muscolosità gli SNPs GDF8 (Esone III-mh), Ob-R, NPY\_2 nella Marchigiana, in cui l'effetto del primo sovrasta quello degli altri SNPs; GDF8\_1, GDF8\_2, GHRL, LEPTIN\_1, LEPTIN\_2, LEPTIN\_3, IGF2, NPY\_1, UCP2 nella Chianina, in cui è assente la mutazione dell'Esone III di GDF8.

Valori significativi di sostituzione (tab. 4) compaiono solo saltuariamente nelle misure di lunghezza del tronco e di larghezza del torace, mentre più fre-

	PESO 365		AMG TEST		MUSCOLOSITÀ	
	MAT	CHT	MAT	CHT	MAT	CHT
GHR_1	-28,51	-	-0,08	-	-	-
GHR_2	22,63	-	-	-	-	-
GDF8_1	-	-	-	-	-	-13,85
GDF8_2	-	-	-	0,03	-	13,79
GHRL	-	-	-	-	-	-12,36
LEPTIN_1	-	-11,46	-	-	-	-29,98
LEPTIN_2	-	-	0,09	-	-	-17,52
LEPTIN_3	-	-	-	-	-	-14,11
MYF5	-10,54	-	-0,04	-	-	-
IGF1	-	-	-	-	-	-
IGF2	-	-	-	-	-	-8,27
OB-R	-	-	0,05	-	16,07	-
NPY_1	18,14	-	-	-	-	-5,45
NPY_2	-	-	-	-	-20,45	-
POMC	-	-	-	-0,03	-	-
UCP2	-	-	-	0,05	-	15,88
UCP3	-	-	-	-	-	-
MH	-	-	-	-	-23,38	-

Tab. 3

quentemente compaiono nelle valutazioni lineari di muscolosità, in cui spicca l'effetto di molti SNPs nelle vacche chianine.

La presenza di SNPs significativi, ripetuta per diversi caratteri fondamentali per la selezione e per i diversi campioni considerati, tanto più su campioni limitati per numerosità, induce a ritenere strategico poter contare su un maggior numero di animali che dispongano, oltre ai dati produttivi rilevati in stazione o in campo e ai relativi indici genetici, di analisi di genetica molecolare per questi e altri SNPs che si possano evidenziare nell'ambito delle ricerche in corso. Queste informazioni, infatti, potranno essere utilizzate per migliorare la scelta delle madri di toro dei candidati al performance, aumentare il progresso genetico e salvaguardare la variabilità genetica delle razze e la biodiversità.

#### BIBLIOGRAFIA

- BELLINGE R.H.S., LIBERLES D.A., IASCHI S.P.A., O'BRIEN P.A., TAY G.K. (2005): «Animal Genetics», 36, pp. 1-6.
- BUCHANAN F.C., FITZSIMMONSB C.J., VAN KESSELA A.G., THUEA T.D., WINKELMAN-SIMA D.C., SCHMUTZA S.M. (2002): «Genetic Selection and Evolution», 105-16.

	MUSC. ANT.			MUSC. DORS.			MUSC. POST.			LUN. TRONCO			LAR. TORACE		
	MAT	CHT	CHV	MAT	CHT	CHV	MAT	CHT	CHV	MAT	CHT	CHV	MAT	CHT	CHV
GHR_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GHR_2	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08
GDF8_1	-	-	-	-	-0,13	-	-	-0,15	-	-	-	-	-	-	-
GDF8_2	-	-	-	-	0,15	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-
GHRL	-	-	-	-	-0,19	-	-	-0,15	-	-	-0,18	-	-	-	-
LEPTIN_1	-	-0,21	-	-	-0,27	-	-	-0,31	-	-	-	-	-	-	-
LEPTIN_2	-	-	-	-	-	-	-	-0,22	-	-	-	-	-	-	-
LEPTIN_3	-	-	-	-	-0,20	-	-	-	-	-	0,28	-	-0,17	-0,24	-
MYF5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IGF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IGF2	-	-0,13	-	-	-0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,14	-
OB-R	0,16	-	-	0,12	-	-	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-
NPY_1	-	-	-0,10	-	-	-0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,10
NPY_2	-0,29	-	-	-	-	-	-	-	-0,06	-	-	-	-	-	-
POMC	-	-	-	0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UCP2	-	-	-	-	0,18	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-
UCP3	-	-	-	-	-	0,07	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-
MH	-	-	-	-	-	-	-0,25	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 4

- CRISÀ A., MARCHITELLI C., SAVARESE M. C., VALENTINI A. (2003): «Cytogenetic and Genome Research», 102, p. 48.
- DEVUYST E.A., BAUER M.L., CHENG F.C., MITCHELL J., LARSON D. (2008): «Anim Genet.», 39 (3), pp. 284-286.
- DI STASIO L., DESTEFANIS G., BRUGIAPAGLIA A., ALBERA A., ROLANDO A. (2005): «Animal Genetics», 36, pp. 138-140.
- ESMAILIZADEH A.K., BOTTEMA C.D.K., SELICK G.S., VERBYLA A.P., MORRIS C.A., CULLEN N.G., PITCHFORD W.S. (2008): «Journal of Animal Sciences», 86, pp. 1038-46.
- GOODALL J.J.S.M.S. (2007): «Animal Genetics», 38, pp. 154-61.
- GUO H., LIU W.S., TAKASUGA A., EYER K., LANDRITO E., XU S.Z., GAO X., REN H.Y. (2008): «Biochemical Genetics», 46, pp. 347-55.
- KIM N.K., SEO Y.W., KIM G.H., JOH J.H., KIM O.H., CHUNG E.R., LEE C.S. (2004): «Animal Genetics», 35, pp. 142-167.
- LI C., BASARAB J., SNELLING W.M., BENKEL B., MURDOCH B., HANSEN C., MOORE S.S. (2004): «J. Anim. Sci.», 82, pp. 1-7.
- LIEFERS S.C., VEERKAMP R.F., TE PAS M.F., DELAUAUD C., CHILLIARD Y., VAN DER LENDE T. (2004): «Anim Genet. Apr», 35 (2), pp. 138-41.
- NKRUMAH J.D., LI C., YU J., HANSEN C., KEISLER D.H., MOORE S.S. (2005): «Journal of Animal Science», 83, pp. 20-8.
- SHERMAN E.L., NKRUMAH J.D., MURDOCH B.M., MOORE S.S. (2008): «Anim Genet», 39 (3), pp. 225-231.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Francesca Maria Sarti (Professore associato)  
 Emiliano Lasagna (Ricercatore)  
 Vincenzo Landi (Dottore di ricerca)  
 Simone Ceccobelli (Dottorando)  
 Matteo Bianchi (Assegnista)  
 Camillo Pieramati (Professore associato)  
 Andrea Giontella (Dottorando)  
 Francesco Filippini (Resp. Servizio Ricerca e Sviluppo ANABIC)

#### PRODOTTI

- Individuazione in razze bovine italiane da carne di SNPs con effetto sulla variabilità di caratteri coinvolti nell'accrescimento e nella conformazione.

#### TRASFERIMENTO

Le attuali acquisizioni, relativamente alla funzione di alcuni SNPs sui caratteri produttivi di Chianina e Marchigiana, consentono di supporre nel medio termine la loro applicabilità nelle strategie selettive delle due razze. In particolare, va considerato con attenzione

che alcune di queste mutazioni hanno lo stesso effetto sulle performance di entrambi i tipi genetici e ciò avvalorava l'ipotesi di un loro concreta validità.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) LASAGNA E., LANDI V., FILIPPINI F., SARTI F. M., PANELLA F. (2008): *Gli SNPs (polimorfismi di singoli nucleotidi) come indici di alcuni parametri produttivi nelle razze Chianina e Marchigiana*, «Taurus speciale», xx, (6), pp. 81-89.
- 2) LASAGNA E., LANDI V., FILIPPINI F., MURRU S., SANGALLI S., SARTI F. M., PANELLA F. (2009) *SNPs in candidate genes for meat production traits in Italian cattle and sheep*, Proceedings of the A.S.P.A. XVIII Congress, Bologna, Avenue media, giugno 2009, 213.
- 3) PANELLA F., LASAGNA E., CECCOBELLI S., SARTI F.M. (2009): *I caratteri della qualità come nuovo target selettivo*, Atti del Congresso internazionale Sulle tracce delle Podoliche, Matera (MT) - Italy, 10 luglio, 2009, «Taurus speciale», xx, 3, pp. 239-249.
- 4) LASAGNA E., LANDI V., CECCOBELLI S., FILIPPINI F., ALBERTINI E., SARTI F.M., PANELLA F. (2009): *Chianina and Marchigiana breeds: effect of some SNPs in candidate genes for meat production*, 53rd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress (SIGA), Torino, 16/19 September, 2009, Torino, Settembre 2009.



ALESSIO VALENTINI\*

## Geni candidati nella razza bovina Limousine\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

La Limousine costituisce una delle razze al mondo maggiormente radicate nella storia e nella realtà economica. Appartiene a un ceppo di bovini a mantello rosso molto antico (tanto che è ben documentato a partire dalla Bibbia e dall'epoca romana) ed è ormai diffusa in oltre ottanta paesi.

Al momento è presente in tutto il territorio nazionale e conta una popolazione di circa 13.000 vacche iscritte al Libro Genealogico, istituito dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali e gestito dall'Associazione Nazionale Allevatori delle razze bovine Charolaise e Limousine. È presente un trend positivo all'iscrizione al Libro Genealogico.

Le vacche vengono indicizzate per vari caratteri, come facilità di nascita, capacità di crescita prima dello svezzamento, sviluppo muscolare allo svezzamento, attitudine materna all'allattamento. Alcuni di questi indici sono anche aggregati per dare l'indice di sintesi allo svezzamento e l'indice di sintesi del valore materno allo svezzamento.

Lo scopo di questa linea di ricerca è stato quello di calcolare l'effetto di alcuni SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) in geni candidati sugli indici calcolati. Qualora si trovassero geni implicati, ciò potrebbe aumentare la velocità del progresso genetico.

\* *Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Produzioni Animali*

\*\* *Unità di ricerca Università di Viterbo, responsabile scientifico prof. A. Valentini*

## MATERIALI E METODOLOGIE

Sono state campionate 140 femmine Limousine attraverso prelievi di pelo. Il DNA è stato estratto e genotipizzato per gli SNP riportati nelle relazioni a cura di Di Stasio e Panella della presente pubblicazione. Le associazioni statistiche sono state effettuate considerando sia l'insieme completo degli SNP, che sub-insiemi degli stessi calcolati attraverso una step-wise regression. Il genotipo è stato considerato sia in modo continuo, come numero di copie di uno degli alleli, che come categoria.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

La regressione con tutti gli SNP non ha evidenziato degli R abbastanza elevati ed è stata quindi scartata a favore della regressione step-wise che ha fornito modelli più parsimoniosi.

Nessuno SNP è risultato associato in modo statisticamente significativo agli indici aggregati. Ciò conferma i risultati ottenuti anche con altre tecniche (vedi Genomic Selection in questa stessa pubblicazione) e sembrerebbe dimostrare che i dati aggregati siano più "distanti" da funzioni biologiche e quindi meno associati con la variabilità genetica.

L'indice di facilità di nascita è lievemente associato allo SNP sul gene UCP2 ( $P=0.068$ ), la capacità di crescita prima dello svezzamento allo SNP sul gene IGF2 ( $P=0.066$ ), l'attitudine materna all'allattamento allo SNP sul gene UCP3 ( $P=0.044$ ). Per quanto riguarda quest'ultimo gene, è stato ipotizzato che UCP3 sia coinvolta nell'utilizzazione dei lipidi sebbene non sia chiaro se tale ruolo sia correlato al controllo dell'ossidazione lipidica o alla prevenzione della lipotossicità (Dulloo e Samec, 2001). È stato inoltre suggerito che l'UCP3 sia coinvolta nella regolazione della produzione mitocondriale di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dello stato redox e dello stress ossidativo nella cellula (Goglia e Skulachev, 2003). La correlazione esistente tra UCP3 e metabolismo lipidico e tra metabolismo dei substrati e struttura muscolare rende particolarmente interessante la relazione trovata con l'attitudine all'allattamento.

Molti più SNP risultano invece associati allo sviluppo muscolare allo svezzamento (tab. 1).

Considerando i genotipi come categorie, si ottengono le medie stimate riportate in figura 1, nella quale si nota l'effetto particolarmente rilevante dello SNP 8 (GDF8), che ancora una volta dimostra l'importanza della miostatina



EFFECT	COEFFICIENT	STD ERROR	STD COEF	T	P(2 TAIL)
CONSTANT	-2.063	0.222	0	-9.273	0
SNP16_IGF2	1.1	0.392	0.309	2.805	0.006
SNP8_GDF8	-3.087	1.117	-0.301	-2.764	0.007
SNP9_GHRL	-0.717	0.309	-0.249	-2.322	0.023

Tab. 1 *Analisi sella varianza dei tre SNP significativi per l'indice sviluppo muscolare allo svezzamento*

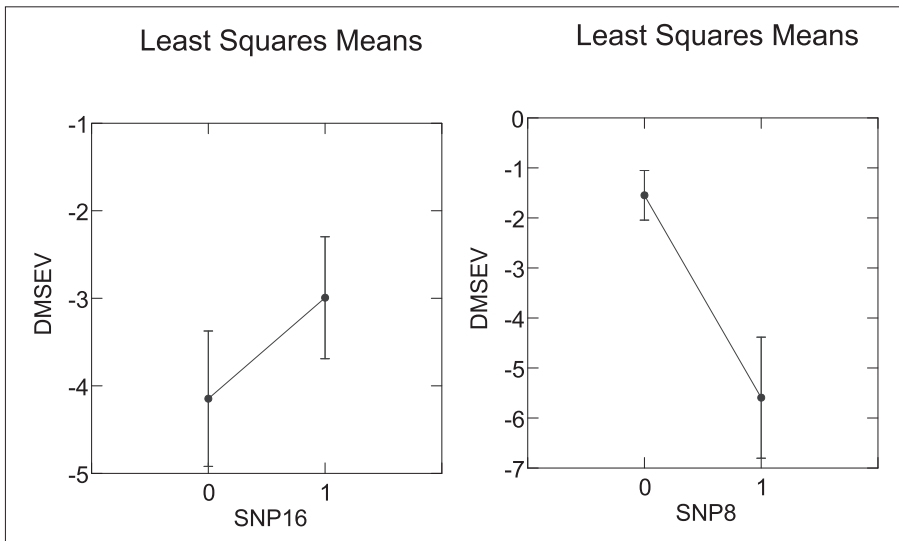


Fig. 1 *Medie stimate e deviazioni standard per gli SNP più significativi per l'indice sviluppo muscolare allo svezzamento (SNP8=GDF8; SNP16=IGF2)*

nella conformazione muscolare (Marchitelli et al., 2003). È interessante notare come una classe di genotipo manca completamente dal campione da noi considerato, ma per trarre conclusioni di tipo biologico sarebbe interessante testare un numero maggiore di soggetti.

#### BIBLIOGRAFIA

- DULLOO A.G., SAMEC S. (2001): «Br J Nutr», 86, pp. 123-139.  
 GOGLIA F. AND SKULACHEV V.P. (2003): «Faseb J», 17, pp. 1585-1591.  
 MARCHITELLI ET AL. (2003): «Mamm. Genome», 14, pp. 392-5.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Emanuele Villa (Direttore ANACLI)

## PRODOTTI

- SNP associati a indici genetici.

LILIANA DI STASIO\*

## Variabilità dei geni $\mu$ -Calpaina e Calpastatina e associazioni con la tenerezza della carne nella razza bovina Piemontese\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

I risultati ottenuti da varie ricerche sono sostanzialmente concordi nell'indicare che i geni  $\mu$ -Calpaina (CAPN1) e Calpastatina (CAST) influenzano significativamente la tenerezza della carne (Page et al., 2002; Casas et al., 2006; Schenkel et al., 2006). Considerata l'importanza di questa caratteristica qualitativa, unitamente alla difficoltà di migliorarla avvalendosi dei classici metodi di selezione, è evidente che la possibilità di utilizzare questi due loci come marcatori ha attratto l'interesse non solo scientifico, ma anche commerciale. Da qualche tempo, infatti, alcune compagnie private hanno brevettato e commercializzato test genetici per valutare la tenerezza della carne, affermando che sono efficaci, in ogni razza e indipendentemente dal sistema di allevamento, per discriminare soggetti geneticamente predisposti a produrre carne tenera o dura. Pertanto, è sembrato utile analizzare la variabilità dei due loci nella razza bovina Piemontese, mai considerata in purezza in lavori precedenti, per poi verificarne le relazioni con la tenerezza della carne.

### MATERIALE E METODOLOGIE

L'indagine ha preso in considerazione tre SNP che rientrano in un test commerciale: due al gene CAPN1 (g.5709C>G e g.6545C>T) e uno al gene CAST (g.282C>G). Per verificare la variabilità della razza Piemontese, sono

\* *Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Zootecniche*

\*\* *Unità di ricerca Università di Torino, responsabile scientifico prof. Liliana Di Stasio*

GRUPPO	N.	CAPN1 <sup>5709</sup>		CAPN1 <sup>6545</sup>		CAST <sup>382</sup>	
		C	G	C	T	C	G
+/+	11	0.05	0.95	0.68	0.32	0.36	0.64
mh/mh	42	0.15	0.85	0.53	0.47	0.64	0.36
carne	87	0.14	0.86	0.52	0.48	0.64	0.36

Tab. 1 *Frequenze alleliche ai tre SNP*

stati analizzati 53 soggetti (42 mh/mh e 11 +/+ al locus GDF8), utilizzando protocolli PCR-RFLP messi a punto da questa UR. Le relazioni tra gli SNP considerati e la tenerezza della carne sono state studiate su 87 campioni di muscolo LTL, che costituivano un campione casuale della carne che si trova in vendita al dettaglio. Su questi campioni, tutti provenienti da soggetti Piemontesi omozigoti mh/mh, sono stati determinati il genotipo ai tre SNP e la tenerezza (WBs, kg) dopo diversi periodi di frollatura. Le frequenze alleliche, le deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg e il disequilibrio da *linkage* sono stati calcolati utilizzando il software Genepop. L'effetto del polimorfismo sulla tenerezza è stato valutato con procedura GLM, stimando l'effetto additivo ( $\alpha$ ) e valutandone la significatività con un test F.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

L'analisi delle frequenze alleliche ha rappresentato il passo iniziale della ricerca, poiché l'efficacia di un marcatore dipende non soltanto dall'entità del suo effetto, ma anche dalla sua frequenza nella popolazione. L'indagine condotta ha dimostrato che la razza Piemontese presenta variabilità a tutti e tre gli SNP considerati (tab. 1).

Soffermando l'attenzione sull'allele C, che per tutti e tre i loci è quello favorevole per la tenerezza, si può notare che allo SNP CAPN1<sup>5709</sup> esso è risultato raro, soprattutto nel gruppo dei soggetti non ipertrofici, confermando la ridotta variabilità già riportata per altre razze, con la sola eccezione della Angus, in cui tale allele ha frequenza pari a 0.41 (Van Eenennaam et al., 2007).

Per gli altri due SNP le frequenze alleliche sono risultate più equilibrate. Riguardo a CAPN1<sup>6545</sup>, l'allele C è il prevalente, in particolare nel gruppo dei soggetti non ipertrofici, con frequenze generalmente più elevate di quelle riportate in letteratura (0.06-0.47). Al locus CAST, invece, l'allele C presenta frequenza significativamente più elevata nei soggetti ipertrofici rispetto ai normali ( $P=0.018$ ).

In tutti i gruppi non sono stati osservati scostamenti rispetto alle frequen-

	CAPN1 <sup>6545</sup>	CAST <sup>282</sup>
	C VS T	C VS G
TOTALE	-0.29	-1.47**
G1	-0.45	-1.99**
G3	-0.20	-1.55**
G7	-0.31	-1.17**
G11	-0.16	-0.96**

Tab. 2 Effetto additivo sulla tenerezza (kg)

ze genotipiche attese secondo Hardy-Weinberg. Poiché due degli SNP studiati si trovano nello stesso gene (CAPN1), si è ritenuto necessario analizzare il disequilibrio da *linkage*, perché il fatto che gli alleli siano associati o meno deve essere tenuto in considerazione nel valutare l'efficacia dei marcatori ai fini selettivi. I risultati mostrano che i due SNP, sebbene fisicamente piuttosto vicini, non sono associati, il che indica la possibilità di una selezione indipendente.

Le statistiche descrittive relative alla WBs determinata a diversi giorni *post-mortem* mostrano da un lato il previsto aumento della tenerezza con l'allungarsi del periodo di frollatura, dall'altro l'esistenza di una elevata variabilità fenotipica, con CV intorno al 30%. Tale variabilità può essere imputata in larga misura all'influenza dei fattori ambientali, considerato che i campioni di carne analizzati derivavano da soggetti di diversa provenienza e quindi sottoposti a diverse condizioni *ante-* e *post-mortem*. D'altra parte i lavori a tutt'oggi disponibili indicano per la resistenza al taglio un coefficiente di ereditabilità medio pari a 0.25, con un range compreso fra 0.02 e 0.53, a dimostrazione del fatto che la variabilità osservata è almeno in parte di origine genetica. Un recente lavoro sulla Piemontese riporta per questo carattere un valore di  $h^2$  pari a 0.32 (Boukha et al., 2007), confermando l'importanza della componente genetica sulla variabilità fenotipica, il che rappresenta un buon presupposto per eventuali azioni di miglioramento.

Lo studio dell'effetto del polimorfismo sulla tenerezza della carne è stato possibile soltanto per gli SNP CAPN1<sup>6545</sup> e CAST<sup>282</sup>, a causa della bassa variabilità dello SNP CAPN1<sup>5709</sup>, con conseguente assenza del genotipo CC nel campione esaminato.

Come riportato nella tab. 2, per entrambi gli SNP oggetto di studio l'allele C è risultato associato a valori inferiori di WBs e, quindi, a maggior tenerezza, ma solo per il locus CAST gli effetti sono risultati significativi.

Tale effetto si è mantenuto costante nel tempo e compreso fra circa 1 e 2 kg. Si tratta di valori molto elevati, che in tutti i casi corrispondono a più di 0.5 deviazioni standard. I dati, quindi, confermano anche per la razza Piemontese l'effetto favorevole dell'allele C a questo SNP sulla tenerezza.

Ovviamente, l'estensione dell'indagine a un campione più ampio potrebbe aiutare a valutare più accuratamente l'effetto dello SNP CAPN1<sup>6545</sup>.

Questi risultati assumono un particolare significato nel panorama generale, in quanto non ci risulta che altri lavori abbiano preso in considerazione razze omozigoti per l'allele responsabile dell'ipertrofia muscolare, il quale potrebbe interferire con l'effetto dei geni qui considerati. I risultati ottenuti indicano che anche in una razza come la Piemontese, già predisposta a fornire una carne particolarmente tenera in virtù dell'ipertrofia muscolare, esistono ancora margini di miglioramento.

Nel complesso, si può concludere che lo SNP CAPN1<sup>5709</sup> non è un marcatore utile nella razza Piemontese a causa della ridotta frequenza dell'allele favorevole, poiché renderebbe la selezione troppo restrittiva, riducendo le possibilità di miglioramento per altri caratteri. Invece, la mutazione CAST<sup>282</sup> sembra più appropriata per essere utilizzata come marcatore, mentre ulteriori approfondimenti sono necessari per CAPN1<sup>6545</sup>.

Più in generale, i risultati ottenuti sottolineano la necessità di conoscere la distribuzione dei diversi alleli nelle singole razze e indicano che l'introduzione di test genetici per individuare soggetti geneticamente superiori nei riguardi della qualità della carne dovrebbe essere suggerita soltanto dopo aver verificato la reale efficacia dei marcatori nella specifica razza in cui si vogliono applicare.

#### BIBLIOGRAFIA

- BOUKHA ET AL. (2007): «Ital J Anim Sci», 6, suppl. 1, pp. 53-5.  
 CASAS ET AL. (2006): «J Anim Sci», 84, pp. 520-25.  
 PAGE ET AL. (2002): «J Anim Sci», 80, pp. 3077-85.  
 SCHENKEL ET AL. (2006): «J Anim Sci», 84, pp. 291-99.  
 VAN EENENNAAM ET AL. (2007): «J Anim Sci», 85, pp. 891-900.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Claudio Lisa (Ricercatore)  
 Alberto Brugiapaglia (Ricercatore)  
 Gianluigi Destefanis (Professore associato)

## PRODOTTI

- Caratterizzazione genetica della razza Piemontese per geni finora mai analizzati.

## TRASFERIMENTO

Individuazione di SNP potenzialmente utili ai fini selettivi.

## PUBBLICAZIONI

- 1) DI STASIO L., LISA C., BRUGIAPAGLIA A. (2009): *Analysis of  $\mu$ -Calpain and Calpastatin genes in Piemontese breed*, Proc. 31<sup>st</sup> ISAG Conf., 29.  
([http://www.isag.org.uk/ISAG/all/2008\\_ISAG\\_Amsterdam\\_P2000.pdf](http://www.isag.org.uk/ISAG/all/2008_ISAG_Amsterdam_P2000.pdf))
- 2) LISA C., DI STASIO L. (2009): *Variability of  $\mu$ -Calpain and Calpastatin genes in cattle*, «Ital J. Anim. Sci.», 8, pp. 99-101.





## Messa a punto di un sistema di sonde per l'analisi di proteine, DNA e RNA e verifica dell'influenza di alleli potenzialmente sul trascrittoma muscolare tramite microarray\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

I DNA microarrays sono una tecnica utilizzata dagli anni '90 in cui microscopiche sonde di DNA attaccate a una superficie solida come vetro, plastica, o chip di silicio, formanti un array (raggruppamento), riconoscono il profilo di espressione di un gene e/o di un organismo. Il problema di base di tale tecnica consiste nell'immobilizzazione delle sonde e nei lunghi tempi richiesti per la preparazione del campione e per l'analisi.

La scelta di un gene sul quale effettuare la selezione può comportare effetti indesiderati su altri caratteri produttivi o sulla salute/benessere dell'animale. Ad esempio la selezione per l'allele A1 della beta-caseina fa aumentare la quantità di latte e proteine (Braunschweig, 2008), ma è forse negativo per la salute umana (Chin-Dusting et al., 2006).

Allo scopo di verificare l'effetto di particolari alleli potenzialmente utili nella selezione, individui recanti genotipo omozigote opposto sono stati esaminati tramite microarray per verificare l'influenza degli stessi genotipi sul trascrittoma muscolare.

Un secondo obiettivo è stato quello di sviluppare un nuovo approccio per la messa a punto di un sistema di sonde per l'analisi di proteine, DNA e RNA. Nella fase iniziale si sono utilizzate le nanotecnologie per la creazione di supporti porosi e funzionalizzabili che permettano un migliore legame dei probes e che garantiscano una migliore sensibilità, un minore volume di

\* *Università degli Studi di Sassari - CNBS (Centro Nano Biotecnologie Sardegna)-Dipartimento di Scienze Zootecniche*

\*\* *Unità di ricerca Università di Sassari, responsabile scientifico prof. Gian Franco Greppi*

campione per l'analisi, un miglioramento dei tempi di analisi, una semplificazione dei dispositivi e, dunque, una riduzione dei costi.

#### MATERIALE E METODOLOGIE

Più di 120 individui di razza Marchigiana sono stati campionati al mattatoio con un prelievo di circa 20 gr di muscolo sternocledomastoideo e sangue. Il sangue e il muscolo sono stati utilizzati per estrarre il DNA e tipizzarlo ai geni candidati esaminati anche nelle UR Di Stasio, Panella e UR Roncada (vedi questa stessa pubblicazione). Sono stati identificati individui omozigoti recanti alleli opposti per i geni Ob-R e GHR. Per questi individui è stata effettuata l'estrazione dello RNA che è stato ibridato su microarray contenenti 40,000 oligonucleotidi tratti dalle sequenze pubbliche di *B. taurus*. Le sonde erano in duplicato. Dopo ibridazione i microarray sono stati scannerizzati per acquisire la fluorescenza differenziale dell'omozigote per un allele rispetto all'altro. Sono stati considerati solo i geni che presentavano un fold change > 1.9 e con  $P > 1E7$ .

In una seconda sperimentazione sono stati sintetizzati array mesoporosi (pori tra 2-50 nm) di titania depositati su silicio da utilizzare come materiali ospitanti per il riconoscimento di patogeni e tossine alimentari. La flessibilità di questi nanomateriali deriva oltre che dall'opportunità di modellare morfologia e tessitura dei pori anche dalla possibilità di funzionalizzarli in una pressoché infinita varietà di modi, vista la loro immensa area superficiale. In particolare sono stati sintetizzati e funzionalizzati films mesoporosi con anticorpi anti-*E.coli* O157:H7 per la detection di tale batterio e con peptidi specifici per il riconoscimento delle diossine. I patogeni sono stati rilevati usando le impronte digitali di tali molecole al FTIR con una tecnica label free. In questo modo è possibile fare delle analisi sul campo molto sensibili, veloci, a basso costo e che, grazie a tali materiali, ci assicurano un'alta sensibilità e riproducibilità. Questi esperimenti aprono la strada a future analisi che prevedono sonde a DNA per la comparazione diretta con la tecnica microarray attualmente utilizzata.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

Per i geni Ob-R e GHR sono risultati significativi rispettivamente 54 e 18 geni. Il basso numero è ragionevole in quanto in teoria gli individui diffe-

P	GENE	GENE NAME	CHROM	FUNCTION	PROCESS	COMPONENT
2.00E+08	SLC25A19	solute carrier family 25 (mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier), member 19	19	binding	deoxynucleotide transport	integral to membrane
2.09E+08	RPL21	ribosomal protein L21	22	RNA binding	Translation	cytosol
4.98E+08	P116	peptidase inhibitor 16	23	peptidase inhibitor activity		extracellular region
2.23E+08	FLYWCH1	FLYWCH-type zinc finger 1	25	DNA binding		nucleus
2.91E+08	DKKL1	dickkopf-like 1 (soggy)	18	protein binding	anatomical structure morphogenesis	extracellular region
5.90E+08	KRT73	keratin 73	5	structural molecule activity		keratin filament
3.52E+08	TGOLN2	trans-golgi network protein 2	11	protein binding		Golgi apparatus
4.28E+08	ZSCAN5C	zinc finger and SCAN domain containing 5C	NA	metal ion binding	regulation of transcription, DNA-dependent	intracellular
2.11E+07	KIF5C	kinesin family member 5C	NA	ATP binding	microtubule-based movement	ciliary rootlet
3.42E+08	LOC513129	NA	1			
2.61E+08	CDKN2C	CDKN2C cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	3	cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity	G1/S transition of mitotic cell cycle	cytoplasm
2.11E+08	LOC538331	similar to myosin tail domain-containing protein	14			
2.77E+08	CCDC125	CCDC125 coiled-coil domain containing 125	1			
2.32E+08	N4BP2L2	NEDD4 binding protein 2-like 2	12	ATP binding	cell killing	cellular_component
9.83E+07	LOC790754	solute carrier family 16, member 7-like	23			
2.67E+08	WDR33	WD repeat domain 33	3	protein binding	postreplication repair	nucleus
4.98E+08	MRGPRG	MRGPRG MAS-related GPR, member G	29	G-protein coupled receptor activity		integral to membrane
2.65E+08	CDC42	CDC42 cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	2	GTP binding	actin cytoskeleton organization	cytoplasm

Tab. 1

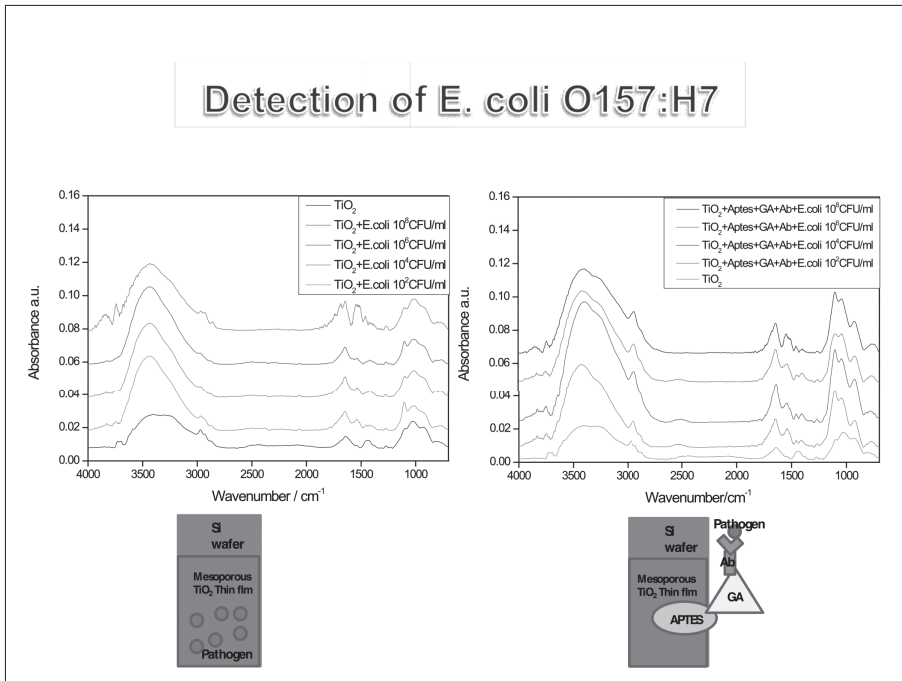


Fig. 1a e 1b

rivano solo per il genotipo al gene scelto. Di seguito, per motivi di spazio, discuteremo solo dei risultati sul gene GHR (tab. 1).

Non risultano cromosomi particolari coinvolti nell'espressione differenziale, ma i geni sembrano appartenere casualmente a diversi cromosomi. La maggior parte dei geni sembra appartenere alla categoria dei "leganti". Infatti 10 su 14 con annotazione di Gene Ontology presente appartengono a questa categoria. Di questi, 5 legano acidi nucleici, due legano proteine e uno lega ioni. In definitiva, a parte la cheratina 73, i geni coinvolti nel differenziamento dei genotipi sembrano riguardare il controllo cellulare, il trafficking e il signalling.

È stata sviluppata una metodica innovativa per la funzionalizzazione del substrato e la detection di biomolecole, cercando di ridurre i tempi di preparazione del campione, per il rilevamento e per l'analisi dati attualmente utilizzata nella tecnologia microarray ma al contempo mantenendo l'idea di base di immobilizzazione del probe su un substrato nanotecnologico. Le tecnologie di rilevamento ottico, medio e vicino IR sono due tecniche spettroscopiche label-free che sono state ben studiate e che forniscono impronte digitali della biomolecola – con elevata specificità. Nel lavoro di

messa a punto l'utilizzo di anticorpi anti - *E. coli* O157: H7 immobilizzati su materiali mesoporosi di titania si è rivelato infatti un metodo più efficace rispetto ai metodi di immobilizzazione tradizionale in quanto consente una preparazione del campione più semplice. Infatti, grazie a tali materiali, è stata rilevata l'*E. coli* presente nel campione in meno di 30 minuti grazie all'elevato rapporto superficie / volume che consente una maggiore superficie di contatto con una conseguente maggiore efficienza per la cattura. In dettaglio in questo lavoro films mesoporosi funzionalizzati in diversi modi con anticorpi anti-*E.coli* O157:H7 sono stati utilizzati per la detection di tale batterio. I patogeni sono stati rilevati usando le impronte digitali di tali molecole all'IR con una tecnica label free. Sono stati messi a punto dei protocolli di binding e detection permettendo delle analisi estremamente rapide (30 minuti) con limiti di detection molto bassi. Il disegno di base di tale lavoro ha previsto la sintesi di materiali mesoporosi su un supporto di silicio. Tale processo è possibile immergendo un wafer di silicio (con condizioni ben controllate di umidità e temperatura all'interno del dip coater) in una soluzione collidale e ottenendo, tramite un processo chiamato EISA (evaporation induced self assembly), l'autoassemblaggio in fase liquida di cluster inorganici nanometrici in presenza di molecole organiche anfifiliche. Tipicamente queste molecole sono tensioattivi a basso peso molecolare o copolimeri a blocchi, che agiscono da "stampo" per la formazione di pori di dimensione compresa tra i 5 e i 20 nm. La scelta di tali materiali di supporto è dovuta al fatto che molte proprietà dei materiali mesoporosi possono portare a degli ottimi risultati per la realizzazione di arrays. Per la detection l'esperimento effettuato ha previsto il legame dell'anticorpo anti *E. coli* O157:H7 al film mesoporoso di titania tramite due molecole organiche: l'APTES (3-aminopropiltrietossilano) e la GA (aldeide glutarica). L'APTES è stato utilizzato in modo da avere una molecola organica sul film con un'estremità ammino -terminale libera per il futuro legame, e la GA è stata utilizzata come linker tra l'APTES e l'anticorpo. Mettendo a confronto le diverse tecniche di immobilizzazione per la detection sembrerebbe che il risultato migliore si sia ottenuto con la metodica che prevede il legame covalente dell'Ab sul film (con APTES e GA) mentre le altre metodiche consentono l'immobilizzazione del ma probabilmente una certa quantità di questo viene persa portando una diminuzione dell'intensità relativa ai picchi del batterio e quindi a una minore sensibilità. Per quanto riguarda il limite di detection dei dispositivi sono state effettuate le prove per una concentrazione da  $1 \times 10^8$  CFU/ml di *E.coli* fino a una concentrazione  $1 \times 10^2$  CFU/ml sia ponendo direttamente il batterio sul film (fig. 1a) sia ponendo il batterio sul film funzionalizzato con APTES, GA e Ab anti *E.coli*

(fig. 1b). Come si può notare il limite di detection a cui siamo arrivati per la rilevazione del batterio in entrambi i casi è di  $1 \times 10^2$  CFU/ml.

#### BIBLIOGRAFIA

BRAUNSCHWEIG M.H. (2008): «J Appl Genet.», 49 (1), pp. 69-74.  
CHIN-DUSTING J. ET AL. (2006): «Br J Nutr.», 95 (1), pp. 136-44.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Stefania Mura (Ricercatore)  
Gianluca Prosperini (Dottorando)  
Silvia Bongiorno (Assegnista)  
Carolina Fock (Borsista)

#### PRODOTTI

- Sono stati sviluppati nuovi materiali e una nuova metodica per la funzionalizzazione di materiali mesoporosi con probes per la detection di complessi proteici.

#### TRASFERIMENTO

Metodi innovativi per la detection e per la costruzione di array di nuova generazione

#### BREVETTI

Un brevetto già depositato, uno in via di attuazione

#### PUBBLICAZIONI

«Quaderni di Bioinformatica» (2010).

PAOLA RONCADA\*

## Analisi proteomica del muscolo bovino per valutare l'effetto dei differenti QTL individuati sui parametri di qualità della carne\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

La qualità della carne è una caratteristica complessa influenzata sia da componenti genetiche sia da fattori ambientali come l'alimentazione e il management degli animali durante la crescita, il trasporto, la macellazione e le corrette procedure di trattamento e frollatura della carne durante e dopo la macellazione. L'analisi proteomica del muscolo bovino per valutare l'effetto dei differenti QTL individuati sui parametri di qualità della carne è fondamentale perché permette di valutare tale effetto su tutto il corredo proteico espresso nel muscolo permettendo così l'individuazione di correlazioni esistenti tra i differenti genotipi e le possibili modificazioni nell'espressione proteica riscontrabili sia a livello di proteine strutturali sia a livello di processi biochimici e metabolici propri del tessuto muscolare.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Per le analisi proteomiche alla macellazione viene effettuato il prelievo di circa 20 gr di muscolo sternocledomastoideo da bovini marchigiani. È di notevole importanza che il prelievo venga eseguito su tutti gli animali al medesimo tempo post-mortem.

Eseguiti su tutti i campioni analisi monodimensionale SDS-PAGE e dopo analisi di immagine applicando la PCA (Principal Component Analysis) sono

\* *Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani*

\*\* *Unità di ricerca Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani, responsabile scientifico prof. Paola Roncada*

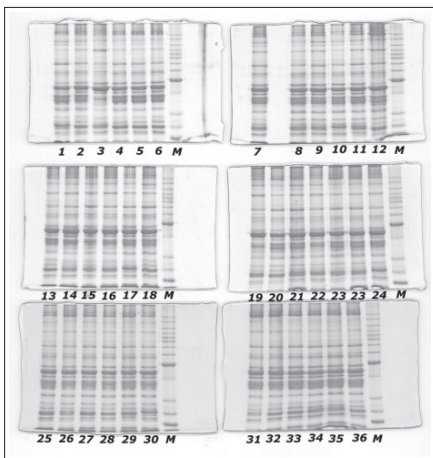


Fig. 1 *Elettroforesi monodimensionale di muscolo*

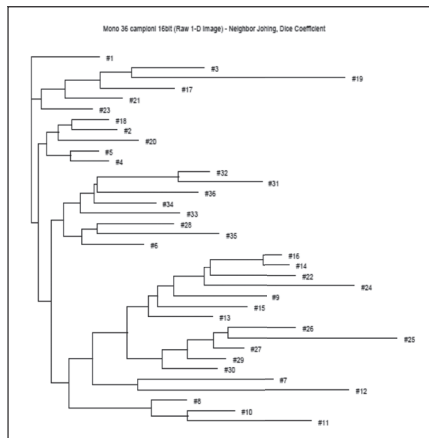


Fig. 2 *Cluster 36 campioni*

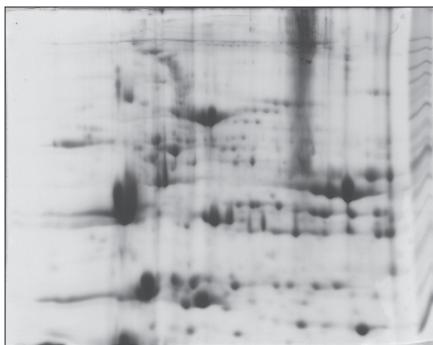
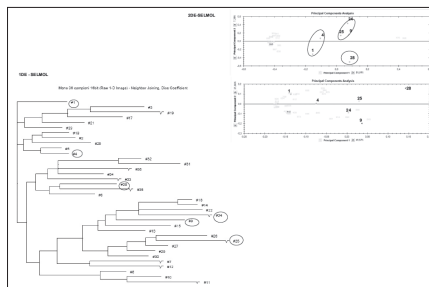
state eseguite mappe bidimensionali su campioni simili e sono stati ricanalizzati con il metodo di PCA.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Le proteine estratte dai campioni di muscolo sono state separate mediante SDS-PAGE al 10% (fig. 1), dopo colorazione i gel sono stati montati in un'unica immagine e analizzati mediante il software Quantity One 4.6.3 (BIORAD). Le lane e le bande sono state rilevate utilizzando una sensibilità intermedia per evitare il riconoscimento del rumore di fondo. Dopo sottrazione del background si è proceduto all'analisi statistica multivariata. Per valutare il grado di similarità dei campioni è stato utilizzato il modulo di clustering "Phylogenetic Tree", la metodica selezionata per il clustering è stata quella del Neighbor Joining. L'output del clustering è mostrato in figura 2.

Gli estratti proteici di muscolo sono stati poi separati mediante 2DE (fig. 3). Inizialmente sono stati scelti 6 campioni ciascuno rappresentativo di un gruppo come mostrato nel clustering. Le mappe bidimensionali ottenute da questi campioni sono state analizzate mediante il software Progenesis SameSpot. In questo caso per valutare la similarità tra i vari campioni e la bontà del clustering ottenuto con la prima analisi è stata utilizzata l'analisi dei componenti principali (PCA) integrata nel modulo stat di Progenesis. La valutazione è stata fatta seguendo due modalità: 1) utilizzando per la PCA i valori di espressione degli spot che risultavano



Fig. 3 *Mappa bidimensionale di muscolo*Fig. 4. *Clustering 1D vs PCA 2D*

statisticamente significativi all'ANOVA; 2) utilizzando valori di espressione degli spot che differivano tra i vari campioni di almeno 2 volte (fold difference).

In questo studio sono stati comparati i profili proteomici di tessuto muscolare bovino per ottenere nuovi dati riguardanti biomarcatori proteici della qualità della carne. I profili di espressione proteica ottenuti dalle analisi 1D e 2D contengono solitamente informazioni complesse che sono parzialmente nascoste se vengono utilizzati esclusivamente metodi statistici di tipo classico, e spesso i test statistici utilizzati per la selezione di marker non sono adeguati nel caso di molte variabili in gioco. L'utilizzo, come in questo caso, di metodi statistici multivariati ci permette di valutare in poco tempo un elevato numero di variabili (le proteine) e mettere in risalto eventuali differenze tra i vari campioni. Dai dati ottenuti da 1-DE e 2-DE la separazione dei vari campioni ottenuta mediante la PCA è comparabile a quella ottenuta in prima analisi con il clustering, con il vantaggio, per la PCA, di poter avere una lista di spot e quindi di potenziali marcatori utilizzabili per differenziare univocamente i campioni di muscolo bovino e classificarli in una (fig. 4). Nel caso del clustering il vantaggio iniziale è quello di poter separare e differenziare molti campioni (e quindi analizzare molti soggetti) in poco tempo essendo la 1-DE una tecnica veloce e robusta.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Alessandro Gaviraghi (Dottorando)  
Francesca Deriu (Assegnista)

## PRODOTTI

- Metodica di analisi

## TRASFERIMENTO

Possibilità di trovare un metodo alternativo di clustering dei campioni per similitudine di espressione proteica

## PUBBLICAZIONI

- 1) Poster al 4° congresso nazionale dell'Associazione Italiana di Proteomica (Italian Proteomic Association – ItPA) dal titolo “Evaluation of post-mortem change in bovine feeded with different diet supplementation”, dal 22 al 25 giugno a Milano. Milano Bicocca.
- 2) Poster al 60° congresso della Federazione Europea di Scienze Animali (European Federation of Animal Science – EAAP) dal titolo “Build up a synthetic reference map of bovine muscle proteins” dal 24 al 27 agosto 2009 a Barcellona.
- 3) Poster al 5 Congresso Società Italiana di Proteomica ItPA FIRENZE Quality index in Marchigiana Meat Firenze 9-12 giugno 2010.
- 4) Comunicazione orale SISVET (società Italiana scienze veterinarie) “Proteomica applicata allo studio qualitativo delle carni bovine”, Asti settembre 2010.

Unità operativa latte bovino



## Relazione coordinatore

I bovini da latte rivestono un ruolo economico di primo piano nella zootecnia italiana. Le stime Istat riferite a Dicembre 2008 indicano la presenza in Italia di circa 1,83 milioni di lattifere in circa 62 mila aziende e una produzione complessiva di 109 mila quintali di latte, per un valore a Prezzi di Base di 4,4 miliardi di Euro. Negli ultimi 20 anni le produzioni per capo sono costantemente aumentate, grazie all'azione combinata di miglioramento gestionale e genetico. Da tempo la genetica ha un mercato internazionale molto competitivo. Questo ha portato diversi paesi a investire in ricerca al fine di stimare in modo sempre più accurato il valore genetico dei riproduttori e di elaborare indici di selezione adatti alle condizioni locali di produzione e di mercato. Negli ultimi vent'anni si è sviluppata la genetica molecolare, che studia il DNA e le sue variazioni. Per anni le applicazioni delle conoscenze molecolari al breeding si sono limitate alla verifica di paternità e alla diagnosi di difetti genetici, con poche eccezioni che riguardano per esempio la diagnosi del gene MC1R che controlla il colore del mantello nella Frisona e degli alleli alla K-caseina associati alla resa casearia. Il progetto Selmol ha studiato le prospettive di applicazione al miglioramento genetico offerte dalle nuove tecnologie di analisi del genoma. In particolare la linea latte bovino ha affrontato quattro diverse linee di ricerca che hanno studiato: i) l'applicazione dei nuovi pannelli di marcatori SNP ad alta densità (54001 SNP) alla caratterizzazione del genoma; ii) geni candidati ad avere un effetto su caratteri interessanti per la selezione, iii) regioni cromosomiche (QTL) associate a effetti sulla produzione di latte e delle proteine del latte e iv) le proteine del latte e il loro effetto sugli aspetti quali-quantitativi della produzione di latte. I risultati ottenuti

\* *Università Cattolica del Sacro Cuore, Istituto di Zootecnica*

dalle quattro linee sono di seguito descritte dai ricercatori che hanno partecipato agli studi. Tutte hanno aspetti di ricerca di base, per esempio indirizzati all'incremento delle conoscenze sulla struttura dei genomi, sugli effetti esercitati sulla diversità genetica dalla selezione antropica e sulle basi biologiche dei caratteri complessi, e potenziali risvolti applicativi per la selezione, alcuni di particolare interesse.

La linea latte bovino ha per la prima volta in Italia adottato un approccio integrato che ha valutato in parallelo e in modo comparativo l'effetto di geni candidati e QTL con un approccio Genome-Wide con decine di migliaia di marcatori. I risultati ottenuti sono stati estremamente interessanti sia dal punto di vista di una immediata applicazione che dal punto di vista scientifico e di applicazione futura. Dal punto di vista applicativo sono stati messe a punto di tre pipeline. Una, in collaborazione con LGS, per l'estrazione in parallelo di migliaia di campioni di DNA da seme e da sangue e per la verifica della qualità di DNA. La seconda, in collaborazione con UNITUS, per la quantificazione e diluizione dei campioni a concentrazione standard. La terza per il controllo qualità e la pulitura dei dataset di SNP di centinaia di milioni di dati ottenuti in out-sourcing. Questo ha permesso l'utilizzo dei dati SNP per ottenere il risultato applicativo più interessante per il sistema zootecnico nazionale: la valutazione della Selezione Genomica nelle tre principali razze da latte italiane; Frisone, Bruna e Pezzata Rossa. Le analisi relative a questo aspetto sono state condotte in stretta collaborazione con l'UO modelli e sono descritte nella relazione di quella UO. In questa relazione vengono dati esempi di altri risultati che permettono di meglio comprendere la struttura genetica e la biologia delle popolazioni zootecniche. Questi potranno essere considerate in nuovi modelli di selezione genomica per aumentarne l'efficacia. In particolare l'analisi della struttura genetica delle razze studiate, della similarità genetica tra animali e del loro livello di *linkage disequilibrium* ha importanza per la gestione della diversità genetica delle razze, per i piani di accoppiamento e per la scelta ottimale del numero di marcatori e di animali da utilizzare nelle future genotipizzazioni. I risultati relativi all'individuazione delle tracce della selezione ha grande interesse per comprendere su quale zone del genoma e su quali geni abbia avuto effetto la selezione nel passato. Alcune regioni sono state fissate nelle razze e spiegano in parte le differenze biologiche tra le razze, altre sono tuttora sotto selezione differenziale e rivestono in interesse applicativo oltre che scientifico. Le analisi di associazione Genome-Wide identificano marcatori associati a caratteri specifici, anche questi di interesse sia per la ricerca, che vuole identificare i geni e le mutazioni causative degli effetti osservati, che per l'applicazione nella selezione genomica. Allo stesso modo le

associazioni di alcuni geni candidati per funzione, comprese quelli delle latto-proteine, con caratteri di interesse per la selezione e la mappatura fine di QTL noti completano le analisi genome-wide e aiutano a comprendere la biologia dei bovini. Infine lo sviluppo di metodi per un'analisi dettagliata delle diverse frazioni caseiniche nel latte offre l'opportunità di misurare nel latte fenotipi direttamente coinvolti nella determinazione dell'efficienza di trasformazione del latte in formaggio.

In sintesi la selezione genomica non potrà che beneficiare in termini di precisione di una conoscenza più approfondita della biologia degli animali e dei determinanti genetici che la controllano.





PAOLO AJMONE-MARSAN\*

## Analisi Genome-Wide\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Le analisi Genome-Wide comprendono, oltre alla selezione genomica, descritta dalla UO modelli, lo studio della struttura genetica delle popolazioni, del loro livello di linkage disequilibrium (Kim et al., 2009; Khatkar et al., 2010), l'identificazione delle regioni genomiche sotto l'effetto della selezione (Hayes et al., 2009) e lo studio delle associazioni genotipo-fenotipo (Pryce et al., 2010). Nella linea di ricerca, "latte bovino" le analisi Genome-Wide sono state utilizzate per studiare approfonditamente due razze da latte e una a duplice attitudine: Frisona Italiana, Bruna Italiana e Pezzata Rossa Italiana.

L'avanzamento della ricerca verso l'applicazione della selezione genomica nei bovini da latte e i risultati ottenuti da questa linea di ricerca, saranno di beneficio non solo alla comunità scientifica ma avranno anche un'utilità pratica anche per le associazioni di razza e quindi per gli allevatori stessi.

### MATERIALI E METODOLOGIE

L'affidabilità dei risultati ottenuti dalle analisi Genome-Wide dipende dalla qualità dei dati molecolari e fenotipici utilizzati. Quindi, in collaborazione con le Associazioni Nazionali Allevatori, è stato eseguito un controllo accurato dei dati. Programmi creati *ad hoc* hanno permesso di verificare: i) ripetibi-

\* Università Cattolica del Sacro Cuore, Istituto di Zootecnica

\*\* Unità di ricerca Università Cattolica di Piacenza, responsabile scientifico Prof. Paolo Ajmone-Marsan

RAZZA		DATASET GREZZO	DATASET DOPO IL CONTROLLO QUALITÀ
FRISONA ITALIANA	Animali (n)	1088	1042
	Marcatori (n)	54,000	40,373
BRUNA ITALIANA	Animali (n)	755	749
	Marcatori (n)	54,000	36,708
PEZZATA ROSSA ITALIANA	Animali (n)	482	479
	Marcatori (n)	54,000	39,570

Tab. 1 *Numero di animali e marcatori ritenuti per ciascuna razza dopo le operazioni di controllo qualità*

lità dei dati molecolari (confronto di animali genotipizzati due volte in modo indipendente); ii) frequenza di dati mancanti per marcatore; iii) frequenza alleliche; iv) rispetto dell’equilibrio Hardy-Weinberg e v) verifica della discendenza mendeliana.

Il dataset controllato è stato utilizzato per studiare la struttura genetica della popolazione e il livello di linkage disequilibrium, per cercare zone del genoma con evidenti effetti di selezione e identificare, attraverso studi di associazione, marcatori con effetto su caratteri d’interesse economico. Le analisi sono state effettuate sia utilizzando software appositamente creati, sia sfruttando software già disponibili. Le analisi sono state svolte in collaborazione e in coordinamento con alcuni gruppi che partecipano alle linee di ricerca latte bovino (Università della Tuscia), carne bovina e altre specie (Università della Tuscia) e modelli (Università di Sassari e di Perugia).

RISULTATI E CONCLUSIONI

La “linea latte bovino” ha genotipizzato un totale di 2325 animali producendo un dataset grezzo di circa 126 milioni di datapoint. Dopo il controllo qualità, il numero di animali complessivamente analizzati è stato ridotto a 2270 (tab. 1).

Escludendo i marcatori posizionati sui cromosomi sessuali, le eterozigosi medie osservate e attese nella razza Frisona sono risultate 0.375 e 0.372, nella razza Bruna 0.366 e 0.363, mentre nella razza Pezzata rossa sia l’eterozigosi attesa sia l’osservata sono risultate uguali a 0.367.

In nessuna delle tre razze la differenza tra eterozigosi osservata e attesa media o calcolata per cromosoma è stata superiore a 0.01.

Il successo della selezione genomica dipende in gran parte dal livello di *linkage disequilibrium* (LD) nella popolazione sotto studio. Il disequilibrio tra marcatori è influenzato sia dalla distanza tra marcatori che dalla dimensione

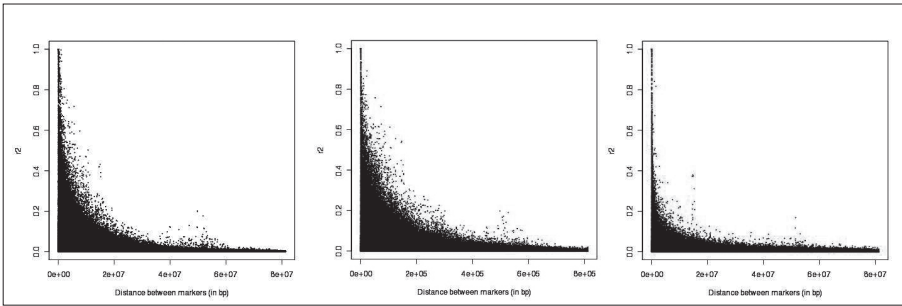


Fig. 1 LD nel cromosoma 14 di Frisona (sinistra), Bruna (centro) e Pezzata rossa (destra), riferito alla distanza tra tutti i marcatori. Il valore di LD tra marcatori espresso in  $r^2$  (asse delle ordinate) è rappresentato in funzione della loro distanza (asse delle ascisse). Si nota come il valore di LD diminuisca all'aumentare della distanza tra i marcatori. In questo cromosoma, la razza Pezzata rossa mostra un valore di LD minore rispetto a quello delle altre razze

effettiva della popolazione. Nella razza Frisona, il valore di LD tra coppie di marcatori successivi, misurato con l'indice  $r^2$ , è 0.23 con una distanza media tra marcatori di 66061 paia di basi. Nella razza Bruna, il livello di LD è risultato leggermente maggiore. Il valore di LD medio è lo stesso ma osservato tra coppie di marcatori distanti in media 72315 paia di basi). Valori inferiori di LD ( $r^2 = 0.19$ ) invece sono stati osservati nella Pezzata Rossa, con marcatori mediamente distanti 66919 paia di basi (fig. 1).

Un minor livello di LD implica la necessità di aumentare o il numero di marcatori analizzati o il numero di animali da utilizzare nella popolazione di riferimento per ottenere valori di accuratezza sufficienti nella stima degli indici genomici.

Il valore di LD, le stime delle frequenze alleliche e genotipiche con le quali calcolare l'indice  $F_{st}$  e il calcolo dell'eterozigosi (osservata e attesa), sono utili anche per misurare l'effetto della selezione sul genoma.

Infatti, la selezione a favore (o contro) un determinato allele causa una diminuzione dell'eterozigosi e quando è differenziale tra razze, a un incremento dell'indice  $F_{st}$ . Misurando e confrontando questi parametri genetici lungo i cromosomi di razze diverse (ad es. selezionate per la produzione di carne o di latte), si possono identificare regioni potenzialmente sotto selezione. Un esempio di queste analisi è riportato in dettaglio in una relazione della linea "carne bovina e altre specie" con cui è in atto una stretta collaborazione. In particolare è mostrato come su BTA6, in prossimità dei geni *ABCG2* e *OPN* sia possibile rilevare un picco dell'indice  $F_{st}$  tra Piemontese e Bruna e una brusca riduzione di eterozigosi nella razza Bruna.

Gli studi di associazione Genome-Wide sono stati effettuati con due ap-

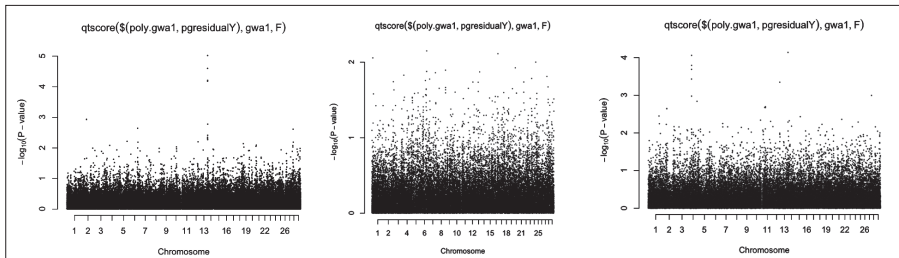


Fig. 2 Studio di associazione Genome-Wide per il carattere latte Kg in Frisona (sinistra), Bruna (centro) e Pezzata rossa (destra). Sull'asse delle Y è riportato il valore di probabilità mentre sull'asse delle X sono riportati gli SNP in funzione della loro posizione suddivisi per cromosoma

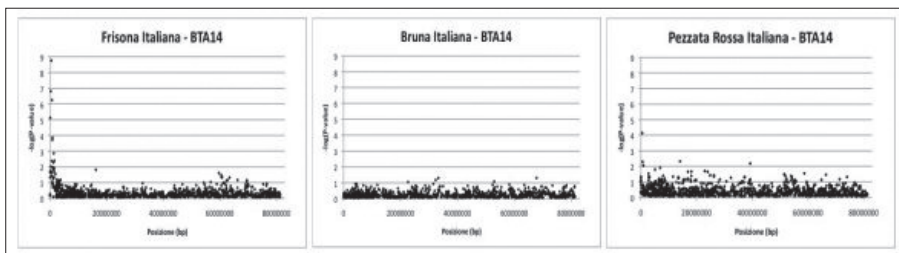


Fig. 3 Studio di associazione Genome-Wide con il carattere latte Kg sul cromosoma 14 (BTA-14) in Frisona (sinistra), Bruna (centro) e Pezzata rossa (destra)

procci diversi: un metodo di tipo parametrico eseguito grazie a due software già disponibili: pLINK e GenABEL; e uno basato sul modello BayesA (Meuwissen et al., 2001) che ha richiesto la scrittura di un software dedicato. Queste analisi prevedono non solo un confronto tra dataset indipendenti entro razza (dove possibile), ma anche confronti tra dati ottenuti con l'analisi Genome-Wide e geni candidati, tra caratteri correlati geneticamente e tra razze, in collaborazione con le altre UO Selmol.

A titolo di esempio, qui di seguito sono presentati i risultati preliminari di associazione per il carattere latte Kg nelle tre razze ottenuti con il pacchetto di R GenABEL.

I grafici relativi ai profili di associazione con latte Kg sono diversi nelle tre razze. Mentre in Frisona si osserva un picco piuttosto evidente all'inizio del cromosoma 14 (che corrisponde alla regione del genoma dove mappa il gene DGAT1), lo stesso picco è meno evidente nella Pezzata Rossa ed è completamente assente nella razza Bruna (in cui il gene è fissato). Vedi dettagli nella figura 3.

L'analisi dei geni candidati descritta di seguito conferma l'associazione di DGAT1 con i principali caratteri produttivi nella razza Frisona.

Qui è stata offerta solo una panoramica delle analisi in corso e delle principali metodologie analitiche attualmente utilizzate. Le informazioni che si ottengono dall'analisi un dataset così ampio permetteranno nel loro insieme di meglio comprendere la base genetica dei caratteri attualmente sotto selezione. La comprensione della biologia fornirà informazioni interessanti per la scienza e utili per migliorare gli attuali modelli di stima degli EBV da utilizzare per la selezione genomica.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Ezequiel L. Nicolazzi (Dottorando)  
 Rosanna Marino (Assegnista)  
 Riccardo Negrini (Ricercatore)  
 Raffaele Mazza (Assegnista)  
 Davide Perini (Assegnista)

#### PRODOTTI

- Programmi per il controllo qualità e la formattazione di dati genomici.
- Programmi per l'analisi della struttura di popolazione ( Frequenze alleliche, eterozigosi e statistiche F di Wright).
- Programmi per l'analisi di dati genomici per l'associazione genotipo-fenotipo.

#### TRASFERIMENTO

I programmi utilizzati per il controllo qualità e i dati genotipici degli animali dopo il controllo qualità sono stati resi disponibili a tutti i partecipanti al progetto e alle ANA. Stretta collaborazione con l'Unità Modelli Statistici sui risultati di questa linea di ricerca (controllo qualità dei dati, Linkage disequilibrium, studi di associazione) e sui modelli utilizzati/da utilizzare per le analisi.

#### BREVETTI

Nessun brevetto è stato prodotto da questa linea di ricerca.

## PUBBLICAZIONI

- 1) MINOZZI G., NICOLAZZI E.L., JANSEN G., STROZZI G., STELLA A., NEGRINI R., AJMONE-MARSAN P., WILLIAMS J.L. (*in stampa*): *Genome wide scan for somatic cell counts in Holstein Bulls*, in *Animal genomics for animal health*, "Maison de la Chimie", Paris (France), 31 maggio-2 giugno 2010.
- 2) AJMONE-MARSAN P., NICOLAZZI E.L., NEGRINI R., MACCIOTTA N.P.P., FONTANESI L., RUSSO V., BAGNATO A., SANTUS E., VICARIO D., VAN KAAM J.B.C.H.M., ALBERA A., FILIPPINI F., MARCHITELLI C., MANCINI G., NARDONE A., VALENTINI A. (2010): *Integrating Population Genomics and Genomic Selection*, in Proceedings of the Interbull International Workshop, Paris, France, 4-5 marzo, 2010, UPPSALA: Interbull, vol. 41, ISBN/ISSN: 1011-6079.
- 3) AJMONE-MARSAN P., MARINO R., PERINI D., NEGRINI R., NICOLAZZI E.L., PARISSET L., VALENTINI A., VICARIO D., SANTUS E., BLASI M., FONTANESI L., SCHIAVINI F., BAGNATO A., RUSSO V., MACCIOTTA N.P.P., NARDONE A. (2009): *Identification of selection signatures across dairy cattle genome based on the Illumina 54,000 SNP panel*, in *Book of abstracts of the 60th EAAP meeting*, Barcelona, Spain, Agosto, 24-27 2009EAAP, vol. 15, p. 609, ISBN/ISSN: 978-90-8686-121-7.
- 4) AJMONE-MARSAN P., MARINO R., PERINI D., SIBELLA F., NICOLAZZI E.L., PARISSET L., DALL'OLIO S., FONTANESI L., BAGNATO A., SCHIAVINI F., SAMORÈ A.B., LUTTMANN T., SANTUS E., BLASI M., MACCIOTTA N.P.P., NARDONE A. (2009): *Analysis of BTA6 in Bruna Italiana and Pezzata Rossa cattle assayed with 2,535 SNPs*, «Italian Journal of Animal Science», vol. 8, p. 183, ISSN: 1594-4077.

LORRAINE PARISET\*

## Analisi di geni candidati\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

I caratteri quantitativi sono stati spesso descritti dal modello infinitesimale, ma esperimenti recenti hanno rivelato che alcuni geni hanno effetti sensibili sui caratteri. QTL che influenzano la produzione di latte sono stati individuati su BTA6, 3 e 14 (Rona et al., 2001; Frank et al., 2002; Viitala et al., 2003; Wibowo et al., 2008). Poiché tali correlazioni possono essere causate da polimorfismi, da mutazioni in linkage con quella in esame, nonché dalla parentela tra i campioni analizzati, a oggi le associazioni significative tra polimorfismi e caratteri del latte sono poche (Rincon et al., 2009). Tuttavia, polimorfismi con effetto su caratteri economicamente rilevanti sarebbero utili nelle strategie di miglioramento genetico. UNITUS, in collaborazione con UNICATT, ha applicato un approccio basato su geni candidati per identificare marcatori diagnostici per i caratteri relativi alla produzione di latte in Bruna, Pezzata rossa e Frisona. Sono stati selezionati 116 SNP in 31 geni candidati da testare per l'associazione con caratteri indicati dalle ANA.

### MATERIALI E METODOLOGIE

UNITUS ha automatizzato la quantificazione dei campioni di DNA mediante picogreen (Quant-iT PicoGreen, Invitrogen) utilizzando la piattaforma Beckman 2000 e un fluorimetro DTX 880 (Beckman Coulter). La UR ha

\* *Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Produzioni Animali*

\*\* *Unità di ricerca Università di Viterbo, responsabile scientifico dott. Lorraine Pariset*

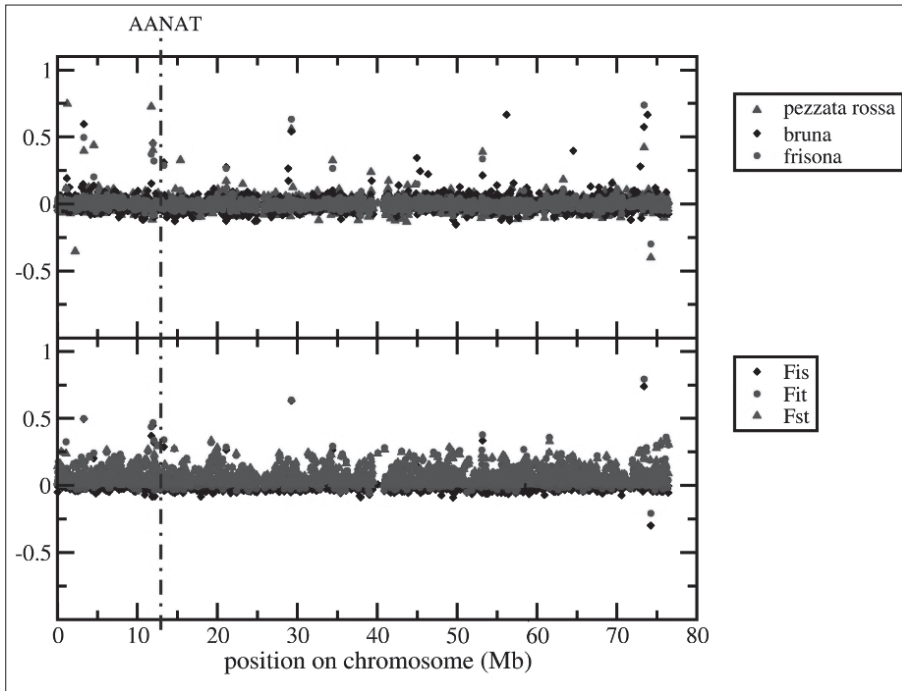


Fig. 1

inviato a KBioscience una piastra con 32 campioni per razza per verificare la presenza dei polimorfismi identificati *in silico* e successivamente 561 campioni di Bruna, 421 di Pezzata Rossa, 814 di Frisona per la genotipizzazione dei geni candidati; a Geneseek 761 campioni di Bruna, 488 di Pezzata Rossa, e 898 di Frisona per l'analisi di SNPs ad alta densità con il chip Illumina. Sono stati eliminati gli individui e SNP con % missing > 10; SNP monomorfici o con frequenza dell'allele minore < 2%. Come caratteri sono stati utilizzati gli EBV forniti dalle ANA. Le analisi sono state eseguite utilizzando codici sviluppati internamente nel linguaggio R (<http://www.r-project.org/>) oppure con il pacchetto PowerMarker (<http://statgen.ncsu.edu/powermarker/>).

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

Degli individui utilizzati per i campioni inviati a Kbioscience sono stati eliminati 76, 55 e 24 tori in Bruna, Pezzata Rossa e Frisona. Dei 116 SNPs analizzati, 32, 36, e 55 sono risultati polimorfici e con percentuale missing



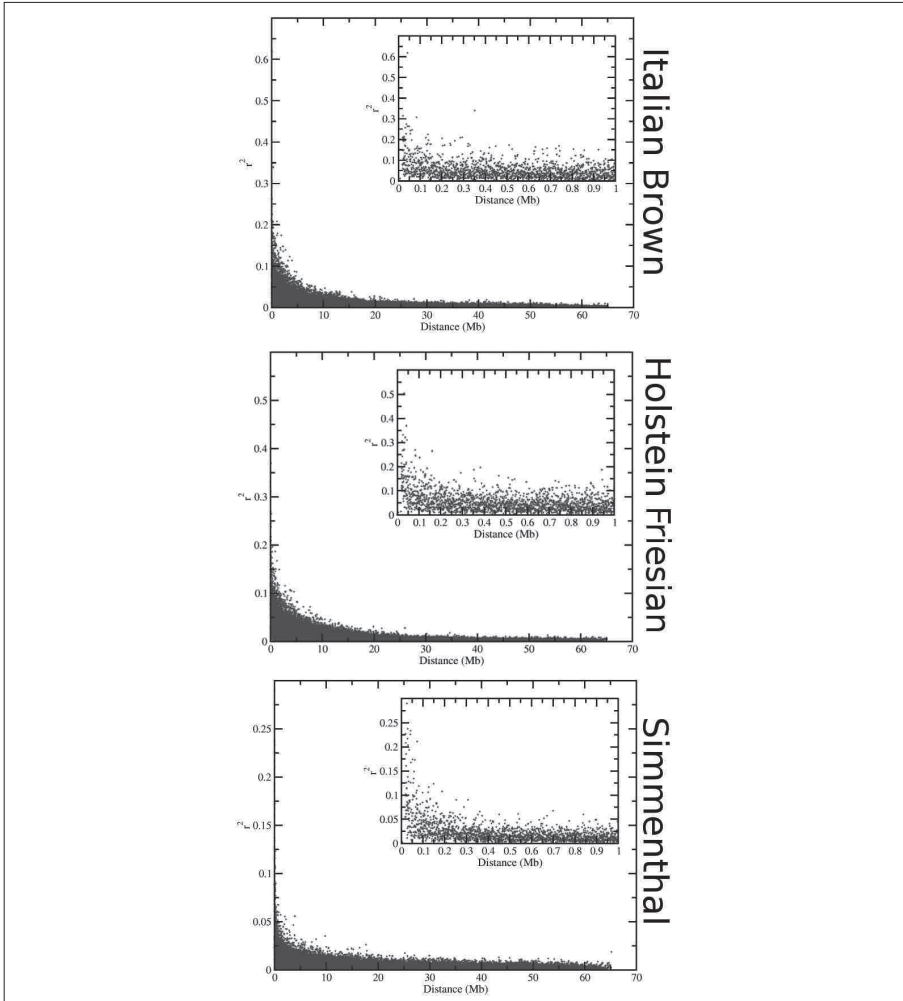


Fig. 2

sufficientemente bassa rispettivamente in Bruna, Pezzata Rossa e Frisona. L'associazione tra genotipi ed EBV è stata verificata mediante una one-way ANOVA tra i genotipi e i singoli EBV. 11 SNP in Bruna (tab. 1), 10 in Pezzata Rossa (tab. 2) e 20 in Frisona (tab. 3) sono risultati significativamente associati ad almeno un EBV. L'analisi ripetuta utilizzando gli aplotipi per i geni con più di un polimorfismo non ha mostrato differenze.

I dati ricavati dal chip Illumina sono stati analizzati anche grazie alle risorse rese disponibili sul cluster Matrix in seguito all'assegnazione degli

SNPID	LATTE	GRASSO	PROTEINA	% GRASSO	% PROT
ACACA_A	7.30E-01	4.94E-01	9.96E-01	1.36E-02	2.93E-01
CSN1SI_I0175	6.29E-01	6.35E-01	4.24E-01	9.25E-01	7.01E-06
CSN1SI_2618I	2.52E-01	1.54E-01	7.84E-01	4.97E-01	2.30E-03
CSN3_I3068	1.43E-02	1.28E-02	2.35E-03	1.10E-01	1.25E-01
CXCR1	2.90E-02	1.30E-02	2.22E-02	5.59E-01	7.03E-01
FABP4_A	5.83E-02	4.12E-02	2.36E-02	9.33E-01	4.67E-01
FASN_A	8.48E-01	1.96E-02	4.93E-01	1.03E-07	1.12E-02
FASN_B	7.23E-01	4.19E-01	8.28E-01	2.08E-04	5.37E-03
GH_5UTR	1.32E-03	1.00E-02	6.46E-03	9.58E-02	2.83E-01
GH_E	2.88E-02	1.71E-01	2.60E-02	7.95E-02	8.74E-01
GHR_B	4.26E-01	5.46E-02	8.66E-02	3.70E-04	6.92E-05
LGB_I740	3.97E-03	1.24E-04	7.09E-02	1.11E-01	1.88E-03
LGB_3982	1.29E-03	5.22E-05	2.14E-02	2.07E-01	1.59E-03
LGB_526I	3.05E-03	9.80E-05	4.20E-02	1.43E-01	2.97E-03
MFG8	2.90E-02	3.53E-02	4.09E-02	6.68E-01	3.35E-01
THRSP	2.91E-02	2.00E-01	2.30E-02	1.65E-01	6.44E-01

Tab. 1

SNPID	LATTE	GRASSO	PROTEINA	% PROT
ACACA_A	8.01E-02	4.28E-02	1.25E-01	4.41E-01
CSN3_I3068	7.73E-02	4.29E-01	4.47E-02	4.62E-02
DGATI_C	2.38E-01	1.08E-02	6.66E-01	1.78E-02
FABP4_A	4.08E-01	4.41E-01	4.40E-01	7.49E-01
FASN_A	4.77E-06	3.42E-05	9.98E-06	3.51E-01
FASN_B	9.03E-01	8.05E-01	9.42E-01	6.76E-01
GH_5UTR	2.40E-05	4.56E-05	1.03E-05	8.40E-01
LEPR_C	2.68E-02	2.76E-02	4.28E-02	1.04E-01
LGB_I740	1.30E-01	5.82E-01	3.47E-02	5.55E-02
LGB_3982	6.34E-03	1.04E-01	4.09E-03	5.38E-02
LGB_526I	4.67E-02	3.57E-01	2.42E-02	6.75E-02
OLRI_C	1.99E-02	7.52E-03	3.60E-02	3.31E-01
PPARGCIA_A	1.22E-03	1.58E-05	6.49E-05	5.14E-01
PPARGCIA_B	7.69E-01	7.69E-01	6.71E-01	4.87E-02
SRC_D	1.34E-02	1.06E-02	1.34E-02	3.96E-01
THRSP_A	1.94E-01	6.91E-01	7.42E-01	1.54E-03

Tab. 2

Standard HPC Grant CASPUR. Tali dati sono stati analizzati calcolando le statistiche F di Wright su tutti gli SNP rimasti dopo il filtraggio e l'eliminazione degli SNP non in HWE per ciascun cromosoma (fig. 1). Sono stati calcolati i valori di  $F_{is}$ ,  $F_{it}$  e  $F_{st}$  per ciascun cromosoma entro razza e tra coppie di razze. Inoltre è stato stimato il *linkage disequilibrium* tra gli SNP

SNPID	LATTE	GRASSO	PROTEINA	% GRASSO	% PROT
BTN1AI_A	2.19E-01	4.32E-02	1.62E-01	6.98E-01	7.50E-01
CRH_A	2.23E-02	8.26E-02	1.10E-02	8.46E-01	8.29E-01
CRH_B	9.50E-02	4.11E-01	7.54E-03	3.62E-01	9.30E-02
CRH_C	2.24E-02	2.79E-01	2.94E-02	2.50E-01	9.75E-01
CSN2_810I	3.03E-03	2.10E-01	1.10E-03	1.21E-01	3.76E-01
CSN2_8178	6.68E-02	3.00E-01	1.08E-03	4.83E-01	2.47E-08
CSN3_13068	2.99E-01	1.90E-01	7.49E-01	7.00E-01	2.02E-04
CSN3_13124	1.36E-02	2.59E-02	7.04E-02	3.67E-01	3.13E-01
CXCRI_A	3.30E-04	3.02E-03	3.36E-04	5.40E-01	6.68E-01
DGATI_C	2.91E-12	1.44E-13	1.54E-03	1.92E-75	2.77E-13
DGATI_K232A	4.14E-12	1.05E-12	1.35E-03	3.63E-72	7.77E-13
FASN_B	2.66E-01	1.71E-02	8.92E-02	3.75E-01	3.59E-01
GH_A	8.53E-02	2.50E-02	1.11E-01	8.16E-01	9.42E-01
GH_B	7.38E-01	2.19E-01	9.08E-01	2.75E-02	2.91E-01
GH_E	5.56E-02	1.21E-02	1.16E-01	7.33E-01	8.12E-01
KIT_A	1.27E-01	5.87E-02	3.73E-02	8.84E-01	1.27E-01
LEP_A	1.28E-02	5.40E-04	7.40E-03	5.61E-01	9.17E-01
LEP_C	4.69E-02	2.15E-01	5.87E-02	7.51E-01	9.21E-01
LEP_D	4.10E-02	2.05E-01	5.64E-02	7.38E-01	8.64E-01
LEP_A	7.36E-03	5.63E-04	4.66E-03	6.53E-01	9.10E-01
LGB_1740	2.75E-02	6.52E-02	4.07E-04	1.19E-01	1.88E-02
LGB_3982	2.04E-02	5.42E-02	2.08E-04	2.17E-01	1.53E-02
LGB_5261	1.91E-02	4.26E-02	1.91E-04	1.50E-01	1.55E-02
MFG8_A	2.06E-01	8.47E-02	6.49E-01	6.81E-01	2.43E-02
PPARGCIA_A	1.43E-01	2.53E-01	7.42E-02	6.48E-01	1.72E-02
PPARGCIA_B	9.51E-02	2.67E-01	4.51E-02	7.81E-01	6.46E-01
PPARGCIA_C	8.07E-03	3.10E-02	2.82E-04	4.59E-01	3.28E-03
PRLR_B1	5.23E-05	3.98E-05	3.00E-09	9.85E-01	4.97E-04
TG_A	1.86E-03	8.53E-01	1.10E-02	5.39E-04	2.56E-01
THRSP_A	7.68E-03	4.25E-05	2.39E-04	2.61E-01	9.10E-02
TPH_B	4.21E-03	1.74E-01	4.42E-03	1.54E-01	8.75E-01

Tab. 3

entro ciascuna razza e ciascun cromosoma con il metodo (Rogers e Huff, fig. 2).

#### BIBLIOGRAFIA

- FRANK M.T. ET AL. (2002): «Anim Genet.», 33 (1), pp. 56-60.  
 RINCON G. ET AL. (2009): «J. Dairy Sci.», 92, pp. 758-764.

- ROGERS A.R. & HUFF C.: «Genetics», 182, pp. 839-44.  
 RONA M. ET AL. (2001): «Genetics», 159, pp. 727-735.  
 VITALA S.M. ET AL. (2003): «J. Dairy Sci.», 86, pp. 1828-36.  
 WIBOWO T.A. ET AL. (2008): «Int J Biol Sci.», 4 (6), pp. 406-14.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Giordano Mancini (Dottorando)  
 Gianluca Prosperini (Dottorando)  
 Gabriella Porcai (Tecnico)  
 Maria Gargani (Assegnista)

#### PRODOTTI

- Sviluppo di un software per il filtraggio e l'analisi di dati illumina in base a criteri e soglie determinabili on the fly; scritto interamente in linguaggio Python può essere utilizzato su piattaforme Windows, Mac e GNU/Linux senza necessità di modifiche.
- Finanziamento CASPUR per borsa di dottorato di ricerca "Applicabilità della Genomic Selection al miglioramento genetico dei bovini da latte".
- Standard HPC Grant CASPUR 2009, "Applicazione della Genomic Selection (GS) al miglioramento genetico per la scoperta di geni implicati nella variazione fenotipica".
- Standard HPC Grant CASPUR 2010, "Utilizzo di panel da 54k SNPs per identificare regioni cromosomiche ad alta differenziazione intraspecifica o sotto selezione per la scoperta di geni implicati nella variazione fenotipica".

#### PUBBLICAZIONI

- 1) PROSPERINI G., MANCINI G., CHILLEMI G., AJMONE MARSAN P., PARISET L. (2010): *Effects of polymorphisms in the FASN gene on milk traits in Italian dairy cattle*, AGROSTAT2010 Benevento, Italy, February (23), 24, 25 and 26th 2010.
- 2) MANCINI G., PROSPERINI G., CHILLEMI G., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A., PARISET L. (2010): *Evidence of possible selection signatures near the ACACA and FASN loci in Italian Brown, Italian Simmenthal and Italian Holstein Friesian cattle breeds unravelled by a Illumina 54000 SNPs panel*, AGROSTAT2010 Benevento, Italy, February (23), 24, 25 and 26th 2010.
- 3) MANCINI G., PROSPERINI G., CHILLEMI G., AJMONE-MARSAN P., VALENTINI A., PARISET L. (2010): *Selection Signatures In Brown, Simmenthal And Holstein Friesian Italian Cattle Breeds Unravelling By A Illumina 54000 SNPs Panel*, PAG XVIII San Diego, CA, January 9-13, 2010, p. 546.
- 4) AJMONE MARSAN P., MARINO R., PERINI D., NEGRINI R., NICOLAZZI E., PARISET L., VALENTINI A., VICARIO D., SANTUS E., BLASI M., FONTANESI L., SCHIAVINI F., BAGNATO A., MACCIOTTA N., NARDONE A. (2009): *Identification of selection signature across genome based on a 54,000 SNP panel*, 60th EAAP Barcelona, Spain, 24 to 27 of August 2009.

- 5) VALENTINI A., PARISET L., BONGIORNI S., WILLIAMS J.L., AJMONE MARSAN P., D'ANDREA M.S., PILLA F., QUAGLINO A., ALBERA A. AND NARDONE A. (2009): *Signature of selection around the myostatin locus in Piedmontese cattle typed by a 54,000 SNP panel*, 60th EAAP Barcelona, Spain, 24 to 27 of August 2009.
- 6) VALENTINI A., PARISET L., BONGIORNI S., D'ANDREA M.S., PILLA F., GUARCINI R., FILIPPINI F., WILLIAMS J.L., AJMONE MARSAN P. AND NARDONE A. (2009): *Preliminary results of a genome scan of Marchigiana cattle typed by a Illumina 54,000 SNP panel*, 60th EAAP Barcelona, Spain, 24 to 27 of August 2009.
- 7) PARISET L., CAROLI A., CHESSA S., FONTANESI L., RUSSO V., BAGNATO A., SCHIAVINI F., SAMORÈ A.B., FELIGINI M., BONIZZII I., VICARIO D., ROSSONI A., SANGALLI S., MARINO R., PERINI D., NICOLAZZI E., MACCIOTTA N., AJMONE MARSAN P. (2009): *Assessment of 29 candidate genes for milk traits in Italian dairy cattle*, «Ital. J. Anim. Sci.», vol. 8 (suppl. 2), 226.
- 8) AJMONE MARSAN P., MARINO R., PERINI D., SIBELLA F., NICOLAZZI E., PARISET L., DALL'OLIO S., FONTANESI L., BAGNATO A., SCHIAVINI F., SAMORÈ A.B., LUTTMANN T., SANTUS E., BLASI M., MACCIOTTA N., NARDONE A.: *Analysis of BTA6 in Bruna Italiana and Pezzata Rossa cattle assayed with 2535 SNPs*, «Ital. J. Anim. Sci.», vol. 8 (supp. 2), 183.
- 9) PROSPERINI G., BUENO S., MANCINI G., CHILLEMI G., PARISET L., VALENTINI A. (2009): *How transcriptomic reflects selection for milk and meat traits: kegg pathways and gene ontology in two cattle breeds*, International Conference Foodomics, Cesena, Italy, 28 and 29 May, 2009.



## Analisi di QTL sui cromosomi 14 e 20 per l'identificazione di geni candidati per la qualità e la produzione del latte nelle razze Frisona e Bruna\*\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Studi effettuati dalle due Unità di Ricerca nell'ambito del progetto europeo BovMAS hanno permesso di costruire mappe QTL per i principali caratteri produttivi nelle razze Frisona Italiana e Bruna Italiana. In particolare modo, sui cromosomi 14 (BTA14) e 20 (BTA20) le ricerche sviluppate hanno permesso di identificare importanti QTL per tenore proteico nel latte (PP) e quantità di latte prodotto (MY) oltre che per altri caratteri. Su questi cromosomi studi pubblicati in letteratura hanno già identificato alcuni geni con effetto maggiore (DGAT1, GHR e PRLR) mutazioni nei quali spiegano, almeno in parte, gli effetti identificati anche nelle due razze bovine italiane.

Gli obiettivi del presente studio sono stati quelli di verificare l'ipotesi secondo la quale la variabilità già identificata in questi geni candidati non sia sufficiente a spiegare la variabilità genetica identificata nei BTA14 e BTA20 per le razze Frisona e Bruna Italiana e di identificare altri geni candidati refinendo la posizione di mappa di alcuni QTL identificati su questi cromosomi.

\* *Università di Bologna, Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare*

\*\* *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare*

\*\*\* *Unità di ricerca Università di Bologna, responsabile scientifico prof. Vincenzo Russo; Unità di ricerca Università di Milano, responsabile scientifico prof. Alessandro Bagnato*

## MATERIALI E METODOLOGIE

Il materiale di partenza è rappresentato dal disegno sperimentale del “daughter design” per 10 tori di razza Frisone Italiana e 10 di razza Bruna Italiana con almeno 3500-1000 figlie in lattazione. Per ridurre i costi delle analisi di genotipizzazione necessarie per effettuare un genome scan, l’esperimento utilizza l’approccio del “selective genotyping e DNA pooling”. Per ciascun carattere e ciascun toro sono stati costituiti pool di DNA utilizzando il latte delle figlie estreme (alto e basso EBV) per l’indice genetico relativo a PP e MY. Essendo le cellule somatiche presenti nel latte la fonte di DNA utilizzata, la quantità di latte inclusa nel pool per ciascuna figlia è stata stabilita in base alla conta di cellule somatiche nei campioni di latte raccolti. Le genotipizzazioni sono state effettuate sul DNA estratto da pool di latte per marcatori microsatelliti uniformemente sparsi sui BTA14 e BTA20 (25 microsatelliti sul BTA14 e 30 sul BTA20). Le frequenze alleliche degli alleli dei tori in pool stimate sulla base delle altezze dei picchi ottenuti nell’analisi di frammenti con sequenziatori automatici ha permesso di determinare se alcuni microsatelliti sono associati con i caratteri PP e MY utilizzati per la costruzione dei pool stessi. I dati dei pool sono stati elaborati con i metodi di single marker mapping (SMM) e multiple marker mapping (MMM). Inoltre i microsatelliti sono stati tipizzati sui campioni individuali delle figlie per un totale di 14687 data point individuali nella Frisone Italiana e sui padri dei tori per effettuare analisi degli aplotipi e mappaggio di QTL con QTL Express. Le mutazioni nei geni candidati sono state tipizzate nei tori del daughter design e altri geni sono stati sequenziati e/o analizzati. In aggiunta a questi approcci sui dati ottenuti in pool è stato testato l’approccio di analisi del Fractionated Pooling Design (FPD) che permette l’identificazione della posizione del QTL con intervalli di confidenza ridotti. Infine sono stati elaborati con una analisi di associazione i genotipi disponibili nell’ambito del progetto per BTA14 e BTA20 ottenuti con il chip SNP Illumina sui tori di Razza Bruna.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Le elaborazioni dei dati dei marcatori microsatelliti in pool con la nuova metodologia di MMM ha permesso di confermare i dati già in parte ottenuti con la procedura di SMM. Per quanto riguarda il BTA14 le analisi sui tori hanno permesso di identificare i genotipi per i polimorfismi nei geni DGAT1, TG, CYP11B1 e CRH. I QTL localizzati nell’estremità centromeri-



ca di questo cromosoma sono spiegati in buona parte dalle mutazioni K232A e dalla VNTR del promotore nel gene DGAT1 nella razza Frisona Italiana. In un toro di questa razza e in tutti i tori di razza Bruna Italiana, omozigoti per entrambi i siti polimorfi del gene DGAT1, altre mutazioni potrebbero essere responsabili degli effetti identificati in questa regione. I dati relativi al gene CYP11B1 localizzato a pochi cM dal gene DGAT1 sono informativi nella razza Frisona ma non nella razza Bruna. Tuttavia nei tori di razza Frisona, non sembra che questo gene possa spiegare gli effetti non spiegati da DGAT1. Sempre sul BTA14 mutazioni nel gene TG (localizzato a circa 15 cM da DGAT1) non spiegano la variabilità genetica identificata in questa regione in entrambe le razze. Nella razza Frisona un importante QTL per PP e MY è localizzato nella regione che va da circa 40 a 80 cM. La larghezza di questa regione, sebbene coperta da diversi microsatelliti, sembrerebbe dovuta al fatto che non sia riferibile a un solo QTL ma a due o più. Tra i geni candidati identificati in questa regione di particolare interesse sono i geni CRH (corticotropin releasing hormone) e TRHR (thyrotropin-releasing hormone receptor). Per quanto riguarda il primo, alcuni studi hanno già messo in evidenza mutazioni missenso associate ad alcuni caratteri produttivi nei bovini da carne. Le tre mutazioni riportate in letteratura in questo gene sono state analizzate nei tori di razza Frisona. L'analisi degli aplotipi tra marcatori microsatelliti per la determinazione della fase degli effetti e gli aplotipi identificati in questo gene potrebbero spiegare, almeno in parte, l'effetto identificato prevalentemente per il carattere MY. Per quanto riguarda il gene TRHR, i due esoni, parte della regione intronica e della regione del promotore sono stati sequenziati in tutti i tori di razza Frisona del daughter design. L'analisi delle sequenze ha permesso di identificare tre nuovi SNP che sono stati utilizzati per analizzare i campioni individuali delle figlie e dei tori per effettuare l'analisi di linkage e la determinazione degli aplotipi. Un marcatore in questo gene sembrerebbe essere associato con la variabilità identificata in questa regione prevalentemente per il carattere PP.

Per quanto riguarda il BTA20 le analisi dei risultati ottenuti dalle elaborazioni effettuate con le procedure di SMM, MMM e linkage analysis ha permesso di identificare almeno 3 regioni QTL. Tuttavia, le valutazioni successive effettuate combinando i dati relativi alle mutazioni nei due geni candidati (GHR e PRLR) e l'analisi dell'effetto degli aplotipi dedotto mediante analisi dei microsatelliti, hanno permesso di identificare altre regioni QTL non spiegate dalle mutazioni nei due geni sopra indicati. In particolare, la mutazione F279Y nel gene GHR spiega un QTL localizzato a circa 40 cM per il carattere PP. La mutazione S18N nel gene PRLR spiega un QTL per il

carattere MY localizzato a circa 53 cM. Altri due QTL per PP non spiegati dalle due mutazioni nei geni candidati sono stati rilevati a circa 55-70 cM e a circa 75-80 cM. Per quanto riguarda il carattere MY una importante regione QTL è localizzata a circa 15-25 cM. Un'altra regione QTL (forse composta da due QTL) è parzialmente sovrapposta ad alcune precedente e abbraccia una regione di circa 20-30 cM a partire da circa 40 cM. Per quanto riguarda la regione del QTL per MY a circa 15-25 cM è in corso la ricerca di possibili geni candidati da analizzare ulteriormente. Tre regioni QTL identificate sul BTA20 sono state confermate con l'approccio di FPD.

La complessità delle regioni QTL identificate nei due cromosomi analizzati potrà essere ulteriormente chiarita integrando i dati provenienti da altri approcci e combinando i risultati dei genome wide association study (GWA). Nella razza Bruna le analisi di GWA hanno rivelato alcune regioni significative nei BTA14 e BTA20. Nella razza Bruna è stato inoltre seguito un approccio di Selective DNA pooling (sullo stesso materiale sopra descritto) utilizzando i chip genomici per la genotipizzazione che è in corso di sviluppo e che permetterà di confermare con un nuovo set di marcatori le regioni QTL identificate in precedenti progetti e le regioni QTL identificate con la GWA effettuata sui tori. Lo stesso approccio è in svolgimento nella razza Frisona.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Luca Fontanesi (Ricercatore)  
 Emilio Scotti (Tecnico)  
 Angela Picconi (Assegnista)  
 Stefania Dall'Olio (Professore associato)  
 Roberta Davoli (Professore ordinario)  
 Fausta Schiavini (Dottoranda)  
 Antonia Samoré (Assegnista)

#### PRODOTTI

- Sequenze nucleotidiche, SNP, protocolli di analisi, regioni QTL.

ANNA CAROLI\*

## Analisi dei polimorfismi genetici delle proteine del latte\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

I polimorfismi genetici delle lattoproteine bovine presentano ancora un grande interesse dal punti di vista scientifico e applicativo. Solo 6 geni codificano, infatti, per oltre il 95% delle proteine contenute nel latte, e più di 50 alleli sono stati descritti nel genere *Bos*. Si tratta di una variabilità genetica involontariamente plasmata dalla selezione naturale e artificiale a cui sono state e sono sottoposte le diverse razze e popolazioni bovine. Scopo della ricerca è stato quello di utilizzare tecnologie non in *out-sourcing* per la tipizzazione delle più importanti varianti lattoproteiche bovine. In particolare è stata utilizzata una tecnologia *microArray* per l'analisi a livello di DNA dei polimorfismi lattoproteici, aggiungendo ulteriori SNP alla metodica originale. A livello fenotipico è stata effettuata la focalizzazione isoelettrica (IEF) su campioni individuali di latte. Questa seconda parte della ricerca è stata svolta in collaborazione con l'Unità della dott. Maria Feligini.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Un *microArray* universale è stato implementato per la tipizzazione simultanea di numerosi SNP lattoproteici (Chessa et al., 2007). Il sistema sfrutta la tecnica *microarray* nell'applicazione che combina la reazione di legazione (*Ligase Detection Reaction*) con un *Array* Universale. L'IEF è stata effettuata secondo Erhardt et al. (1998).

\* Università di Brescia, Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie

\*\* Unità di ricerca Università di Brescia, responsabile scientifico prof. Anna Caroli

## RISULTATI E CONCLUSIONI

*Analisi microArray*

L'applicazione della tecnologia *microArray* per l'analisi dei polimorfismi genetici si sta diffondendo in quanto presenta un elevato grado di parallelizzazione delle analisi, impossibile con le altre tecnologie fino a ora descritte. Esistono diversi protocolli molecolari per identificare il polimorfismo genetico ai diversi *loci*, permettendo quindi di predire in anticipo il tipo di lattoproteina che ciascun individuo può potenzialmente produrre. In particolare una metodica *microArray* recentemente sviluppata per la specie bovina combina una reazione multipla di PCR, una reazione di ligazione (*Ligation Detection Reaction* - LDR) e un'ibridazione su un *array* universale (*Universal Array* - UA) permettendo di analizzare più mutazioni localizzate in regioni genomiche coinvolte nella sintesi lattoproteica.

Gli SNP analizzati dall'*array* permettono l'identificazione simultanea dei seguenti alleli di  $\alpha_{s1}$ -CN (*CSN1S1*\*B, *CSN1S1*\*C),  $\beta$ -CN (*CSN2*\*A1, *CSN2*\*A2, *CSN2*\*A3, *CSN2*\*B, *CSN2*\*C, *CSN2*\*I),  $\kappa$ -CN (*CSN3*\*A, *CSN3*\*B, *CSN3*\*C, *CSN3*\*E, *CSN3*\*H) e  $\beta$ -LG (*LGB*\*A e *LGB*\*B). Oltre a questi polimorfismi, sono stati inclusi nell'analisi un polimorfismo posto all'interno del *Short Interspersed Nucleotide Element* (SINE) *Bov-A2* nel secondo introne della *CSN3* e quelli del promotore della *CSN1S1*, avendo questi mostrato associazioni statisticamente significative con diversi caratteri produttivi. Sono inoltre inclusi nel *microArray* tre SNP che permettono di distinguere rispettivamente le varianti A e V del gene *SCD*, e le varianti A e K del gene *DGAT1*, e le varianti A e B del promotore del gene *LGB* (Chessa et al., 2008).

L'analisi *microArray* è stata applicata a un *subset* di tori campionati dalla UO, per validare i risultati delle genotipizzazioni ottenute in *out-sourcing*. È stata in generale osservata un'elevata concordanza tra le due metodiche. Nonostante le piattaforme tecnologiche permettano oggi di analizzare numerosissime mutazioni a prezzi molto convenienti, poter applicare dei metodi affidabili anche nei propri laboratori è un elemento cruciale perché il ricercatore conservi la propria autonomia nonché la capacità di confrontare le informazioni genetiche elaborate all'esterno con quelle ottenute mediante metodiche opportunamente implementate e standardizzate nelle proprie strutture di afferenza. Un esempio di questo è rappresentato dallo SNP che distingue la *CSN2* dalle altre varianti e che non è stato identificato dalle analisi in *out-sourcing* nonostante la sua frequenza alquanto elevata ad esempio

nella razza Bruna. In questo caso è stato adattato dalla UR un semplice test PCR – allele specifica (AS-PCR) per poter analizzare soltanto questo SNP nei campioni che potrebbero presentare tale SNP nel loro genotipo, in particolare quelli tipizzati come omozigoti o eterozigoti per l'allele A<sup>2</sup>.

### *Analisi IEF*

L'analisi dei campioni individuale di latte consente di identificare ben 26 varianti lattoproteiche nella specie bovina. I polimorfismi identificabili mediante tale metodica sono quelli che modificano il punto isoelettrico delle proteine. Si tratta in genere di scambi o delezioni amminoacidiche o di grande importanza in quanto spesso possono influenzare le caratteristiche funzionali e tecnologiche delle caseine e delle sieroproteine.

È stata condotta la tipizzazione mediante IEF di 200 campioni di latte individuale di bovine di razza Frisona italiana oggetto della determinazione quali-quantitativa delle lattoproteine effettuata dalla UR Feligini. I loci *CSN1S1*, *CSN1S2* e *LAA* sono risultati monomorfici per gli alleli B, A e B rispettivamente, mentre le seguenti frequenze alleliche sono state riscontrate ai restanti loci analizzati:  $\beta$ -CN (*CSN2*) A<sup>1</sup> = 0,354; A<sup>2</sup> = 0,623; A<sup>3</sup> = 0,003, B = 0,020;  $\kappa$ -CN (*CSN3*) A = 0,802; B = 0,094; E = 0,104;  $\beta$ -LG (*LGB*) A = 0,528; B = 0,472.

Da notare la frequenza non trascurabile, nel campione analizzato, della variante B di  $\beta$ -CN. Non si tratta di un allele importante nella razza Frisona, tuttavia se viene trascurata la sua identificazione, nelle analisi genetiche volte a identificare gli effetti dei diversi alleli sui caratteri quantitativi si confonde l'effetto di alcuni genotipi, ad esempio A<sup>2</sup>A<sup>2</sup> (78 campioni nel *data-set* analizzato) con A<sup>2</sup>B (7 campioni nello stesso *data-set*). Da notare ancora l'elevata frequenza della variante A di  $\kappa$ -CN e quella alquanto ridotta della variante B. La seconda variante, in ordine di frequenza, è infatti la E, allele che va quindi sempre accuratamente ricercato e tipizzato, in particolare nella razza Frisona. I due alleli di  $\beta$ -LG presentano una frequenza bilanciata. Molto probabilmente si tratta proprio di un "polimorfismo bilanciato" nelle razze bovine in selezione: entrambi gli alleli sono importanti per diversi effetti di tipo fisiologico e funzionale e vengono in qualche modo selezionati insieme nei programmi di miglioramento genetico. Da qui l'importanza di proseguire le indagini su questa proteina e sulle sue implicazioni funzionali. I risultati ottenuti per quanto sulle relazioni tra genotipi lattoproteici e quantificazione delle lattoproteine sono riassunti dalla UR Feligini.

Va infine sottolineato come l'IEF consenta in modo semplice ma efficace di controllare i prodotti dei geni di interesse, permettendo di visualizzare simultaneamente le 6 principali proteine del latte. L'IEF è quindi un metodo particolarmente utile per il monitoraggio della variabilità lattoproteica in questa specie, ovviamente se si dispone del prodotto genico e, quindi, di animali in lattazione, e non va trascurata effettuando genotipizzazioni esclusivamente a livello di DNA. Questo potrebbe essere un rischio della selezione molecolare: perdere di vista il fenotipo e concentrarsi solo sul genotipo, per quanto sempre più completo, degli animali da selezionare.

In conclusione, l'utilizzo delle tecniche descritte fornisce un pannello di informazioni genetiche di grande utilità per l'allevatore interessato al miglioramento della produzione e della qualità del latte.

#### BIBLIOGRAFIA

- CHESSA S., CHIATTI F., CERIOTTI G., CAROLI A., CONSOLANDI C., PAGNACCO G., CASTIGLIONI B. (2007): *Development of a Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Microarray Platform for the Identification of Bovine Milk Protein Genetic Polymorphisms*, «J. Dairy Sci.», 90, pp. 451-464.
- ERHARDT G. ET AL. (1998): «J. Anim. Breed. Genetic.», 115, pp. 63-71.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Stefania Chessa (Ricercatore CNR)  
 Daniela Rignanese (Assegnista)  
 Omar Bulgari (Assegnista)

#### PRODOTTI

- Protocolli per l'utilizzo del *microArray* per l'analisi di più SNP lattoproteici.

#### TRASFERIMENTO

Conoscenze trasferite: dati sulle frequenze delle varianti lattoproteiche nella razza Frisone ottenuti mediante IEF.

## PUBBLICAZIONI

- 1) CHESSA S., RIGNANESE D., CONTE G., SEVERGNINI M., CERIOTTI G., CAROLI A., PAGNACCO G., CASTIGLIONI B. (2008): *Application of a microarray technology to SNP detection within genes involved in milk production*, «Chromosome Research», 16, pp. 1041-1042.
- 2) CHESSA S., RIGNANESE D., CONTE C., SEVERGNINI M., CAROLI A., PAGNACCO G., CASTIGLIONI B. (2008): *Application of a Microarray Technology to SNPs detection within genes involved in milk production*, 18<sup>th</sup> International Colloquium on Animal Cytogenetics, 8-10 giugno 2008, Bucharest (Romania), P17.
- 3) RIGNANESE D., CHESSA S., CERIOTTI G., CASTIGLIONI B., PAGNACCO G., CAROLI A.M. (2008): *Approccio genomico e proteomico allo studio delle lattoproteine*, 1° Convegno Lattiero-Caseario AITeL: Acquisizioni scientifiche e valorizzazione del latte e derivati: aspetti genetici, ambientali e tecnologici, Bologna, 12 giugno 2008.
- 4) CAROLI A.M., CHESSA S., ERHARDT G.J. (2009): *Invited review: Milk protein genetic variation in cattle: impact on animal breeding and human nutrition*, «Journal of Dairy Science», 92, pp. 5335-5352.
- 5) CAROLI A.M., CHESSA S., ERHARDT G.J. (2010): *Invited presentation: Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition*, Accettato per 9<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany, August 1-6, 2010.





MARIA FELIGINI\*

## Determinazione quali-quantitativa delle caseine e delle maggiori sieroproteine di latte bovino e correlazione con l'aplotipo ai rispettivi loci caseinici e sierici\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

La composizione del latte è soggetta a variazioni determinate da fattori genetici e influenzate fortemente da fattori stagionali e d'allevamento. Queste variazioni possono influenzare le sue proprietà fisico-chimiche e tecnologiche con effetti consequenziali sulla resa e sulla qualità del formaggio. Nella lavorazione di grandi quantitativi di latte è quindi importante conoscere le relazioni proporzionali esistenti fra le diverse proteine e i fattori che causano tali variazioni. In particolare, la conoscenza delle differenze di espressione delle frazioni caseiniche, dovute a fattori genetici, può favorire il miglioramento dell'attitudine casearia del latte, aspetto prioritario per l'industria casearia. La ricerca è stata condotta in collaborazione con la SUBUO della prof Anna Caroli.

Gli obiettivi della ricerca sono stati:

- Ottimizzazione di protocolli analitici per la separazione proteica mediante cromatografia liquida
- Quantificazione assoluta delle singole caseine ( $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN e  $\kappa$ -CN) e delle maggiori sieroproteine ( $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG e SA)
- Correlazione tra aplotipi e contenuto proteico.

\* Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani

\*\* Unità di ricerca Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani, responsabile scientifico dott. Maria Feligini

## MATERIALE E METODOLOGIE

Mediante cromatografia liquida (RP-HPLC) sono stati analizzati 200 lattici individuali prodotti da vacche di razza Frisona presenti in 4 allevamenti lombardi. Ciascuna frazione proteica (caseine e sieroproteine) è stata identificata in base al suo peso molecolare (ESI-Q-TOF). Attraverso la costruzione di una curva di calibrazione utilizzando standard commerciali, è stato possibile quantificare le proteine con accuratezza, precisione e ripetibilità elevate. In totale (campioni e standard) sono state effettuate 550 analisi cromatografiche.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

L'analisi cromatografica abbinata alla spettrometria di massa ha permesso di separare, identificare e quantificare in maniera affidabile le frazioni proteiche d'interesse. La determinazione della massa molecolare delle frazioni caseiniche e delle maggiori sieroproteine ha fornito i seguenti risultati:

- $\kappa$ -caseina (4 picchi cromatografici corrispondenti a differenti stati di fosforilazione): 20939 Da, 19988 Da, 19040 Da, 19005 Da;
- $\alpha_{s2}$ -caseina: 26074 Da;
- $\alpha_{s1}$ -caseina: 23615 Da;
- $\beta$ -caseina: 23982 Da;
- sieralbumina: 63000 Da;
- $\alpha$ -lattoalbumina: (2 picchi cromatografici corrispondenti a differenti stati di glicosilazione): 14178 Da, 16280 Da;
- $\beta$ -lattoglobulina: (2 picchi cromatografici corrispondenti alle maggiori varianti genetiche): 18270 Da, 18447 Da.

La quantificazione delle frazioni caseiniche e delle principali frazioni sieriche, svolta mediante curve di calibrazione costruite con il metodo dello standard esterno, hanno fornito le seguenti concentrazioni medie riferite all'intero set di campioni:

- Frazioni caseiniche: 9.55 g/l per  $\alpha_{s1}$ -CN, 1.56 g/l per  $\alpha_{s2}$ -CN, 11.39 g/l per  $\beta$ -CN, 3.25 g/l per  $\kappa$ -CN, con una deviazione standard relativa compresa tra il 13.4% (nel caso dell' $\alpha_{s1}$ -CN) e il 32.1% ( $\alpha_{s2}$ -CN). La somma delle frazioni, che può essere confrontata con la caseina totale convenzionalmente misurata nell'ambito dei controlli funzionali, è risultata mediamente pari a 25.75 g/l con una variabilità del 12.9%.
- Frazioni sieriche: 0.96 g/l per  $\alpha$ -LA, 3.29 g/l per  $\beta$ -LG, 0.36 g/l per SA.

La variabilità intorno alla media è risultata compresa tra il 17.9% ( $\alpha$ -LA) e il 43.9% (nel caso della SA).

I risultati analitici sono stati sottoposti a elaborazione statistica mediante analisi della varianza a una via per evidenziare la presenza di differenze significative in funzione dell'aplotipo caseinico e sierico. Nel caso della  $\kappa$ -CN, i quattro genotipi osservati (AA, AE, AB, BB) corrispondono a concentrazioni medie di proteina rispettivamente pari a 3.33 g/l ( $n = 123$ ), 3.42 g/l ( $n = 42$ ), 2.94 g/l ( $n = 29$ ), 1.48 g/l ( $n = 4$ ). Tali genotipi definiscono tre raggruppamenti di campioni (rispettivamente i gruppi AA-AE, AB, BB) che differiscono per la concentrazione di  $\kappa$ -CN in modo altamente significativo ( $p < 0.001$ ); i genotipi AA e AE non sono risultati significativamente differenti l'uno dall'altro. Nel caso della  $\beta$ -LG, i tre genotipi osservati (AA, AB, BB) sono associati a concentrazioni di  $\beta$ -LG rispettivamente pari a 3.58 g/l ( $n = 43$ ), 3.29 g/l ( $n = 33$ ), 2.84 g/l ( $n = 122$ ). Questi genotipi sottendono due gruppi di campioni che differiscono per la concentrazione di  $\beta$ -LG in modo altamente significativo. In particolare, i campioni di genotipo BB risultano significativamente differenti dai campioni AA e AB; i campioni contenenti la variante A non risultano significativamente diversi tra loro.

Non sono state rilevate differenze significative di concentrazione proteica associate ai genotipi osservati per le frazioni  $\alpha_{s1}$ -CN e  $\beta$ -CN.

Ulteriori elaborazioni sono state svolte con l'intento di rilevare differenze significative rispetto ad altri criteri di classificazione dei campioni. In particolare, l'analisi della varianza in funzione dell'allevamento di origine dei campioni ha evidenziato differenze significative ( $p < 0.01$ ) nella concentrazione di tutte le frazioni caseiniche e sieriche eccetto la  $\kappa$ -CN; tali differenze corrispondono in tutti i casi a due gruppi parzialmente sovrapposti (ovvero con almeno un'azienda in comune a entrambi); la composizione dei gruppi di aziende è però diversa per ciascuna frazione proteica e non ha consentito il riconoscimento di alcun pattern.

In conclusione, le analisi cromatografiche hanno permesso di separare e quantificare le frazioni caseiniche e le principali frazioni sieriche con elevata affidabilità. L'identificazione delle frazioni mediante spettrometria di massa ha fornito risultati in accordo con le informazioni esistenti in letteratura, consentendo di confermare l'identità di ciascuna frazione e di verificarne la corrispondenza con i picchi cromatografici rilevati durante l'analisi dei campioni. L'elaborazione statistica dei risultati quantitativi combinati con le informazioni aplotipiche ha permesso di evidenziare un effetto del genotipo ai loci  $\kappa$ -CN e  $\beta$ -LG sulla concentrazione delle proteine corrispondenti, che

può essere di interesse ai fini dell'implementazione di schemi di selezione. Inoltre, è stata evidenziata un'influenza dell'allevamento di provenienza sul contenuto proteico del latte, possibilmente dovuta a fattori gestionali.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Ivan Bonizzi (Ricercatore)  
Natalia Buffoni (Assegnista)

#### PRODOTTI

Protocolli per la quantificazione assoluta delle singole frazioni proteiche del latte.

#### TRASFERIMENTO

Conoscenze trasferite: dati sulla composizione quali-quantitativa delle singole frazioni proteiche di latte bovino.

Unità operativa modelli



## Relazione coordinatore

### DESCRIZIONE DEGLI OBIETTIVI GENERALI E DELLE LINEE DI RICERCA DELLA UO

Le linee di ricerca della UO modelli si sono sviluppate nell'ambito di due obiettivi generali.

Il primo obiettivo è stato lo studio e sviluppo di modelli di utilizzazione delle informazioni della genetica molecolare nell'ambito degli schemi di selezione attualmente operanti in Italia. Le linee di ricerca sviluppate nell'ambito di questo obiettivo hanno riguardato:

- stato dell'arte e metanalisi dei risultati degli studi pubblicati nella ricerca su geni e QTLs che influenzano i caratteri d'interesse economico dei bovini da latte (UR Sassari);
- valutazione e sviluppo di modelli per la stima dei valori genetici genomici nelle razze bovine da carne e da latte allevate in Italia (UR Padova, Sassari, Perugia);
- sviluppo di softwares per il calcolo di valori genetici genomici (UR Padova, Sassari);
- sviluppo di schemi di selezione per le razze di limitata consistenza (UR Milano).

Il secondo obiettivo generale è stato quello della consulenza per elaborazioni alle altre UO del progetto.

Le linee di ricerca sviluppate nell'ambito di questo obiettivo sono state:

- studi di associazione genotipo-fenotipo in razze bovine, ovine, caprine e bufaline allevate in Italia;

\* *Università di Sassari, Dipartimento di Scienze Zootecniche*

- studio della matrice di parentela genomica equina;
- studio di modelli di elaborazione dei dati di espressione genica;
- studio genomico del carattere difficoltà di parto nella razza Piemontese.

Tutte le attività della UO modelli si sono svolte in stretta connessione con le associazioni nazionali di razza interessate (ANAFI, ANARB, ANAPRI, ANABORAPI, ANABIC, ASSONAPA, ANASB)

#### AVANZAMENTI BASILARI DELLE CONOSCENZE

Per quanto attiene il primo obiettivo, l'UO ha messo a punto un metodo di calcolo dei valori genetici genomici (DGV) basato sull'analisi delle componenti principali, in grado di ottenere accuratezze dei valori genetici genomici paragonabili a quelli ottenute con l'impiego di un elevato numero di marcatori ad alta densità ma con tempi e risorse di calcolo impiegate notevolmente inferiori. È stato inoltre sviluppato un software in grado di produrre le stime in modo efficiente grazie alla parallelizzazione dell'algoritmo. Sono stati sviluppati inoltre dei programmi di selezione per razze di limitata consistenza, a singola e duplice attitudine, in grado di massimizzare il progresso genetico contenendo l'incremento della consanguineità.

Relativamente alle attività di consulenza sviluppate con le altre UO, sono state evidenziate relazioni tra SNPs localizzati in diversi geni candidati e caratteri della produzione del latte e la composizione acidica del grasso negli ovini (in coll. UR Pilla), produzione del latte nei caprini (in coll. UR Crepaldi) e nei bufali (in coll. UR Ramunno) e dei caratteri della produzione della carne nei bovini (in coll. UR Valentini) e negli ovini (in coll. UR Panella). In collaborazione con la UR cavalli (Responsabile Silvestrelli) è stato condotto uno studio sulla relazione fra parentela genomica e parentela additiva nella specie equina ed è stato individuato il numero minimo di marcatori in grado di stimare con una soddisfacente accuratezza la parentela genomica con chip a bassa densità. Lo studio sulla base genomica della facilità di parto nella razza Piemontese ha consentito di identificare alcune regioni cromosomiche coinvolte che regolano questo carattere. È stata inoltre messa a punto una tecnica di pre-correzione e analisi per i dati generati con esperimenti microarrays.



## Genomic selection\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

La Genomic Selection (GS) utilizza mappe genetiche ad alta densità per la stima del merito genetico dei candidati alla selezione. Il principale problema della GS è rappresentato dall'asimmetria statistica tra l'elevato numero di marcatori disponibili (decine di migliaia) rispetto al numero degli individui genotipizzati e dei dati fenotipici (centinaia, o qualche migliaio). Sono stati proposti diversi approcci per ovviare al problema, tra i quali possono essere ricordati l'utilizzo di metodi Bayesiani che selezionano marcatori sulla base del loro contributo sull'espressione del fenotipo (Meuwissen et al. 2001), oppure di tecniche di riduzione multivariata come la partial least square regression (PLSR; Solberg 2008) e la principal component analysis (PCA; Macciotta et al. 2010). La tecnica della PCA potrebbe rappresentare un'opzione interessante per le situazioni, quali quella dell'Italia, con numerose razze coinvolte e un numero limitati di animali genotipizzati per razza. L'obiettivo principale della linea di ricerca sulla GS nel progetto Selmol è stato quello di validare l'utilizzo della PCA come metodo di riferimento per la stima dei valori genetici genomici (DGV) in quattro razze bovine allevate in Italia.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Due razze bovine italiane da latte, Frisona e Bruna (863 e 749 tori), una a duplice attitudine, Pezzata Rossa (479 tori) e una da carne, Piemontese (323

\* *Università di Sassari, Dipartimento di Scienze Zootecniche*

\*\* *Unità di ricerca Università di Sassari, responsabile scientifico prof. Nicolò Pietro Paolo Macciotta*

RAZZA	MARCATORI INIZIALI	MARCATORI DOPO EDITING	COMPONENTI PRINCIPALI
Frisona	54001	40901	2564
Bruna	54001	37254	2257
Pezzata Rossa	54001	40179	2476
Piemontese	54001	41878	2536

Tab. 1 *Numero di marcatori iniziali, ritenuti dopo l'editing e numero di componenti principali estratte per ciascuna razza*

	FRISONA			BRUNA			PEZZATA ROSSA		
CARATTERE	70	80	90	70	80	90	70	80	90
GRASSOKG	0.430	0.456	0.451	0.347	0.341	0.274	0.355	0.371	0.427
GRASSO%	0.358	0.381	0.370	0.409	0.403	0.342			
LATTE	0.261	0.257	0.240	0.188	0.197	0.156	0.434	0.460	0.505
INDICE MAMMELLA	0.487	0.501	0.417	0.570	0.530		0.373	0.322	0.471
PROTEINA	0.387	0.389	0.389	0.226	0.197	0.119	0.371	0.412	0.463
PROTEINA%	0.446	0.418	0.352	0.559	0.485	0.482	0.410	0.358	0.180

Tab. 2 *Accuratezze dei DGV per alcuni caratteri della produzione del latte stimati con il metodo PCA-BLUP nelle razze Frisona, Bruna e Pezzata Rossa (ordinamento degli animali per anno di nascita)*

tori) sono state utilizzate per la stima dei DGV. Gli animali sono stati genotipizzati con il bead-chip da 54K SNP. I marcatori sono stati quindi sottoposti a un controllo e ne sono stati ritenuti 40901, 37254, 40179 e 41878 rispettivamente per le quattro razze considerate. Come fenotipi sono stati utilizzati i valori genetici tradizionali (EBV) e le daughter yield deviations (DYD) forniti dalle associazioni allevatori, relative a diversi caratteri produttivi e funzionali. I dataset di training e prediction sono stati costruiti seguendo diversi criteri: anno di nascita degli animali, con diverse soglie di separazione tra training e prediction (dal 1997 al 2000) oppure quelli appartenenti al primo 70, 80 o 90 % del dataset totale; casuale. Per stimare gli effetti dei marcatori sono state utilizzate due metodologie BLUP: R-BLUP, che includeva nella stima il genotipi di tutti i marcatori; PC-BLUP, in cui i predittori erano rappresentati dagli scores delle componenti estratte per singolo cromosoma.

RISULTATI E CONCLUSIONI

L'uso delle componenti principali ha consentito di ridurre notevolmente il numero dei predittori utilizzati per la successiva stima dei DGVs (tab. 1).

Tale riduzione nel numero dei predittori ha comportato una enorme dif-

	FRISONA			BRUNA			PEZZATA ROSSA		
CARATTERE	70	80	90	70	80	90	70	80	90
GRASSOKG	0.600	0.600	0.660	0.800	0.760	0.740	0.639	0.536	0.760
GRASSO%	0.493	0.478	0.578	0.431	0.395	0.360			
LATTE	0.670	0.670	0.650	0.780	0.760	0.770	0.699	0.565	0.684
INDICE MAMMELLA	0.620	0.630	0.430	0.690	0.700		0.549	0.457	0.608
PROTEINA	0.750	0.750	0.770	0.810	0.790	0.790	0.702	0.580	0.758
PROTEINA%	0.460	0.420	0.450	0.530	0.550	0.460	0.348	0.244	0.056

Tab. 3 Accuratezze dei DGV per alcuni caratteri della produzione del latte stimati con il metodo PCA-BLUP nelle razze Frisona, Bruna e Pezzata Rossa (ordinamento degli animali casuale)

ferenza nei tempi di calcolo nei due approcci: ha comportato a circa 3 minuti nel caso del PC-BLUP contro i 480 minuti (con ampia variabilità in funzione del carattere e del criterio di convergenza dell'algoritmo) nel caso del R-BLUP (16 processori 2,3 Ghz, 126,2 GB Ram). I calcoli sono stati eseguiti con un programma Fortran sviluppato dall'unità di ricerca, che permette di stimare gli effetti dei marcatori o delle componenti principali utilizzando una decomposizione LU oppure un'iterazione sui dati con algoritmo Gauss-Seidel. Le accuratezze delle stime dei DGV, misurate dalla correlazione fra DGV e EBV (oppure DYD) negli animali di prediction, sono risultate molto simili tra i due metodi. La tabella 2 riporta le accuratezze dei DGV per i principali caratteri della produzione del latte ottenuta su animali ordinati per anno di nascita, con diversi rapporti training prediction (70:30, 80:20, 90:10) nelle tre razze da latte.

Considerato il basso numero di soggetti disponibili per razza, le accuratezze possono essere considerate soddisfacenti per caratteri come il contenuto proteico, soprattutto nella Bruna, e per l'indice mammella. L'accuratezza della produzione del latte è bassa, fatta eccezione per la Pezzata Rossa. Tali differenze fra razze possono essere spiegate dalla loro diversa struttura genetica e storia selettiva oltre che dalle dimensioni del campione. I valori ottenuti sono inferiori a quelli riportati in letteratura (Hayes et al., 2009; VanRaden et al., 2009), ottenuti però su campioni di dimensioni nettamente superiori (di un fattore 8-10 per quanto riguarda gli studi condotti in nord America). Se il campione viene invece ordinato casualmente, le accuratezze aumentano decisamente (tab. 3).

Tali risultati sono sovrapponibili a dati già presenti in letteratura, ottenuti su campioni di animali anche di dimensioni maggior di quelli ottenuti nella presente ricerca e ordinati casualmente.

	PC-BLUP			R-BLUP		
	ANNO			ANNO		
CARATTERE	70/30	80/20	90/10	70/30	80/20	90/10
ACCRESIMENTO	0.38	0.35	0.53	0.39	0.41	0.58
TAGLIA	0.44	0.47	0.54	0.44	0.46	0.58
MUSCOLOSITÀ	0.71	0.67	0.80	0.72	0.69	0.74
ARTI E PIEDI	0.72	0.74	0.85	0.67	0.68	0.68
IGT CARNE	0.63	0.57	0.74	0.66	0.64	0.71
FACILITÀ PARTO DIRETTO	0.23	0.23	0.24	0.12	0.16	0.22
MUSCOLOSITÀ VACCHE	0.8	0.85	0.83	0.78	0.80	0.78
ACCRESIMENTO		0.35	0.53	0.39	0.41	0.58
	PC-BLUP			R-BLUP		
	RANDOM			RANDOM		
TRAIN/PRED	70/30	80/20	90/10	70/30	80/20	90/10
ACCRESIMENTO	0.47	0.37	0.63	0.32	0.39	0.46
TAGLIA	0.49	0.47	0.47	0.37	0.51	0.43
MUSCOLOSITÀ	0.71	0.70	0.79	0.70	0.70	0.73
ARTI E PIEDI	0.76	0.77	0.83	0.65	0.65	0.66
IGT CARNE	0.63	0.60	0.77	0.58	0.64	0.65
FACILITÀ PARTO DIRETTO	0.34	0.26	0.29	0.19	0.16	
MUSCOLOSITÀ VACCHE	0.82	0.84	0.82	0.79	0.80	0.79
ACCRESIMENTO	0.47	0.37	0.63	0.32	0.39	0.46

Tab. 4 Accuratezze dei DGV nella razza Pezzata Rossa italiana per i caratteri della produzione della carne

	PC-BLUP			R-BLUP		
	ANNO			ANNO		
CARATTERE	70	80	90	70	80	90
PARTO DIRETTO	0.39	0.45	0.35	0.33	0.44	0.38
PARTO MATERNO	0.75	0.83	0.69	0.74	0.79	0.66
	PC-BLUP			R-BLUP		
	RANDOM			RANDOM		
TRAIN/PRED	70	80	90	70	80	90
PARTO DIRETTO	0.39	0.37	0.44	0.34	0.32	0.41
PARTO MATERNO	0.81	0.82	0.68	0.77	0.77	0.60

Tab. 5 Accuratezza dei DGV per la facilità di parto nella razza Piemontese

Per quanto riguarda i caratteri della produzione della carne, la tabella 4 riporta le accuratezze ottenute per la Pezzata Rossa, confrontando i due approcci metodologici e i due criteri di ordinamento degli animali. Alcuni caratteri, come la muscolosità e arti e piedi, mostrano delle accuratezze molto elevate, che rimangono costanti nei due approcci e anche per diversi criteri

di ordinamento degli animali. Le accuratèzze minori si sono registrate per la facilità di parto delle vacche. Tale risultato è stato confermato anche sulla razza Piemontese (tab. 5), mentre invece risulta molto elevata l'accuratezza della facilità di parto materno. Tale risultato deve essere ulteriormente indagato.

I risultati ottenuti nello sviluppo della linea di ricerca sulla selezione genomica nel progetto Selmol sono di particolare interesse nella prospettiva dell'applicazione di questa strategia selettiva nella razze bovine allevate in Italia. Il metodo delle PCA è risultato efficace nel ridurre il numero di predittori per il calcolo dei valori genetici genomici degli animali con accuratèzze pressoché simile quelle ottenuto con tutti i marcatori ma con una velocità di calcolo enormemente superiore.

#### BIBLIOGRAFIA

- MEUWISSEN TH, HAYES BJ, GODDARD ME. *Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps*, «Genetics», 157 (4), pp.1819-29.
- MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., STERI R., NICOLAZZI E.L., DIMAURO C., PIERAMATI C., CAPPIO-BORLINO A. *Using eigenvalues as variance priors in the prediction of genomic breeding values by principal component analysis*, «Journal of Dairy Science», 93, pp. 2765-2774.
- VANRADEN PM, VAN TASSELL CP, WIGGANS GR, SONSTEGARD TS, SCHNABEL RD, TAYLOR JF, SCHENKEL FS *Invited review: reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls*, «J Dairy Sci.», 92 (1), pp. 16-24.
- HAYES BJ, BOWMAN PJ, CHAMBERLAIN AC, VERBYLA K, GODDARD ME. *Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations*, «Genet Sel Evol.», 24;41:51.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Corrado Dimauro (Ricercatore)  
Giustino Gaspa (Dottorando)  
Maria Annunziata Pintus (Dottorando)  
Roberto Steri (Dottorando)  
Elia Pintus (Dottorando)

#### PRODOTTI

- Sviluppo di una metodologia multivariata per il calcolo dei valori genetici genomici, scrittura di un software Fortran per l'analisi BLUP

## TRASFERIMENTO

Software per il calcolo dei DGV che può essere utilizzato dalla ANA

## PUBBLICAZIONI

- 1) GASPA G., PERINI D., MARINO R., MAZZA R., SORBOLINI S., STERI R. (2009): *Multi-variate meta analysis of QTL mapping studies*, «Italian Journal of Animal Science», Vol. 8 (Suppl. 2), p. 208.
- 2) MACCIOTTA N.P.P., GASPA G. (2009): *Use of principal component and factor analysis to reduce the number of independent variables in the prediction of genomic breeding values*, «Italian Journal of Animal Science», Vol. 8 (Suppl. 2), pp. 105-107.
- 3) GASPA G., NICOLAZZI E.L., STERI R., DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2009): *Effect of estimation approach and number of QTLs in accuracies of genomic breeding values for simulated data*, «J. Dairy Sci.», Vol. 92, E-Suppl. 1, p. 315.
- 4) MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., STERI R., PIERAMATI C., CARNIER P., DIMAURO C. (2009): *Pre-selection of most significant SNPs for the estimation of genomic breeding*, «BMC Proceedings», 3 (Suppl 1):S14.
- 5) MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., STERI R., NICOLAZZI E.L., DIMAURO C., PIERAMATI C., CAPPIO-BORLINO A. (2010): *Using eigenvalues as variance priors in the prediction of genomic breeding values by principal component analysis*, «Journal of Dairy Science», 93, pp. 2765-2774
- 6) DIMAURO C., GASPA G., STERI R., SORBOLINI S., PINTUS E., MACCIOTTA N.P.P. (2010): *Use of partial least-square regression to predict SNP when some animals are genotyped with low density marker panels*, Inviato al 2010 annual meeting dell'American Dairy Science Association.
- 7) MACCIOTTA N.P.P., PINTUS M.A., STERI R., PIERAMATI C., NICOLAZZI E.L., SANTUS E., VICARIO D., VAN KAAM J.T., NARDONE A., VALENTINI A., AJMONE-MARSAN P.: *Accuracies of direct genomic breeding values estimated in dairy cattle with a principal component approach*, Inviato al 2010 annual meeting dell'American Dairy Science Association.
- 8) PINTUS M.A., GASPA G., MACCIOTTA N.P.P., CARNIER P., NICOLAZZI E.L., DIMAURO C., VICARIO D., AJMONE-MARSAN P., NARDONE A. (2010): *Use of principal component approach to predict direct genomic breeding values for meat traits in Italian Simmental Bulls*, Inviato al 2010 annual meeting dell'American Society of Animal Science.

CAMILLO PIERAMATI\*

## Utilizzo informazioni da panel 54k SNP\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Negli ultimi anni le ricerche sul determinismo dei caratteri quantitativi, in genere basate sull'approccio del gene-candidato o sulla mappatura mediante marcatori, hanno ricevuto un nuovo impulso dalla disponibilità di grandi panel di SNP (Single-Nucleotide Polymorphism). La notevole quantità di informazioni ha posto problemi di controllo qualitativo dei dati, di sviluppo di nuove tecniche per il loro uso, di verifica delle ricadute pratiche negli attuali schemi di selezione. Le informazioni fornite dai Chip SNP sono state utilizzate per studi di GWA (Genome-Wide Association) e soprattutto per il calcolo di GEBV (Genomic Estimated Breeding Values), validati attraverso l'analisi di dati simulati; più recentemente, sembra emergere dalla letteratura scientifica la tendenza a incorporare le informazioni di parentela genomica in modelli già consolidati. Obiettivo dell'unità era di sviluppare o adattare software per utilizzare ai fini selettivi le informazioni molecolari ricavate dalle altre unità.

### MATERIALI E METODOLOGIE

L'utilizzo di SW OpenSource è stato privilegiato per un più facile trasferimento dei prodotti alle associazioni allevatori. Sono state sviluppate query in linguaggio SQL per la gestione dei database di 54k SNP panel in RDBMS MySQL in ambito Linux, e programmi in linguaggio Fortran 95 per l'esecu-

\* *Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria*

\*\* *Unità di ricerca Università di Perugia, responsabile scientifico prof. Camillo Pieramati*

zione dei controlli qualitativi e l'utilizzo delle genotipizzazioni SNP, sempre in ambito Linux. I singoli passaggi della procedura di controllo qualitativo, ottimizzati di concerto con altre unità Selmol, hanno portato alla realizzazione di dataset "puliti", messi poi nuovamente a disposizione delle unità di ricerca e utilizzati per valutazioni genetiche con diverse strategie: per alcune di queste ci si è anche avvalsi di software già esistente, liberamente disponibili (ad es. *Plink* di S. Purcell, *GS3* di A. Legarra, *FastPhase* di M. Stevens). A motivo del numero ridotto di genotipizzazioni, la validazione è stata eseguita soprattutto in simulazione e più limitatamente tramite cross-validation.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

La procedura di controllo qualitativo dei dataset di SNPs è riassumibile in tre punti: verifica dei problemi di genotipizzazione, verifica dei problemi genealogici e verifica dei problemi del marcatore. Le ripetizioni introdotte nelle piastre hanno confermato l'ottima precisione della metodica (>99,8%); le coppie padre-figlio sono chiaramente individuabili, così come le coppie di gemelli identici. Per i singoli SNP, la frequenza massima di genotipizzazioni mancanti è stata stabilita al 2,5%, la frequenza minima dell'allele minore al 5% e la probabilità di non equilibrio di Hardy-Weinberg all'1%; sono stati eliminati anche alcuni marcatori con un eccessivo numero di incompatibilità nelle coppie padre-figlio o che non presentavano genotipi eterozigoti, così come alcune piastre con oltre 1000 SNP non genotipizzati. Per gli SNP localizzati sull'eterocromosoma X, o per quelli c.d. "orfani" (la cui posizione nel genoma non è ancora definita), alcuni criteri di validazione sono stati differenti: ad esempio, il genotipo eterozigote non è ovviamente accettabile nei soggetti maschi, e la mancanza dell'eterozigote è stata riscontrata soprattutto a carico di SNP "orfani". In alcuni casi, l'analisi di collinearità ha permesso di ipotizzare la posizione nel genoma di uno SNP "orfano", successivamente confermata anche da aggiornamenti ufficiali della mappa.

In base ai criteri descritti, il dataset "grezzo" della Bruna Italia si è ridotto da 41'850'755 data point a un dataset "pulito" con 27'903'246 data point (66,7%), quello della Frisone Italiana da 48'546'899 a 35'297'563 data point (72,7%), quello della Marchigiana da 12'312'228 a 8'085'420 data point (65,7%), quello della Pezzata Rossa Italiana da 26'622'493 a 19'245'741 data point (72,3%) e infine quello della Piemontese da 20'466'379 a 15'243'592 data point (74,5%).

Per la ricostruzione delle genotipizzazioni mancanti al fine di calcolare i



GEBV è stata provata la ricostruzione degli aplotipi tramite metodi bayesiani, che si è rivelata ancora di non pratica applicabilità, per cui si è optato per la semplice sostituzione con il genotipo più frequente.

La conoscenza dell'effettivo polimorfismo presente nelle razze di studio ha consentito di effettuare simulazioni più rispondenti alla situazione reale rispetto a quanto già reperibile nella letteratura: a seconda della razza e del controllo qualitativo effettuato il livello di accuratezza (correlazione fra GEBV stimati e valori veri simulati) varia fra 64,4% e 72,4%.

Anche una metodologia di analisi molto semplice, quale il BLUP sugli SNP con ripartizione omogenea della varianza fra tutti i marcatori, risolto con il metodo iterativo di Gauss-Seidel o con la decomposizione di Cholesky, per alcuni caratteri si è dimostrata in grado di raggiungere apprezzabili livelli di accuratezza nella stima dei BV: ad esempio, nella Bruna Italia una cross validation con 2/3 di dataset per il training e 1/3 per la prediction ha mostrato correlazioni fra il 76,5% e il 79,4% per gli indici relativi alla produzione di latte, grasso e proteine espressa in kg; per grasso e proteine espressi in percentuale la correlazione è risultata di molto inferiore (40,8% e 49,8% rispettivamente).

In alternativa alla cross validation, resa difficoltosa dalla dimensione ridotta del dataset di ogni singola razza, si è verificata la concordanza delle indicazioni ricavate con metodi differenti: ad esempio, per la razza Marchigiana il primo set di genotipizzazioni è stato analizzato mediante semplici regressori OLS, mediante BLUP sugli SNP o mediante analisi di associazione tramite permutazioni. Solo per due caratteri (accrescimento medio giornaliero e conformazione SEUROP) le tre metodologie hanno portato a identificare come altamente significativi SNP situati nella medesima regione del genoma. L'ampliamento del dataset ha comportato, come atteso, un generale aumento delle significatività, ma non sempre ha confermato anche l'analisi preliminare. Per l'accrescimento medio giornaliero, lo SNP ARS\_BFGL-NG-100042, situato nel BTA26 a 32,7 Mbp, si rivela altamente predittivo: bisogna inoltre sottolineare che la sua posizione è prossima a quella di numerosi QTL segnalati dalla letteratura; alcuni SNP situati nella regione iniziale di BTA2, la stessa dove è posizionato il gene GDF8 – MSTN (miostatina) si sono dimostrati associati sia alla resa che all'ingrassamento: per quest'ultimo carattere, altri SNP associati sembrano presenti nella parte terminale di BTA4.

Il calcolo della parentela genomica è stato confrontato con quello della parentela basata sul file genealogico sia per verificare gli effetti della verifica qualitativa dei dati, sia per ipotizzare la ricaduta pratica nel miglioramento genetico della sostituzione della seconda informazione con la prima. Nella

Marchigiana la correlazione della parentela genomica con la parentela genealogica è risultata del 92,3% per il dataset “grezzo” ed è salita a 93,1% per il dataset “pulito”; il miglioramento è da imputare soprattutto al calcolo delle vere e proprie parentele fra animali diversi, mentre la valutazione della consanguineità rimane problematica, a causa della natura intrinsecamente biallelica degli SNP. Nella stessa razza, mediante simulazioni è stato dimostrato che l’uso di un panel con 8’000÷10’000 SNP sarebbe già sufficiente un’appropriata valutazione della parentela genomica, come confermato anche dalla letteratura. Anche nel Maremmano, utilizzando un dataset “pulito” da 51’205 SNP ricavato da BeadChip 54k SNP e validato mediante la mappatura del gene ASIP, tramite confronti simulati fra la parentela calcolata sull’informazione genealogica e quella genomica il numero di SNP sufficienti è stato individuato fra gli 8’000 e i 10’000; a seconda del carattere stimato, la correlazione sui ranghi fra gli indici stimati mediante “multiple-trait” Animal Model BLUP con la parentela genealogica e quelli stimati mediante analogo modello, ma con la parentela genomica, varia dal 94,3% al 99,3%.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Andrea Giontella (Dottorando)  
 Valeria Castro (Borsista)  
 Valentina Francioni (Borsista)  
 Danilo Scaramuccia (Borsista)

#### PRODOTTI

- Query SQL per la gestione dei database si SNP panel. Programmi Fortran 95 per il controllo qualitativo delle genotipizzazioni mediante SNP panel. Programmi Fortran 95 per l’utilizzo delle informazioni ricavate da genotipizzazioni di SNP.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., STERI R., PIERAMATI C., CARNIER P. e DIMAURO C. (2009): Pre-selection of most significant SNPs for the estimation of genomic breeding values, «BMC Proceedings», 3 (Suppl I):S14.
- 2) CAPOMACCIO S., PIERAMATI C., FELICETTI M., GIONTELLA A., DISTL O., SILVESTRELLI M., CAPPELLI K., CASTRO V., VERINI SUPPLIZI A. (2011): Evaluation of Genetic

Relationship with Equine SNP50 Chip in Maremmano Breed, Plant and Animal Genome XIX Conference, San Diego (CA, USA).

- 3) MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., STERI R., NICOLAZZI E.L., DIMAURO C., PIERAMATI C. e CAPPIO BORLINO A. (2011): Using eigenvalues as variance priors in the prediction of Genomic breeding values by principal component analysis, «J. Dairy Sci.», 93, pp. 2765-2774.



NICOLÒ PIETRO PAOLO MACCIOTTA\*

## Elaborazione modelli per analisi dati di espressione genica\*\*

### INTRODUZIONE

La tecnologia microarray permette di ottenere una misura quantitativa dei livelli di espressione per decine di migliaia di geni in una specie e di valutare simultaneamente le interazioni tra geni di uno stesso genoma. L'elaborazione statistica dei dati generati da esperimenti di microarray presenta diversi problemi, primo fra tutti la necessità di correggere i dati dagli effetti dovuti ai processi di manipolazione dell'array, preparazione e ibridazione del campione e quantificazione delle intensità degli spot. Gli obiettivi di questo lavoro sono stati: indagine sulle principali fonti di variazione dei dati generati in un esperimento di microarray; ricerca di tecniche matematico-statistiche per il controllo delle fonti di variazione; sviluppo di procedura completa per l'analisi di dati di microarray simulati per testare e scegliere le tecniche statistiche più adatte; analisi completa di dati microarray generati in un esperimento reale.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Per il primo esperimento è stato utilizzato un dataset creato per l'EADGENE microarray data analysis workshop (De Koning et al.2007) in cui sono stati simulati due casi trattamento-controllo (A e B) utilizzando 10 microarrays ibridizzati con due colorazioni differenti Cy3 e Cy5. Ogni array conteneva 2400 geni in spot duplicati. Nella seconda analisi sono stati utilizzati i dati di

\* *Università di Sassari, Dipartimento di Scienze Zootecniche*

\*\* *Unità di ricerca Università di Sassari, responsabile scientifico prof. Nicolò Pietro Paolo Macciotta*

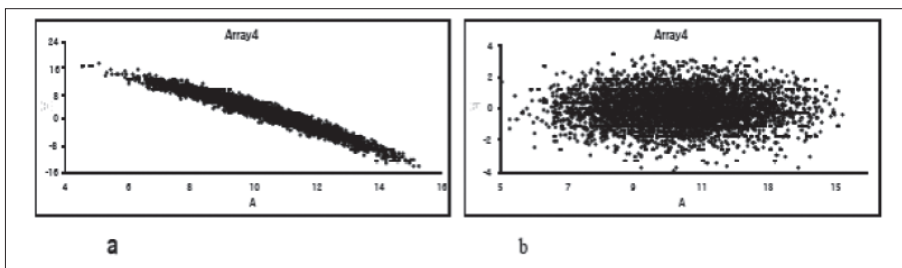


Fig 1

un esperimento che aveva lo scopo di evidenziare geni coinvolti nella risposta della ghiandola mammaria in vacche da latte in lattazione alla somministrazione di somatotropina (bST) (Dimauro et al. 2009). L'esperimento è stato condotto utilizzando 16 microarrays ad alta densità ibridizzati con RNA di bovine provenienti dal National Bovine Functional Genomics Consortium (Suchyta et al., 2003). L'RNA è stato estratto da campioni di tessuto mammario prelevati da 4 frisone in lattazione in 4 tempi diversi: 5 e 2 giorni prima, 1 e 6 giorni dopo la somministrazione della somatotropina.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

### *Archivio simulato*

Allo scopo di rendere la distribuzione di frequenza delle intensità di luminosità, direttamente correlate al livello di espressione genica, prossima alla normale, è stata condotta la normalizzazione dei dati con trasformazione logaritmica in base 2 e, successivamente, mediante la creazione di due nuove variabili ottenute dalla differenza (M) e dalla media (A) delle intensità log corrette dei due canali:  $M = \log R/G = \log R - \log G$ ;  $A = \log \sqrt{RG} = 1/2(\log R + \log G)$ .

Lo sbilanciamento tra le intensità dei due canali, dovuta alla differente efficienza di fluorescenza tra Cy3 e Cy5, è stata rimossa utilizzando la LOcally WEighted Scatterplot Smoothing regression (LOWESS) che è una regressione locale pesata effettuata su intervalli successivi dei dati, nel presente lavoro i valori previsti della regressione di M su A sono stati sottratti ai valori osservati di M in modo da ottenere intensità di fluorescenza ripulite dall'errore sistematico dovuto all'intensità del colore. (In figura 1 sono riportati i plot di M – A di un array prima (a) e dopo (b) l'applicazione della LOWESS).

Allo scopo di correggere i dati per l'errore dovuto all'effetto del colore dell'array è stato applicato un disegno di tipo dye-swap che consiste nell'ibridazione di due array con la stessa coppia di campioni ma invertendo i coloranti (nel primo array il Cy3 viene assegnato al trattamento e il Cy5 al controllo, mentre nel secondo array le colorazioni vengono invertite). La correzione è stata effettuata utilizzando un modello lineare ANOVA:

$$y = \mu + D + A + (AD) + \varepsilon$$

dove  $y$  è l'intensità di fluorescenza ottenuta in seguito alla precedente normalizzazione,  $\mu$  è la media generale,  $D$  è l'effetto fisso del colore,  $A$  è l'effetto fisso dell'array,  $AD$  è l'effetto dell'interazione colore\*array ed  $\varepsilon$  è il residuo (variazione della  $y$  non spiegata dai fattori colore e array).

I residui di questo modello sono stati utilizzati per la fase successiva di individuazione dei geni differenzialmente espressi. A tale scopo è stato utilizzato il seguente modello lineare:

$$\text{res}_{ij} = \mu + S_j + \varepsilon_{ij}$$

dove  $\text{res}_{ij}$  è il valore dell'intensità normalizzata dell' $i^{\text{th}}$  gene e del  $j^{\text{th}}$  trattamento,  $\mu$  è la media generale,  $S_j$  è l'effetto fisso del trattamento ed  $\varepsilon_{ij}$  è il residuo del modello.

Uno dei principali problemi che riguardano la tecnica dell'analisi dei microarray è costituito dalla corretta individuazione della soglia di significatività del test statistico. Per controllare il verificarsi di significatività spurie che solitamente si hanno nei confronti multipli, è stato utilizzato un approccio basato sul test di permutazione. Le tecniche utilizzate nel presente lavoro hanno consentito di individuare 654 geni con differente livello di espressione tra trattamento e controllo, 621 di questi sono risultati coincidenti con i 624 geni realmente differenzialmente espressi dell'archivio simulato per il EADGENE workshop.

### *Analisi statistica dei dati reali (bST)*

Lavorando con dati reali, nel secondo esperimento è stato necessario eseguire un controllo di qualità degli spot, assumendo la correlazione tra la media e la mediana dell'intensità di fluorescenza dei pixel di uno stesso spot come indice di qualità degli spot stessi (Tran et al., 2002); l'eliminazione degli spot con rapporto tra media e mediana  $< 0.8$  ha consentito di aumentare la correlazione tra media e mediana da 85.3% e 94.5% per i due canali rispettivamente, a 99.6 per entrambi.

La media e la mediana dell'intensità di fluorescenza sono state analizzate separatamente utilizzando la stessa procedura in modo da poter comparare i risultati.

Time points	Expressed genes		
	Median intensity	Mean intensity	Median and mean intensity (top expressed genes)
-5 vs. 1	496	464	129
-5 vs. 6	968	979	282

Tab. 1

Come nel caso dei dati simulati, anche per i dati reali la normalizzazione delle intensità di fluorescenza è stata ottenuta applicando la trasformazione logaritmica e la regressione locale di  $M$  su  $A$  per la correzione dello sbilanciamento tra le intensità dei due canali e il modello lineare ANOVA per la correzione degli effetti colore e array.

La ricerca dei geni con differente livello di espressione nelle diverse fasi sperimentali (-5, -2, 1 e 6 giorni) è stata condotta, pertanto, utilizzando come dati normalizzati i residui del modello lineare.

L'obiettivo dell'esperimento era quello di individuare geni differenzialmente espressi in tempi vicini alla somministrazione di bST (1 giorno) e in tempi più lunghi (6 giorni), quindi i punti temporali -5 e 1, -5 e 6 sono stati utilizzati per studiare la differente espressione genica nel breve e nel lungo periodo rispettivamente. In questo caso, per valutare la differenza di espressione dei singoli geni nei due punti temporali prescelti e per testare la significatività statistica di tale differenza, i dati normalizzati sono stati analizzati con un modello lineare misto:

$$\text{res}_{ijk} = \mu + T_i + D_j + A_k + \varepsilon_{ijk}$$

dove  $\text{res}_{ijk}$  è l'intensità corretta,  $T_i$  è l'effetto fisso dell' $i^{\text{th}}$  punto temporale,  $D_j$  è l'effetto fisso del  $j^{\text{th}}$  colore,  $A_k$  è l'effetto random del  $k^{\text{th}}$  array e  $\varepsilon_{ijk}$  è il residuo.

La significatività statistica della differenza del livello di espressione dei geni nei differenti punti temporali è stata corretta applicando il test delle permutazioni.

La tabella n riporta il numero di geni differenzialmente espressi nel breve e nel lungo periodo utilizzando la media e la mediana dell'intensità e il numero di geni individuati da entrambe le analisi.

L'individuazione dei geni attivi in un determinato stato fisiologico può essere seguita dallo studio e individuazione di gruppi di geni che si esprimono con pattern simili. tale analisi risulta di fondamentale importanza per lo studio delle vie biochimiche coinvolte nel fenomeno oggetto di studio. A tale scopo i geni differenzialmente espressi individuati sono stati analizzati utilizzando un cluster di tipo gerarchico. La figura 2 riporta il dendrogramma ottenuto utilizzando i



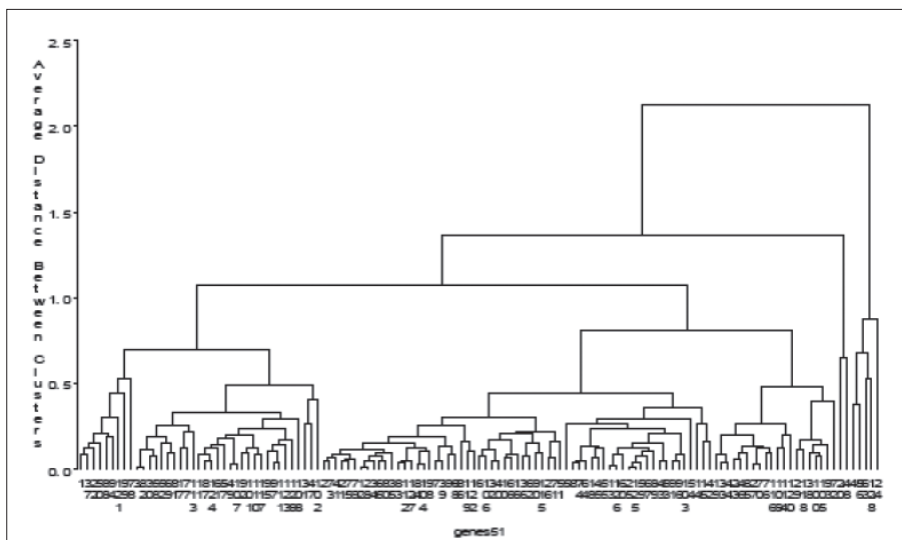


Fig. 2

geni del periodo temporale -5 vs. 1 e la media delle intensità. In questo caso non è possibile delineare in modo chiaro gruppi di geni nettamente separati, tuttavia le indicazioni fornite possono essere utilizzate per aumentare le conoscenze su fenomeni biologici e biochimici di elevata complessità.

#### BIBLIOGRAFIA

DIMAURO C., DIAS FRANCESCONI A.H., CAPPIO-BORLINO A., MCGUIRE M.A. *Microarray data analysis of gene expression levels in lactating cows treated with bovine somatotropin*, «Italian Journal of Animal Science», Vol. 8 (Suppl. 2), pp. 78-80.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Corrado Dimauro (Ricercatore)  
 Giustino Gaspa (Dottorando)  
 Maria Annunziata Pintus (Dottorando)  
 Roberto Steri (Dottorando)  
 Elia Pintus (Dottorando)

#### PRODOTTI

- Sviluppo di una procedura per l'analisi dei dati di espressione genica.

#### TRASFERIMENTO

Listato SAS che può essere nesso a disposizione di chi analizza dati di espressione genica.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) DIMAURO C., DIAS FRANCESCONI A.H., CAPPIO-BORLINO A., MCGUIRE M.A. (2009): *Microarray data analysis of gene expression levels in lactating cows treated with bovine somatotropin*, «Italian Journal of Animal Science», Vol. 8 (Suppl. 2), pp. 78-80.
- 2) DIMAURO C., MACCIOTTA N.P.P. (2010): *A tutorial for microarray data analysis with SAS-STAT software*, «Current Bioinformatics», 5 (2), pp. 89-108.

## Sviluppo di software in grado di produrre stime degli effetti dei segmenti cromosomici in modo efficiente grazie alla parallelizzazione dell'algoritmo\*\*

Studi recenti hanno permesso l'identificazione di migliaia di polimorfismi "single-nucleotide" (SNP), distribuiti nel genoma in modo regolare. Tali conoscenze hanno condotto alla proposta di metodologie innovative denominate selezione genomica. Nella selezione genomica, il merito genetico di candidati riproduttori è determinato utilizzando stime degli effetti di segmenti cromosomici delimitati da SNP adiacenti e originati dal disequilibrio di linkage fra i markers e geni localizzati nel segmento. L'obiettivo dell'unità di ricerca è stato quello di ottenere, per la razza Piemontese e per il carattere "difficoltà di parto", stime degli effetti dei segmenti cromosomici, definiti dall'analisi del genoma di tori con chip Illumina 54K, e di valutare l'accuratezza dei genomic breeding values (GEBV) derivati da tali stime. Obiettivo parallelo è stato lo sviluppo di software in grado di produrre le stime in modo efficiente grazie alla parallelizzazione dell'algoritmo.

### MATERIALE E METODOLOGIE

La stima degli effetti dei segmenti cromosomici è stata effettuata con metodologia BLUP utilizzando i dati relativi all'analisi del genoma con chip Illumina 54K di 312 tori Piemontesi, nati tra il 1980 e il 2005, e le stime del valore riproduttivo dei medesimi soggetti per il carattere "difficoltà di parto diretta pluripara". I valori riproduttivi dei tori erano caratterizzati da un'attendibilità media pari a 84% e superiore al 64%.

\* Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Scienze Animali

\*\* Unità di ricerca Università di Padova, responsabile scientifico prof. Paolo Carnier

## RISULTATI E CONCLUSIONI

*Caratteristiche del software sviluppato*

Il software sviluppato (solvemm) permette di stimare gli effetti di  $N$  segmenti cromosomici utilizzando stime del valore riproduttivo o dati fenotipici precorretti mediante procedure BLUP. Il programma solvemm sfrutta le routine Blas e Lapack (<http://www.netlib.org/blas/>, <http://www.netlib.org/lapack/>) per il calcolo vettoriale e matriciale. In particolare, è stata usata l'implementazione specifica ATLAS per architettura Opteron (<http://math-atlas.sourceforge.net/>), che permette a solvemm di sfruttare simultaneamente la potenza di calcolo di tutte i core disponibili (8 cpu AMD Opteron 8220 per un totale di 16 core nel caso della macchina utilizzata nello studio), sia nella fase di costruzione delle equazioni del modello misto, che nella fase di risoluzione del risultante sistema lineare. Il programma è in grado di risolvere il problema in un tempo che è, approssimativamente, inversamente proporzionale al numero di core impiegati. L'analisi è guidata da un file di input in cui vengono specificati: il n. di segmenti cromosomici di cui stimare gli effetti, il numero di animali, nome del file di dati e del file di risultati, valore del rapporto tra varianza residua e varianza degli effetti. Sono state usate le routine Blas in singola precisione sdot, sgemv, sgemm, saxpy (documentazione reperibile su <http://www.netlib.org/blas/> <nome\_routine>.f), e la routine Lapack in singola precisione sgesv (<http://www.netlib.org/lapack/single/sgesv.f>) per la risoluzione delle equazioni mediante decomposizione LU. Il programma è stato sviluppato in linguaggio C/C++ ed è composto da due classi wrapper per i tipi vettore e matrice. Una terza classe (mixedmodel) si occupa di contenere le strutture dati necessarie all'elaborazione (matrice del disegno e vettore dei fenotipi/ebv). Il caricamento dei dati avviene con un metodo della classe mixedmodel, da un file di testo contenente le variabili: identificativo animale (intero, da 1 a numero totale di individui), identificativo SNP (intero, da 1 a numero SNP), numero di copie dell'allele alternativo a quello di riferimento per il locus (intero, da 0 a 2), fenotipo o EBV dell'animale (virgola mobile). Il metodo "generateEquations", con una serie di chiamate alle routine Blas, risolve il sistema di equazioni del modello lineare. Il vettore delle soluzioni viene salvato in un file di testo. I tempi approssimativi registrati per la soluzione di un sistema di equazioni di dimensione 41878 (numero di segmenti cromosomici per analisi dei tori Piemontesi) sull'hardware dedicato (8 cpu AMD Dual Opteron 8220, per un totale di 16 core) sono stati di 70 minuti con

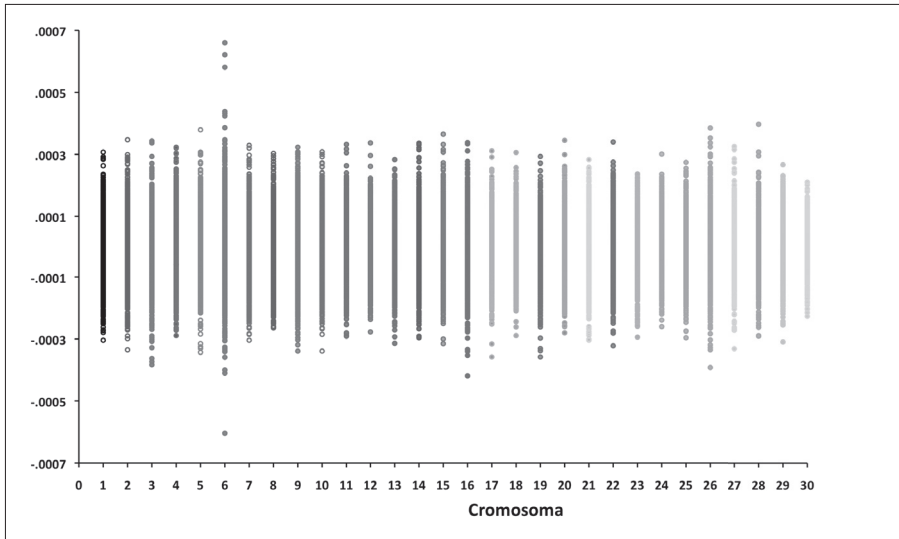


Fig. 1 *Rappresentazione grafica degli effetti dei segmenti cromosomici stimati (il cromosoma 30 è il cromosoma X)*

un solo core, e di 6 minuti nell'analisi multithreaded. Sia eseguito a singolo core che multithreaded, il programma ha richiesto circa 6 GB di RAM.

### *Stima effetti segmenti cromosomici*

Preliminarmente alla stima degli effetti dei segmenti cromosomici, i dati genomici sono stati sottoposti a editing per l'ottenimento di un dataset ripulito in seguito a eliminazione di animali o SNP caratterizzati da insufficienze nella ripetibilità della genotipizzazione, discendenza non mendeliana, genotipi mancanti, SNP con "minor allele frequency", condizioni di non equilibrio di Hardy-Weimberg e anomalie nella frequenza dei genotipi. Il dataset ottenuto conteneva i genotipi di 312 tori per 41878 SNP. La stima degli effetti dei segmenti cromosomici è stata effettuata inizialmente utilizzando i dati di tutti i tori. La rappresentazione grafica degli effetti stimati, per ciascun cromosoma, è riportata nella figura 1.

Come atteso, per tutti i cromosomi, l'effetto medio degli SNP è risultato pari a zero. Alcuni cromosomi hanno evidenziato deviazioni significative della variabilità degli effetti stimati rispetto a quella dei rimanenti cromosomi. In particolare BTA6 e BTA26 hanno evidenziato una deviazione standard degli effetti stimati degli SNP superiore del 22 e 13%, ri-

spettivamente, a quella della rimanente parte del genoma, mentre BTA18 è risultato il cromosoma con la minor variabilità degli effetti stimati (-11%). Tali evidenze indicano che su BTA6 e BTA26 sono localizzati loci con gli effetti quantitativamente più rilevanti per il carattere “difficoltà di parto diretto pluripara”.

### *Accuratezza dei GEBV*

La valutazione del grado di accuratezza dei GEBV è stata ottenuta seguendo due diversi approcci. Nel primo caso, dai dati disponibili sono stati estratti casualmente quelli relativi a 200 tori e utilizzati per la stima degli effetti dei segmenti cromosomici. Le stime così ottenute sono state utilizzate per stimare i GEBV dei rimanenti 112 tori. Questa procedura è stata ripetuta 3 volte. Nel secondo approccio, gli effetti dei segmenti cromosomici sono stati stimati utilizzando i dati dei 200 tori più vecchi (nati tra il 1980 e il 2001) e i GEBV sono stati calcolati per i 112 tori più giovani (nati tra il 2001 e il 2005). In entrambi i casi, l'accuratezza dei GEBV è stata valutata considerando la correlazione tra GEBV e valore riproduttivo (EBV) del toro per “la difficoltà di parto diretta pluripara”. La correlazione tra GEBV ed EBV è risultata pari a 0.533 ( $P < 0.01$ ; media di 3 ripetizioni) nel caso di campionamento casuale. Nel caso di campionamento basato su anno di nascita, la correlazione è risultata sensibilmente più bassa raggiungendo valori pari a 0.312 ( $P < 0.01$ ). La correlazione tra GEBV ed EBV era risultata più elevata (approssimativamente 0.8) nel caso di analisi che l'unità operativa aveva condotto per tori di razza Bruna e Pezzata Rossa Italiana per il carattere “produzione di proteina” con campionamento random dei soggetti per la stima degli effetti dei markers. Anche in quel caso, il campionamento basato sull'anno di nascita dei tori aveva prodotto accuratezze più basse. I risultati ottenuti confermano le difficoltà insite nella stima del merito genetico di candidati riproduttori, anche nel caso di indici genomici, per caratteri funzionali come le difficoltà di parto. Ulteriori approfondimenti, relativi alla comparazione tra EBV e GEBV nei riguardi della capacità predittiva dei fenotipi per la difficoltà di parto, sono necessari.

COLLABORATORI DELLA RICERCA

Alessio Cecchinato (Ricercatore)

## PRODOTTI

- Software per la stima degli effetti di segmenti cromosomici risultanti dall'analisi con chip Illumina 50K.

## TRASFERIMENTO

Conoscenze trasferibili: procedure di selezione genomica e set di effetti di segmenti cromosomici stimati per la stima di GEBV di nuovi riproduttori fruibile da Associazione Nazionale degli Allevatori.

## BREVETTI

Nessuno.

## PUBBLICAZIONI

- 1) MACCIOTTA N.P.P., GASPA G., STERI R., PIERAMATI C., CARNIER P., DIMAURO C. (2009): *Pre-selection of most significant SNPS for the estimation of genomic breeding values*, «BMC Proceedings», 3 (Suppl 1), S14 <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/3/S1/S14>.





GUSTAVO GANDINI\*

## Identificazione e confronto di schemi selettivi per razze locali bovine e ovi-caprine italiane con controllo della consanguineità\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Le selezione con indici genetici è raramente usata nelle razze locali di poche centinaia/migliaia di femmine, in quanto accelera deriva genetica e consanguineità e può avere costi elevati. D'altra parte il miglioramento genetico può aumentare la redditività di razza, stimolare l'interesse degli allevatori e allontanare rischi di estinzione (Gandini e Oldenbroek). Da alcuni anni sono disponibili algoritmi per selezionare con controllo della consanguineità (Meuwissen, 1994), benché a oggi questi siano stati valutati solo in schemi relativamente semplici. L'obiettivo dell'Unità di Ricerca era identificare e confrontare schemi selettivi per razze locali bovine e ovi-caprine italiane con controllo della consanguineità. Obiettivi paralleli, lo sviluppo di un software per individuare il migliore schema di selezione in razze di qualche centinaia/migliaia di femmine, e di un software per selezionare gruppi di animali, con controllo della parentela, utilizzando indici tradizionali o genomici.

### MATERIALI E METODOLOGIE

È stato sviluppato un software per simulare un ampio spettro di schemi di selezione, in popolazioni bovine e ovi-caprine demograficamente strutturate

\* *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare*

\*\* *Unità di ricerca Università di Milano, responsabile scientifico prof. Gustavo Gandini*

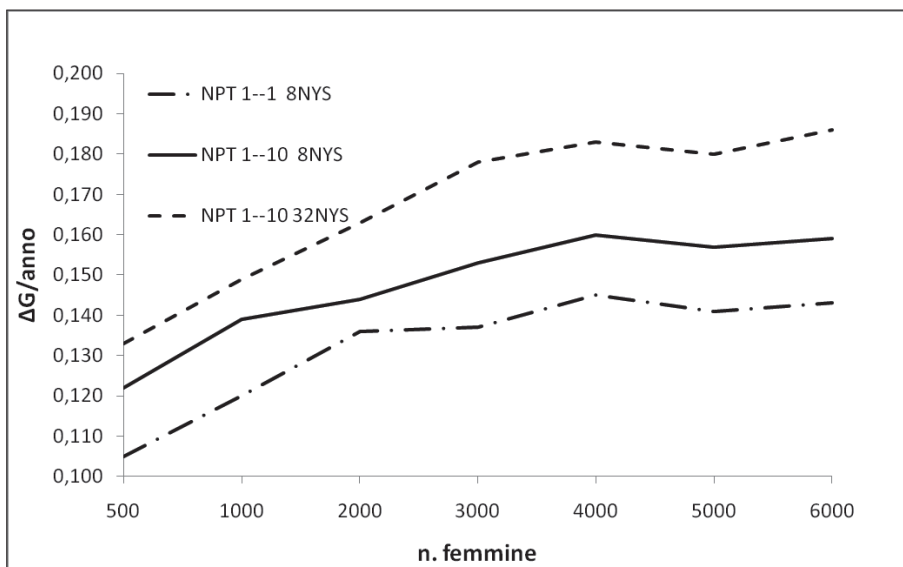


Fig. 1

in classi di età, con controllo della consanguineità. Modello genetico infinitesimale, con selezione sui contributi ottimali (OC) (Meuwissen, 1994), con penalità sulla parentela tra gli animali selezionati, o alternativamente con selezione di troncamento. Selezione per un carattere latte e/o un carattere carne. Selezione su padri (SS) e madri di maschi (DS), e su padri di femmine (SD). Possibilità di variare l'età di utilizzo dei maschi, e di simulare prova di performance e di progenie. Possibilità di minimizzare la parentela di accoppiamento. Possibilità di simulare l'apporto di un nucleo chiuso alla popolazione fuori nucleo. L'uso del software non richiede elevate capacità informatiche. Un secondo software seleziona con metodo OC gruppi di animali in base a dati genealogici e produttivi. Vengono qui presentati alcuni degli schemi analizzati e simulabili.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

La figura 1 illustra la dinamica del progresso genetico per un carattere latte, espresso in unità di deviazioni standard, in funzione del numero delle femmine, del numero dei giovani tori utilizzati (NYS) e del periodo di utilizzo dei padri di toro. Lo schema (NPT) prevede la selezione OC contemporanea di DS e SS, e l'utilizzo di giovani tori (NYS) come padri di vacche per un

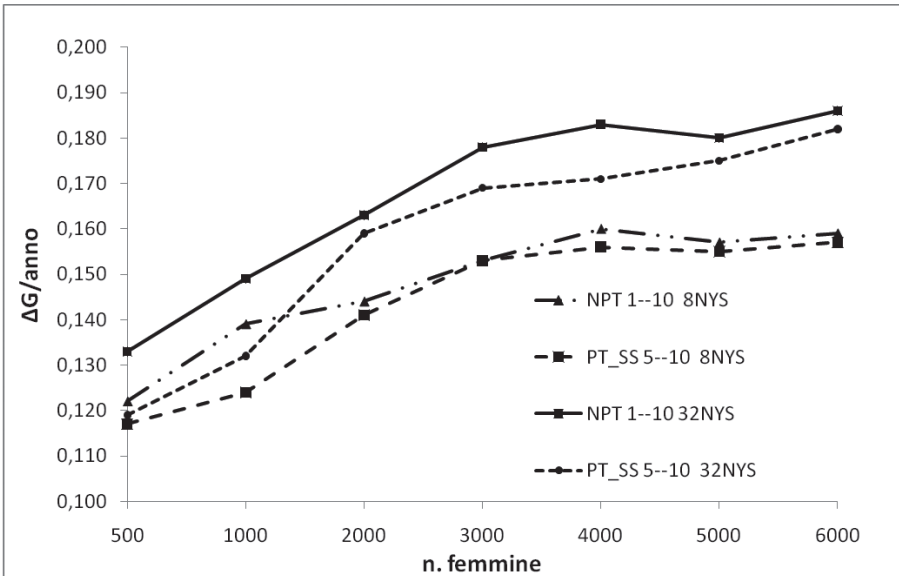


Fig. 2

anno. Questo è lo schema di più semplice applicazione simulato. Il numero di giovani tori dello schema in figura è fissato a 8 o 32, corrispondente a 22 e 88 DS, mentre il numero degli SS varia ed è scelto dal sistema di selezione OC (a titolo di esempio, con 8 NYS varia da 4,8 (500 femmine) a 4,3 (5000 femmine)). Il progresso genetico, a un tasso di consanguineità annuo di 0,3% corrispondente a un tasso generazionale dell'1% circa, aumenta passando da popolazioni di 500 femmine a popolazioni di circa 4000 femmine. A popolazioni di dimensioni superiori gli incrementi sembrano diminuire. Il progresso genetico sale passando da 8 a 32 NYS, a tutte le dimensioni di popolazione simulate. L'età media delle madri di vacche è di 4,5 anni, mentre quella delle DS è leggermente superiore. Gli SS sono utilizzati un anno (in figura, schema NPT 1-1) oppure il loro materiale seminale è disponibile per 10 anni (in figura, schema NPT 1-10). In questo secondo caso, che richiede lo stoccaggio di materiale seminale, osserviamo un maggiore progresso genetico, dovuto al fatto che il sistema di selezione OC ha maggiore possibilità di scelta di SS per massimizzare il progresso genetico al tasso di consanguineità prefissato.

È possibile simulare schemi con un periodo di attesa degli SS, dopo essere stati utilizzati come giovani tori (NYS). L'utilizzo degli SS a partire dal quinto anno di età significa aumentare l'accuratezza dei loro indici, rispetto a quelli di pedigree degli NYS, in quanto basati sulle lattazioni delle figlie. Questo schema selettivo mantiene una certa facilità di applicazione in campo. Lo schema

infatti prevede solamente una banca del seme, e non richiede la creazione di un gruppo di femmine dedicate alla prova di progenie. Nella figura accanto si confronta lo schema NPT (con uso degli SS per un massimo di 10 anni) con lo schema che prevede l'utilizzo degli SS a partire dal quinto anno di età fino a un massimo di 10 anni (in figura, schema PT-SS 5-10), con 8 o 32 NYS. Il tasso di consanguineità è sempre fissato a 0,3% per anno. Osserviamo che a parità di NYS i due schemi si equivalgono in termini di progresso genetico. Stiamo attualmente studiando il comportamento di questi due schemi con un maggior numero di giovani tori e a numerosità di femmine più elevato, dove ci attendiamo una performance migliore dello schema PT-SS-5-10.

Un ulteriore schema simulabile è quello che prevede una prova di progenie non solo per gli SS ma anche per gli SD. In questa sede non si riportano i risultati ottenuti, ma sulla base delle simulazioni fatte possiamo affermare che fino a 6000 femmine questo schema produce progressi genetici annui inferiori ai due precedenti schemi.

Una buona percentuale delle razze bovine locali europee, incluse le italiane, sono allevate per la produzione di latte e di carne, con un'enfasi sui due caratteri che può sensibilmente variare tra razze; la selezione può essere indirizzata a migliorare entrambe le caratteristiche latte e carne, oppure al miglioramento della produzione quali-quantitativa di latte senza perdere le caratteristiche di produzione carne. Il software permette di simulare la selezione dei giovani maschi nati (NYS1) dopo prova di performance, su un indice composto latte-carne, e la selezione delle madri di toro e dei padri di toro ugualmente su indice composto. Gli schemi con prova di performance, rispetto a quelli precedenti basati sulla selezione di SD e SS per un carattere latte, hanno anche la selezione degli YS sul gruppo di candidati (NYS1) dopo la prova di performance. È possibile simulare la selezione OC solo per le SD e SS, con selezione di troncamento quindi degli NYS, oppure alternativamente simulare selezione OC in entrambi i momenti selettivi. Le simulazioni fatte a oggi indicano che se la l'intensità di selezione dopo prova di performance è relativamente bassa (per esempio una percentuale del 50% viene selezionata), per tenere controllato il tasso di consanguineità sull'obiettivo prefissato, la selezione OC può essere applicata solo su DS e SS. Se invece la selezione degli NYS è forte, l'uso della selezione OC anche sugli NYS sembra fornire un migliore progresso genetico a parità di tasso di consanguineità, come si può vedere in tabella 1.

Per quanto riguarda la specie ovi-caprina, il software permette di simulare il progresso genetico a un determinato tasso di consanguineità in un nucleo chiuso e il progresso genetico (modello deterministico) nella popolazione

	SCHEMA SELETTIVO			
		2 OC	OC E TRONCAMENTO	
N. FEMMINE	n. NYS1 / n. NYS	$\Delta G/\text{anno}$	$\Delta G/\text{anno}$	$\Delta F/\text{anno}$
1000	16 / 8	0,139	0,140	0,3
	24 / 8	0,152	0,143	0,3

Tab. 1 *Selezione per duplice attitudine (vedi testo)*

fuori nucleo che riceve periodicamente gli NYS e gli SS che hanno lavorato nel nucleo, oppure alternativamente un gruppo di giovani maschi prodotti in modo specifico per la popolazione fuori nucleo e gli NYS e gli SS dopo che hanno lavorato nel nucleo. La scelta dello schema dipende principalmente dal numero di maschi richiesti dalla popolazione fuori nucleo.

Il software utilizzato per identificare e confrontare schemi di selezione per razze locali a bassa numerosità è stato ulteriormente sviluppato in modo da potere essere utilizzato da tecnici e ricercatori per simulare popolazioni di numerosità specifica e identificare lo schema selettivo migliore per una determinata razza in funzione del progresso genetico ottenibile e della semplicità di implementazione in campo. Ricordiamo che la selezione è simulabile a un tasso di consanguineità annuo prefissato. L'obiettivo di trasferimento è quello di uno strumento per programmare la selezione nelle razze locali. In questa sede, per motivi di spazio, sono stati riportati solamente alcuni risultati che dimostrano le potenzialità di utilizzo del software.

Dal software sopra descritto è stato sviluppato un secondo software che seleziona gli animali tra un gruppo di candidati sulla base di dati genealogici e genetici (indici classici o genomici) dati dall'operatore, minimizzando la parentela tra loro. Sono disponibili diverse opzioni: la selezione OC contemporanea di un gruppo di maschi e di un gruppo di femmine, minimizzando la parentela tra maschi, tra femmine e tra maschi e femmine; la selezione di un gruppo di maschi tra un set di maschi candidati (per esempio dopo prova di performance); la minimizzazione della parentela di accoppiamento tra un gruppo di femmine e di maschi. Questo software potrebbe essere uno strumento per la selezione con controllo della consanguineità anche nelle popolazioni di grandi dimensioni.

#### BIBLIOGRAFIA

- GANDINI G., OLDENBROEK K.: *Utilisation and conservation of farm animal genetic resources*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen.  
 MEUWISSEN T.H.E. (1994): «Anim. Sci.», 75, pp. 934-940.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Alessandra Stella (Ricercatore)  
Marcello Del Corvo (Assegnista)  
Gerhardus Jansen (libero professionista)

#### PRODOTTI

- Software per simulare il progresso genetico con controllo della consanguineità in popolazioni bovine e ovi-caprine demograficamente strutturate.
- Software per selezionare tra un gruppo di candidati un set di animali minimizzando la parentela tra loro e massimizzando l'indice genetico medio.

#### TRASFERIMENTO

Metodologie per introdurre la selezione per il miglioramento genetico nelle razze locali italiane bovine e ovi-caprine.

#### BREVETTI

Nessuno.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) GANDINI G., DEL CORVO M., SPAGNOLI E., JANSEN G., STELLA A. (2009): *Genetic progress and inbreeding control in simulated cattle breeds with low population numbers*, Atti Barcelona, EAAP, 2009.
- 2) GANDINI G., DEL CORVO M., STELLA A. (2010): *Genetic Progress In Simulated Dairy And Dual Purpose Cattle Breeds With Small Population Sizes*, Accettato al World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.

Unità operativa latte altre specie





## Relazione del coordinatore

Obiettivo dell'UO è stato quello di studiare la variabilità di geni che influenzano le caratteristiche quali-quantitative del latte nella specie bufalina, ovina, caprina e asinina e verificare se tale variabilità sia associata a differenze nell'espressione del carattere. Tra i risultati di maggior rilievo si evidenzia per la specie bufalina l'ottimizzazione di protocolli per la separazione delle proteine del latte che ha consentito la loro quantizzazione e caratterizzazione. A livello molecolare per ciascuno dei geni indagati (*CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2*, *CSN3*, *BGL*, *DGAT1*, *SCD*, *LPL*, *ACACA* e *OXT*) sono stati individuati diversi polimorfismi. È stata evidenziata un'associazione significativa tra gli SNP individuati al *locus OXT* e variazioni quantitative del latte di tale specie. Analogamente, per la specie ovina (*DGAT1* e *SCD*) e caprina (*ACACA*, *FASN*, *LPL*, *DGAT1* e *SCD*) sono stati individuati SNP significativamente associati a caratteristiche quali-quantitative del latte di tali specie ed è stato individuato un QTL per il tenore in grasso e proteina nel latte ovino di razza sarda. Inoltre, per la prima volta per la specie asinina è stato realizzata una precisa caratterizzazione delle proteine del latte evidenziando polimorfismi proteici e, in particolare, la presenza di alleli nulli ai *loci CSN1S1* e *BLGII*. A livello molecolare sono state determinate le sequenze genomiche per *CSN2*, *CSN1S1*, *BLGII* e *OXT*, oltre che due forme del gene *CSN1S2* (I e II) e il cDNA parziale del lisozima e per ciascuno di tali geni sono stati individuati diversi polimorfismi. Infine, è stata realizzata una genotipizzazione ai *loci* delle caseine Ca-sensibili di 289 becchi appartenenti a 8 razze allevate in Italia. Al momento possono essere utilizzati per gli schemi di selezione marcatori per il miglioramento quali-quantitativo del latte di bufala, pecora e capra.

\* Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali



LUIGI RAMUNNO\*

## Latte bufalino\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

A tutt'oggi per la specie bufalina sono stati osservati pochi polimorfismi genetici non associati a differenze nell'espressione dei geni. Tale ridotta variabilità, molto probabilmente, è da mettere in relazione ai pochi studi realizzati in tale settore. Tuttavia, analogamente a quanto già realizzato per le altre specie di interesse zootecnico, recentemente si sono moltiplicati gli sforzi per evidenziare marcatori genetici utili per il miglioramento delle prestazioni produttive di tale specie. L'applicazione delle tecniche di biologia molecolare fornisce un contributo essenziale per una rapida ed economica identificazione della "naturale variabilità" genetica di tale specie, in modo tale da accelerare i processi di miglioramento genetico.

Obiettivo dell'UO è stato quello di studiare la variabilità di alcuni geni che influenzano le caratteristiche quali-quantitative del latte e verificare se tale variabilità è associata o responsabile di differenze nell'espressione del carattere.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Il campionamento del materiale biologico (latte e sangue) è stato effettuato in collaborazione con l'ANASB su circa 300 bufale (in terza lattazione e a

\* *Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali*

\*\* *Unità di ricerca Università di Napoli, responsabile scientifico prof. Luigi Ramunno*

una distanza dal parto di circa 120 giorni e delle quali si disponeva dei controlli funzionali e della eiezione del latte). L'analisi della composizione in acidi grassi è stata realizzata su 124 campioni in collaborazione con il prof. R. Romano (UNINA) e dott.ssa M. Palazzo (UNIMOL). Per mezzo di PCR e RT-PCR si è proceduto all'amplificazione rispettivamente del DNA e dei trascritti dei geni *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2*, *CSN3*, *BGL*, *DGAT1*, *SCD*, *LPL*, *ACACA* e *OXT*. I prodotti di RT-PCR sono stati clonati e sequenziati. Per la valutazione delle correlazioni genotipo-fenotipo è stato applicato un modello statistico di tipo lineare misto. La quantizzazione dei trascritti delle caseine di 10 bufale è stata realizzata per mezzo di RealTime PCR, settata previa scelta del miglior gene house-keeping e messa a punto di una curva standard.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

Tra i risultati di maggior rilievo ottenuti dalla presente ricerca si riportano per il *locus CSN1S2* l'individuazione di un allele che si caratterizza per una traversione G→C nel sito donatore di splicing del 7° esone responsabile dello splicing out di tale esone (EMBL FM865618; FM865619; FM865620, FM865621) (Cosenza et al., 2009a) e la cui frequenza su 252 soggetti è risultata pari a 0,15. Sono stati evidenziati altri 5 SNP intronici nelle regioni fiancheggianti il 7° esone e 3 SNP rispettivamente negli esoni 13, 14 e 16, due dei quali missenso [T(Phe<sup>162</sup>)→A(Ile)] e [A(Thp<sup>200</sup>)→G(Ala)]. Al *locus CSN1S1* è stato individuato un nuovo allele che si caratterizza per una transizione missenso al 17° esone responsabile del cambiamento aa Leu<sup>178</sup>→Ser e la cui frequenza su 289 soggetti è risultata pari a 0,34 e 0,66, per i due alleli rispettivamente. Sono stati individuati altri 2 SNP silenti al 19° esone. Per il gene *CSN3* (EMBL AM900443) è stata confermata la presenza di 5 SNP: 3 nella regione promotrice e due esonici, di cui uno missenso (C→T al 377° nt del 4° esone Thr<sup>135</sup>→Ile). La mutazione al promotore A<sup>-305</sup>→C, è stata genotipizzata. La frequenza su 252 animali è risultata per i due alleli 0,55 e 0,45 rispettivamente. L'intero gene *CSN2* (EMBL FN424088) e 1476 nt del promotore (EMBL FM986648) sono stati sequenziati e sono stati evidenziati 2 SNP: uno esonico nella regione 3'UT (G→T al 274° nt del 9° esone, frequenza 0,11), che si localizza a soli 31 bp dal sito di poliadenilazione (EMBL FM946182) e pertanto potrebbe alterare la stabilità dell'mRNA e uno nel 6° introne (G→A) (Cosenza et al., 2009b). Al *locus* della β-lattoglobulina (EMBL FN377869) sono stati evidenziati tre SNP

silenti, rispettivamente negli esoni 1 (C→T), 3 (C→G) e 5 (C→T). È stata genotipizzata solo la mutazione al 5 esone con una frequenza della Citosina al 5° esone pari a 0,22 su 99 campioni.

Per quanto riguarda il gene codificante l'Ossitocina, ormone implicato nei meccanismi di eiezione del latte, sono stati genotipizzati circa 200 animali per tre SNP noti (EMBL AM234538, AM234539): due nel promotore (C<sup>-966</sup>→T frequenza di C=0,45; A<sup>-790</sup>→G A=0,51) e uno missenso al 170° nt del 2° esone [G(Arg<sup>97</sup>)→T(Leu), G=0,55]. Gli stessi individui genotipizzati sono stati sottoposti a monitoraggio funzionale quotidiano per la raccolta della velocità di mungitura e della quantità di latte. Sono stati raccolti circa 44000 record ed è stato sviluppato un modello statistico di tipo lineare misto per la valutazione delle correlazioni genotipo-fenotipo. I tre marcatori risultano strettamente associati e correlati con la quantità di latte.

In merito ai geni candidati per variazioni quali-quantitative del grasso sono stati studiati *DGAT1* (acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1), *SCD* (Stearoyl-CoA Desaturasi), *LPL* (lipoprotein lipase) e *ACACA* (acetyl-coenzyme A carboxylase alpha). Per il locus *DGAT1* sono stati isolati i trascritti del gene e su 274 cloni sono state individuate 6 differenti popolazioni di mRNA. Il sequenziamento dei cloni e del DNA di 10 soggetti ha messo inoltre in evidenza 4 SNP: uno a livello del 11° nt del 13° introne (C→A), due al 16° introne (G→A al 50° nt e G→A al 66° nt) e uno esonico silente (C→T al 69° nt del 13° esone). Per quanto riguarda quest'ultima mutazione sono stati genotipizzati 160 animali (frequenza C=0,39) dei quali si disponeva dei controlli funzionali. Una prima elaborazione realizzata mediante l'analisi della varianza ha messo in evidenza una correlazione positiva ( $p=0,03$ ) tra il genotipo CT *vs* CC e la % di grasso (+ 0,37%).

Per il carattere qualità del grasso è stata determinata la componente acidica del latte, in particolare del contenuto in CLA, su 124 campioni di bufala comparabili per ordine di lattazione e distanza dal parto.

Per il gene *SCD* sono stati sequenziati l'intero cDNA (5083 bp, EMBL AM600640), parte del promotore (593bp, EMBL FM876222) e del gene (13262 bp su circa 16000 bp, EMBL FN395259) e sono stati individuati 6 SNP esonici, 5 intronici e uno nella regione promotrice (A<sup>-461</sup>→C). La presenza della citosina<sup>-461</sup> (frequenza 0,16 su 321 soggetti) potrebbe creare un'estensione del sito consenso del fattore di trascrizione SP1 e, pertanto, è ipotizzabile un aumento dell'attività trascrizionale che potrebbe essere legata a una maggiore funzionalità dell'enzima (Pauciullo et al., 2010). È stata realizzata una genotipizzata su 190 animali per l'unica mutazione esonica individuata (A→G al 107° nt del 3° esone frequenza A:0,43). Per il

*locus ACACA* è stato sequenziato solo il 1° esone evidenziando uno SNP silente (T→C al 34° nt) la cui frequenza su 241 animali è risultata pari 0.33. Attualmente sono in corso le analisi di correlazione tra i diversi marcatori individuati nel corso della ricerca ai diversi *loci* e i caratteri fenotipici presi in esame (% e qualità del grasso, quantità di latte, % di proteina totale e di singola frazione proteica).

È stato infine sviluppato un metodo Real-Time PCR per l'analisi quantitativa dei trascritti delle caseine. La metodica di quantizzazione è stata effettuata su 10 campioni scelti a random nello stesso allevamento. La quantificazione è stata determinata sia in termini di valore assoluto che in termini di valore relativo. Il confronto con i dati fenotipici (quantità delle singole frazioni proteiche determinate dalla UR Feligini) ha consentito di valutare l'efficienza traduzionale (tradotto/trascritto) che risulta maggiore di 2 per i geni *CSN2* e *CSN3*, superiore all'unità per *CSN1S1*, mentre il gene *CSN1S2* mostra l'efficienza traduzionale minore.

Da questi primi risultati emerge l'individuazione di 3 marcatori al *locus OXT* statisticamente associati con la quantità di latte e, pertanto, potrebbero essere inseriti negli schemi di selezione per il miglioramento genetico della bufala.

#### BIBLIOGRAFIA

- COSENZA ET AL. (2009a): «Animal Genetics», 40 (5), p. 791.  
 COSENZA ET AL. (2009b): «Italian Journal of Animal Science», 8, pp. 57-59.  
 PAUCIULLO ET AL. (2010): «Molecular & Cellular Probes», in press.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Gianfranco Cosenza (Ricercatore)  
 Alfredo Pauciullo (Assegnista)  
 Letizia Colimoro (Borsista)  
 Annalisa D'Avino (Borsista)  
 Daniela Gallo (Tecnico)

#### PRODOTTI

- Sequenze geniche, SNP, protocolli di genotipizzazione, efficienza traduzione caseine

## TRASFERIMENTO

Marcatori al *locus* OXT significativamente associati alla quantità di latte prodotta  
 Metodiche molecolari per una rapida identificazione del genotipo degli animali

## BREVETTI

## PUBBLICAZIONI

- 1) COSENZA G., PAUCIULLO A., FELIGINI M., COLETTA A., COLIMORO L., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2009a): *A point mutation in the splice donor site of intron 7 in the  $\alpha_{s2}$ -casein encoding gene of the Mediterranean River buffalo results in an allele-specific exon skipping*, «Animal Genetics», 40 (5), p. 791.
- 2) COSENZA G., FELIGINI M., MANCUSI A., D'AVINO A., COLETTA A., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2009b): *Italian Mediterranean river buffalo CSN2 gene structure and promoter analysis*, «Italian Journal of Animal Science», 8, pp. 57-59.
- 3) PAUCIULLO A., COSENZA G., D'AVINO A., COLIMORO L., NICODEMO D., COLETTA A., FELIGINI M., MARCHITELLI C., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2010): *River buffalo stearoyl CoA desaturase (SCD): molecular cloning, sequence analysis and genetic variability*, «Molecular & Cellular Probes», *in press*.





LUIGI RAMUNNO\*

## Latte asinino\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

Negli ultimi anni il latte di asina è diventato un potenziale surrogato dei formulati per l'infanzia laddove non è disponibile il latte materno e risulta particolarmente adatto nei casi di allergia alle proteine del latte bovino. Tuttavia, studi sugli aspetti quantitativi e qualitativi della produzione di latte di asina sono limitati, se comparati a quelli condotti sul latte di altre specie, quali i ruminanti di interesse zootecnico. Analogamente, quasi del tutto assenti sono le informazioni relative a sequenze geniche e proteiche per tale specie, in particolar modo per le frazioni caseiniche.

Obiettivo dell'UO è stato quello di studiare la variabilità di alcuni geni che influenzano le caratteristiche quali-quantitative del latte di asina finalizzata a studi di associazione.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Il DNA è stato estratto da 118 campioni individuali di sangue ottenuti da asine appartenenti a diverse razze (Ragusana e Martina Franca)/popolazioni locali allevate nell'Italia meridionale). Da campioni individuali di latte di 32 di tali soggetti è stato estratto l'mRNA. Per mezzo di PCR e RT-PCR si è proceduto all'amplificazione rispettivamente del DNA (re-

\* *Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali*

\*\* *Unità di ricerca Università di Napoli, responsabile scientifico prof. Luigi Ramunno*

gioni promotrici) e dei trascritti dei geni *CSN1S2*, *OXT* e *Lyz* codificanti rispettivamente per la caseina  $\alpha_{s2}$ , l'ossitocina e il lisozima. I primer sono stati disegnati utilizzando quale stampo le sequenze disponibili in banca dati per specie filogeneticamente correlate. I prodotti di RT-PCR sono stati clonati e sequenziati. La quantizzazione dei trascritti delle caseine di 8 asine è stata realizzata per mezzo di RealTime PCR. La metodica è stata settata previa scelta del miglior gene house-keeping e messa a punto di una curva standard.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Mediante l'applicazione di tecniche di biologia molecolare (PCR, RT-PCR, clonaggio, sequenziamento) è stato possibile identificare e caratterizzare due forme del gene *CSN1S2*, denominate *CSN1S2* I e *CSN1S2* II e per entrambi sono stati osservati splicing alternativi. Il primo cDNA si estende per un tratto di 1016 bp e si caratterizza per 19 esoni (EMBL no. FM946022) codificanti per una proteina (denominata  $\alpha_{s2}$ -I) di 221 aminoacidi; il secondo, invece, si estende per un tratto di 876 nucleotidi e risulta costituito da 16 esoni (EMBL no. FN298386) che dovrebbe codificare per una proteina (denominata  $\alpha_{s2}$ -II) di 168 aminoacidi della quale, tuttavia, non si ha evidenza sperimentale. Il confronto delle sequenze ottenute ha permesso di evidenziare due SNP al *locus CSN1S2* I, il primo missenso ( $G^{(Ile117)} \rightarrow A^{(Thr)}$  al 119° nt del 12° esone), il secondo silente ( $C \rightarrow T$  al 12° nt del 14° esone). Prendendo in esame soltanto la mutazione di tipo conservativo è stato possibile ipotizzare la presenza di due alleli al *locus CSN1S2* I denominati *CSN1S2* IA (Thr) e *CSN1S2* IB (Ile). Analogamente, l'analisi del gene *CSN1S2* II evidenzia uno SNP intronico:  $A \rightarrow G$  al 197° nt del 1° introne. Per entrambi i geni sono state determinate anche le sequenze promotrici (circa 200 bp) (EMBL no. FM946023).

Allo stesso modo è stata determinata la sequenza relativa al gene codificante per il lisozima, sieroproteina con conclamata attività antibatterica, (dal 1° al 4° esone) e anche a tale *locus* è stato evidenziato uno SNP di tipo missenso:  $G^{Arg} \rightarrow A^{Gln}$  al 133° nt del 2° esone.

Inoltre, l'analisi del gene *OXT*, codificante per l'Ossitocina, ormone ipofisario coinvolto nei meccanismi di eiezione del latte, ha evidenziato due SNP,  $C \rightarrow A$  e  $A \rightarrow G$ , realizzatesi rispettivamente al 144° e 174° nt del 1° introne.

Al fine di quantificare i trascritti dei geni delle caseine e valutare la loro

efficienza traduzionale, è stato, inoltre, sviluppato e applicato un metodo Real-Time PCR. È stata anche determinata, dalla UR Chianese, la composizione percentuale delle diverse frazioni caseiniche di 8 campioni di latte scelti in un unico allevamento. La quantificazione dei trascritti è stata determinata sia in termini di valore assoluto, che in termini di valore relativo. L'analisi ha messo in evidenza, in particolare, che la  $\beta$  è la frazione più trascritta (72,65%) seguita dalla caseina  $\alpha_{s2}$  (13,19%),  $k$  (8,65%) e  $\alpha_{s1}$  (5,51%). Al fine di valutare l'efficienza di traduzione dell'mRNA delle caseine è stato calcolato il rapporto tra l'incidenza percentuale delle frazioni proteiche e quella dei relativi trascritti. Dall'analisi dei risultati emerge che la caseina  $\alpha_{s1}$ , pur essendo la meno trascritta è quella che si caratterizza per una più alta efficienza traduzionale (6,27) seguita dalla  $\beta$  (0,73),  $k$  (0,68) e  $\alpha_{s2}$  (0,48).

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Gianfranco Cosenza (Ricercatore)  
 Alfredo Pauciullo (Assegnista)  
 Letizia Colimoro (Borsista)  
 Annalisa D'Avino (Borsista)

#### PRODOTTI

- Sequenze geniche, SNP.

#### TRASFERIMENTO

I polimorfismi individuati rappresentano i primi esempi di marcatori genetici ai *loci CSN1S2*, *Lyz* e *OXT* per la specie asinina. Tali marcatori potranno essere utilizzati per futuri studi di associazione con caratteri produttivi, analogamente a quanto già realizzato per la specie bufalina. Inoltre, gli stessi possono trovare un utile impiego per l'identificazione degli animali e attribuzione della paternità, per la valutazione delle variabilità entro/tra le popolazioni asinine, per la valutazione della modificazione della struttura genetica della specie asinina come conseguenza dei processi selettivi e dei sistemi di accoppiamento, e per la conservazione delle diverse risorse genetiche.

#### BREVETTI

PUBBLICAZIONI

- 1) COSENZA G., PAUCIULLO A., ANNUNZIATA A.L., RANDO A., CHIANESE L., MARLETTA D., IANNOLINO G., NICODEMO D., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2010): *Identification and characterization of the donkey CSN1S2 I and II cDNAs and polymorphisms detection*, «Italian Journal of Animal Science», *in press*.
- 2) DI GREGORIO P., RANDO A., ZUCCARO A., MARLETTA D., COSENZA G., CHIANESE L., RAMUNNO L. (2010): *DNA sequences of milk protein genes in Equus asinus*, 32nd Conference for the International Society for Animal Genetics, 26-30 Luglio 2010, Edinburgh, Scotland.

LUIGI RAMUNNO\*

## Latte capra\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

La capra rappresenta, tra le specie di interesse zootecnico, un esempio quasi unico di variabilità nell'espressione dei geni *CSN1S1*, *CSN2* e *CSN1S2* che codificano per le caseine calcio-sensibili  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  e  $\alpha_{s2}$ . Per ciascuno di tale *loci* sono stati individuati alleli associati a rilevanti differenze nel livello di espressione influenzanti le caratteristiche fisico-chimiche, tecnologiche e organolettiche del latte. A tutt'oggi sono noti gli eventi molecolari responsabili di tali alleli e sono state messe a punto metodiche molecolari per una corretta genotipizzazione degli individui. Obiettivo del ricerca è stato quello di effettuare un'indagine, per mezzo di metodiche molecolari basate sulla PCR, sulla struttura genetica ai *loci* delle caseine Ca-sensibili di becchi da destinare per FA appartenenti alle razze Camosciata, Saanen, Nicastrese, Aspromontana, Maltese, Grigia, Capestina e Bianca allevate in Italia.

### MATERIALE E METODOLOGIE

L'indagine, frutto della collaborazione con AssoNaPa e delle UR coordinate dalla dott.ssa P. Crepaldi, prof. F. Pilla, prof. A. Rando e prof. L. Ramunno, è stata condotta su un 289 campioni individuali di DNA estratto da pelo

\* Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali

\*\* Unità di ricerca Università di Napoli, responsabile scientifico prof. Luigi Ramunno

di becchi di razza Camosciata (57), Saanen (45), Nicastrese (102), Aspromontana (40), Maltese (8), Grigia (19), Capestrina (9), Bianca (9). Gli alleli *CSN1S1* E, F, N, 01 sono stati evidenziati per mezzo di PCR, PCR-RFLP e AS-PCR (Cosenza et al., 2007), l'allele *CSN2* 01 per mezzo di AS-PCR (Cosenza et al., 2008) e gli alleli *CSN1S2* D e 0 per mezzo di PCR-RFLP (Ramunno et al., 2001).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati dell'indagine hanno evidenziato per le razze Camosciata, Nicastrese, Aspromontana, Maltese, Grigia, Capestrina e Bianca un'alta frequenza di alleli associati a un alto contenuto di caseina  $\alpha_{s1}$  (*CSN1S1* A\*) oltre che di  $\beta$  (*CSN2* A\*) e  $\alpha_{s2}$  (*CSN1S2* A\*) (tab. 1). Fa eccezione la razza Saanen che, di contro si caratterizza per un'alta frequenza di alleli associati a intermedio e basso contenuto di caseina  $\alpha_{s1}$  (*CSN1S1* F + E, 0,760). Assente per tutte le razze l'allele *CSN1S2* D, associato a un contenuto intermedio di caseina  $\alpha_{s2}$  nel latte. Di particolare rilievo sia nella razza Nicastrese che Aspromontana la presenza, sebbene con una bassa frequenza, di alleli "nulli" a ciascuno dei tre *loci* investigati (tab. 1). In generale, fatta eccezione per i *loci* *CSN1S1* e *CSN2* per Camosciata e Saanen, le restanti razze non presentano alleli nulli. Il confronto dei risultati ottenuti con quelli relativi a una indagine condotta da Ramunno et al. (1994) su 4 delle razze investigate (Camosciata, Saanen, Nicastrese e Maltese) consente di valutare come, nel tempo, si sia modificata la frequenza allelica a tali *loci*. In particolare, per la razza Camosciata si osserva una netta inversione rispetto alla situazione attuale nella frequenza di alleli associati ad alto contenuto di caseina  $\alpha_{s1}$  (0,006 *vs* 0,620). Tale tendenza risulta meno accentuata per la razza Saanen per la quale si osserva un relativo aumento della frequenza degli alleli associati ad alto contenuto di caseina  $\alpha_{s1}$ , passando da un valore di 0,063 a 0,200. Per la razza Nicastrese, identificata da Ramunno et al. (2001) come popolazione locale, le frequenze al *locus* *CSN1S1* degli alleli "forti" non appaiono particolarmente variate nel tempo (0,777 *vs* 0,630). Di contro, per quest'ultima razza si osserva una significativa diminuzione della frequenza dell'allele nullo al *locus* *CSN2* (0,103 *vs* 0,020) riconducibile, verosimilmente, all'azione di una selezione naturale contro gli individui omozigoti per tale allele. La variazione nelle frequenze alleliche al *locus* *CSN1S1* nella razza Camosciata potrebbe, invece, esser la diretta conseguenza dell'applicazione della Selezione

RAZZA	N.	CSN1S1				CSN2		CSN1S2	
		A*	E	F	O*	A*	OI	A*	OI
CAMOSCIATA	57	0,62	0,17	0,14	0,07	1,00	0,00	1,00	0,00
SAANEN	45	0,20	0,26	0,50	0,04	0,96	0,02	1,00	0,00
NICASTRESE	102	0,63	0,02	0,34	0,01	0,98	0,02	0,97	0,03
ASPROMONTANA	40	0,67	0,00	0,31	0,02	0,89	0,11	0,92	0,08
MALTESE	8	0,62	0,00	0,38	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
GRIGIA	19	0,60	0,00	0,40	0,00	0,94	0,06	1,00	0,00
CAPESTRINA	9	0,67	0,00	0,33	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
BIANCA	9	0,61	0,00	0,39	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
TOT	289								
<i>CSN1S1</i> A*=A, B1, B2, B3, B4, C, H, L, M; <i>CSN1S1</i> O*= 01, N; <i>CSN2</i> A*= A, A1, B, C, D, E; <i>CSN1S2</i> A*=A, B, C, E, F									

Tab. 1 *Frequenze alleliche al loci CSN1S1, CSN2 e CSN1S2 di becchi di razza Camosciata, Saanen, Nicastrese, Aspromontana, Maltese, Grigia, Capestrina, Bianca.*

Assistita da Geni (GAS) resa possibile grazie all'individuazione verso la fine degli anni 80' di marcatori a tale *locus*.

Infine, tra i risultati meritevoli di attenzione di tale indagine si sottolinea, una preliminare genotipizzazione di becchi di razze minori autoctone quali la Grigia, Capestrina e Bianca. Il numero limitato di soggetti esaminati non consente delle precise valutazioni, tuttavia per i pochi dati disponibili sembrerebbe che la loro struttura genetica ai *loci* delle caseine Calcio sensibili sia comparabile a quella che caratterizza la razza Nicastrese.

L'applicazione delle tecniche di biologia molecolare all'analisi dei geni delle caseine offre la possibilità alle Associazioni degli Allevatori di analizzare ed evidenziare in modo sempre più accurato la variabilità genetica esistente in natura. Pertanto, per mezzo della tipizzazione dei riproduttori a livello di DNA oggi, rispetto al passato, risulta più facile ed economico ottenere gruppi di animali che producono tipi diversi di latte con caratteristiche peculiari in grado di poter soddisfare le diverse richieste del mercato

#### BIBLIOGRAFIA

- COSENZA G. ET AL. (2007): «Anim. Genet.», 38, pp. 655-8.  
 COSENZA G. ET AL. (2008): «Small Rum. Res.», 74, pp. 84-90.  
 RAMUNNO L. ET AL. (1994): «Zoot. Nutr. Anim.», 20, pp. 107-11.  
 RAMUNNO L. ET AL. (2001): «Anim. Genet.», 32, pp. 264-8.

COLLABORATORI DELLA RICERCA

Gianfranco Cosenza (Ricercatore)  
Alfredo Pauciullo (Assegnista)  
Letizia Colimoro (Borsista)  
Annalisa D'Avino (Borsista)  
Daniela Gallo (Tecnico)  
Elisabetta Milanese (Assegnista)  
Letizia Nicoloso (COCOCO)  
Beatrice Coizet (Laureato frequentatore)  
Mariasilvia D'Andrea (Ricercatore a Tempo Determinato)

PRODOTTI

- Genotipo ai *loci* delle caseine Calcio sensibili ( $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_{s2}$ ).

TRASFERIMENTO

Genotipo ai *loci* delle caseine Calcio sensibili di riproduttori maschi delle diverse razze studiate da destinare per FA.

BREVETTI

PUBBLICAZIONI

- 1) RAMUNNO L., COSENZA G., CREPALDI P., PILLA F. (2008): *Biologia molecolare e miglioramento genetico delle caratteristiche quali-quantitative del latte ovi-caprino*, «Large Animal Review», 4, pp. 117-121.
- 2) RAMUNNO L., PAUCIULLO A., RANDO A., CREPALDI P., PILLA F., GALLO D., MURRU S., FRESI P., CAPOGRECO B., DE NARDO F., MASINA P., COSENZA G. (2010): *Struttura genetica ai loci CSN1S1, CSN2 e CSN1S2 di becchi di razza Camosciata delle Alpi, Saanen, Nicastrrese e Aspromontana allevati in Italia*, XIX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C., *in press*.



ANTONELLO CARTA\*

## Verifica di un QTL per la composizione chimica del latte e valutazione del potenziale impatto della selezione assistita da marcatori nella razza ovina Sarda\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

La selezione classica per la qualità chimica del latte ovino è complicata dall'elevato costo delle misure fenotipiche e dall'antagonismo genetico tra quantità e composizione. In un precedente progetto di ricerca nel cromosoma 7 ovino è stato identificato un QTL con effetti sui tenori in grasso e proteina. Obiettivi del progetto sono i) verificare che gli effetti individuati agiscano sui tenori senza una concomitante riduzione della quantità di latte; ii) precisare la localizzazione del QTL iii) verificare la segregazione nella razza Sarda allevata in purezza. Dal punto di vista delle potenziali applicazioni la migliore localizzazione del QTL o addirittura l'identificazione del gene, la verifica che lo stesso sia in segregazione nella razza Sarda e che la sua azione non abbia conseguenze negative sulla quantità di latte potrebbe consentire di avviare programmi di selezione assistiti da marcatori (MAS) o da geni (GAS) anche nella popolazione di pecore Sarde iscritta al Libro Genealogico.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Nello studio sono state utilizzate le seguenti popolazioni: i) 900 pecore back-cross (BC) Sarda per Lacaune (10 famiglie paterne); ii) 800 pecore figlie di 18 arieti di FA

\* *AGRI-Sardegna Settore Genetica e Biotecnologie, Dipartimento per la ricerca nelle produzioni animali*

\*\* *Unità di ricerca AGRIS, responsabile scientifico dott. Antonello Carta*

e di femmine BC (BCD). I fenotipi utilizzati erano gli indici genetici calcolati con una metodologia BLUP multi-carattere e utilizzando tutte le informazioni genealogiche e produttive disponibili. La mappa genetica del cromosoma 7 è stata densificata con ulteriori 12 microsatelliti oltre ai 6 precedenti. Le analisi di identificazione di QTL sono state realizzate oltretutto per quantità latte (QL), grasso (QG), proteina (QP), tenore in grasso (TG) e proteina (TP) anche per due nuove variabili: quantità grasso (QGC) e proteina (QPC) corrette per la quantità di latte al fine di cogliere la capacità di produrre maggiore materia utile caseificabile a parità di quantità latte. È stato utilizzato un approccio interval mapping applicato a un daughter design nel quale sono state cumulate le informazioni delle due popolazioni sperimentali.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

La mappa del cromosoma 7 costruita con il software CRI-MAP 2.4 utilizzando l'intera popolazione e tutti i genotipi disponibili è risultata sovrapponibile a quella della Sheep Best Position Linkage Map Version 4.7 (sex averaged, cM). La lunghezza del segmento analizzato corrispondeva al 78% dell'intero cromosoma (148.4 cM). La distanza media tra marcatori era di  $8.3 \pm 5.7$  cM con il maggior intervallo pari a 23.9 cM.

In una prima analisi sono stati considerati solo i dati della popolazione BC utilizzando la mappa densificata. Tale analisi ha prodotto valori della statistica del test significativi (tab. 1) sia per il TG e TP che per QG e QP corrette per il latte (QGC e QPC rispettivamente).

Il risultato più significativo è stato quello sulla nuova variabile QGC. Il QTL è risultato in segregazione in 5 famiglie in quanto il contributo di queste alla LRT nel punto di più probabile localizzazione è risultato superiore al valore critico di 3.84 ( $= \chi^2_{(1,0.05)}$ ). La sua localizzazione più probabile è a 115.3 cM dall'inizio del cromosoma. L'intervallo al 90% di confidenza, calcolato con 10 000 bootstrapping, copre 56 cM ma il 57% delle localizzazioni cade in un intervallo di 20 cM. Considerando solo i dati relativi alla popolazione BC, nessun risultato significativo è stato ottenuto per i caratteri di quantità (QL, QP o QG) suggerendo che il QTL identificato influenza solo la composizione del latte indipendentemente dalla quantità di latte.

La considerazione anche delle informazioni delle nipoti BCD ha permesso di incrementare il contenuto informativo calcolato del 46% in media (fig. 1). In questa seconda analisi, valori di LRT significativi a livello del cromosoma (P-value < 0.01) sono stati ottenuti nell'intervallo tra 120.5 e 126.5 cM per tutti i caratteri originali legati alla produzione del latte (tab. 1).

CAR	LRT	PVALUE	POS	IF	EFFETTI DI SOSTITUZIONE ALLELICA (RANGE)			
					VALORI GREZZI	UNITÀ DI D.S. FENOTIPICA	UNITÀ DI MEDIA GREZZA	UNITÀ DI D.S. GREZZA
QGc	47.38	.00009	115.3	1-4-6-8-9	0.18-0.43 Kg	0.24-0.59	0.01-0.02	0.03-0.08
QPc	34.44	.006	115.3	1-4-5-6	0.13-0.18 Kg	0.34-0.48	0.01-0.01	0.03-0.04
TG	40.74	.0005	115.3	1-6-8-9	8.38-21.47 %	0.26-0.68	0.01-0.03	0.15-0.38
TP	33.44	.005	117.3	4-5-6	6.64-10.21 %	0.36-0.55	0.01-0.02	0.17-0.27

Tab. 1 Valori del Likelihood ratio test, livello di significatività, famiglie significative, localizzazione e effetti del QTL stimati nell'analisi della sola popolazione BC

CAR	LRT	PVALUE	POS	IF	EFFETTI DI SOSTITUZIONE ALLELICA (RANGE) IN UNITÀ DI D.S FENOTIPICA
QL	37.30	123.5	0.00655	1,5*,8,9*	0.39-1.21
QG	42.38	120.5	0.00132	1*,4,6*	0.41-0.68
QP	36.17	120.5	0.00937	1*,2,9	0.51-0.85
TG	60.30	121.5	>0.00001	1,4,6*,8*,9*	0.35-0.94
TP	48.96	126.5	0.00026	4*,5*,6*,8,9	0.46-0.87

\*Famiglie con LRT >6.64 nell'intervallo tra 120.5 e 126.5 cM

Tab. 2 Valori del Likelihood ratio test, livello di significatività, famiglie significative (IF), localizzazione e range di effetti del QTL stimati includendo nell'analisi le informazioni sulle nipoti BCD

Il QTL più significativo è stato quello identificato su TG, che è risultato in segregazione in 5 famiglie. Due di queste hanno mostrato un valore LRT estremamente significativo, superiore a 18 nel punto di più probabile localizzazione del QTL. Quattro famiglie erano inoltre informative anche per TP. Per tale carattere l'effetto di sostituzione allelica variava tra 0.46 e 0.87 unità di deviazione standard residua (r.s.d.u). In questo caso, anche l'analisi di QL ha prodotto un valore significativo della statistica del test in posizione 120.5 cM. Il QTL che influenza QL è risultato in segregazione in 4 famiglie. I massimi dei valori di LRT per QG e QP erano localizzati nella stessa posizione, con valori di significatività a livello del cromosoma di 0.00132 e 0.0937 rispettivamente e effetti di sostituzione allelica variabili tra 0.41 e 0.85 rsdu.

L'uso di una mappa genetica più densa e l'inclusione delle informazioni genotipiche e dei dati produttivi delle nipoti dei padri F1 ha permesso di confermare l'esistenza di un QTL che influenza i tenori in grasso e proteina del latte ovino sul cromosoma 7. Inoltre tale approccio ha portato a identificare un QTL con effetti sulla quantità di latte, grasso e proteina che non era stato localizzato nella precedente analisi con la mappa meno densa. Nel complesso l'aumento

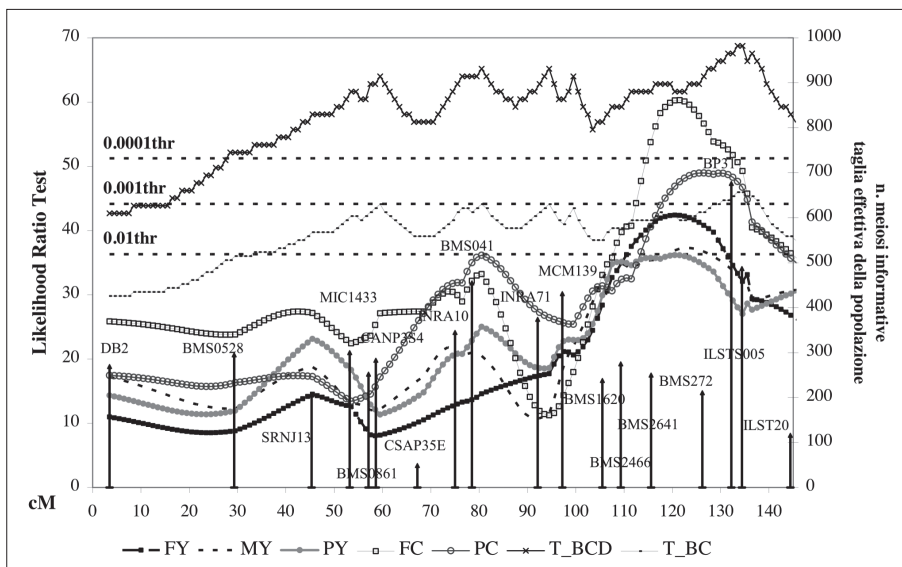


Fig. 1 Mappa del cromosoma 7; profilo del rapporto di massima verosimiglianza (LRT) per quantità di latte (QL), grasso (QG) e proteina (QP), tenore in grasso (TG) e in proteina (TP); *n* di meiosi informative (altezza delle frecce), taglia effettiva della popolazione considerando ( $T_{BCD}$ ) o escludendo ( $T_{BC}$ ) le informazioni molecolari delle nipoti; soglie di significatività a livello del cromosoma ( $Thr$ )

del numero di meiosi dovuto all'inclusione delle informazioni sulle nipoti si è rivelato in questo caso più potente dell'aggiunta di nuovi marcatori.

L'insieme di questi risultati non consente al momento di dimostrare che il gene o i geni identificati influenzino solo le quantità di grasso e proteina e dunque i tenori senza conseguenze negative sulla quantità di latte. Anche l'intervallo di localizzazione non consente al momento di prevedere nell'immediato futuro un'applicazione in selezione dei risultati ottenuti. Prima della fine del progetto saranno però disponibili i risultati di una nuova analisi realizzata attraverso il DNA chip ovino 54K il quale dovrebbe consentire, dato l'elevato numero di marcatori molecolari, con un notevole incremento della densità di mappa di definire ulteriormente localizzazione e effetti del QTL identificato.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Sara Casu (Ricercatore)  
Stefania Sechi (Ricercatore)  
Mario Graziano Usai (Ricercatore)

Sabrina Miari (Ricercatore)  
Giuliana Mulas (Borsista)  
Maria Colombino (Borsista)

#### PUBBLICAZIONI

- 1) CASU S., COLOMBINO M., MULAS G., SECHI S., BARILLET F. AND CARTA A. (2009): *Detection on OAR 7 of QTL affecting fat and protein yields in dairy sheep*, in Proceedings of the 18th ASPA Congress, Palermo, June 9-12, 2009, «Ital.J.Anim.Sci.», vol. 8 (Suppl. 2), pp. 45-47.
- 2) CASU S., USAI M.G., SECHI S., MULAS G., SECHI T., MIARI S. AND CARTA A. (2010): *QTL Detection For Milk Traits On Ovine Chromosome 7 Through A Sire Design Using Marker Genotypes And Production Records Of Daughters And Their Progeny*, Accepted as oral presentation at the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.



LINA CHIANESE\*

## Caratterizzazione delle lattoproteine asinine mediante l'approccio proteomico\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

Il latte di asina, per la sua elevata digeribilità è usato nell'alimentazione umana da lungo tempo. Questa peculiarità trova un supporto obbiettivo nel livello quantitativo in macronutrienti, in particolare proteine e glucidi, più vicino al latte umano che non a quello bovino. Recenti studi hanno messo in evidenza l'effetto positivo della assunzione del latte di asina da parte di bambini in età pediatrica con conclamata allergia alle proteine del latte bovino.

Quando è iniziato il progetto "Selmol" non erano disponibili dati sulla caratterizzazione molecolare delle caseine asinine con cui supportare scientificamente i suoi benefici effetti.

Obbiettivo dell'attività di ricerca dalla presente UR è stato la caratterizzazione delle quattro frazioni caseiniche nel latte di asina per evidenziarne una eventuale eterogeneità compositiva dovuta al polimorfismo genetico o al livello di espressione dei relativi geni.

### MATERIALE E METODOLOGIE

I 70 campioni individuali di latte messi a disposizione dal progetto, provenienti da asine allevate in Abruzzo e in Sicilia, sono stati sottoposti al frazionamento azotato per l'isolamento della caseina, delle sieroproteine e dell'NPN. Sia la frazione caseinica che quella sieroproteica sono state analizzate con la metodologia analitica "proteomica" che combina diverse tecniche elettrofore-

\* *Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento Scienza degli Alimenti*

\*\* *Unità di ricerca Università di Napoli, responsabile scientifico prof. Lina Chianese*

tiche mono (PAGE pH 8.6, UTLIEF, PAGE-SDS) e bidimensionali (PAGE *vs* UTLIEF; UTLIEF *vs* PAGE-SDS) con la doppia colorazione al Blue Coomassie e con anticorpi policlonali specifici, a tecniche cromatografiche ad alta risoluzione RP-HPLC interfacciate all'analisi di spettrometria di massa (LC/MS, MALDI-TOF).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

### *Le frazioni caseiniche del latte di asina*

L'approccio proteomico ha permesso l'identificazione delle quattro frazioni caseiniche, ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -CN) nel latte di asina assieme alla loro eterogeneità compositiva dovuta a processi postraduzionali come la fosforilazione ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  e  $\beta$ -CN) e la glicosilazione ( $\kappa$ -CN), e a forme non alleliche conseguenti all'incorretto splicing del trascritto primario in mRNA ( $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ ) e al polimorfismo genetico (presenza di una o più varianti genetiche) (fig. 1-3).

Nello specifico:

- l' $\alpha_{s1}$ -CN di asina è costituita da almeno 4 componenti di cui due principali costituiti dalla  $\alpha_{s1}$ -CN lunga 202 aa nei due stati di fosforilazione 5P e 6P e due secondari, con gli stessi gradi di fosforilazione, costituiti da una proteina più corta del peptide  $\alpha_{s1}$  (f 34-38) altrimenti espresso dall'esone 5. L'addizionale screening condotto sui campioni mediante cromatografia RP-HPLC su colonna C4 ha messo in evidenza due fenotipi di  $\alpha_{s1}$ -CN di cui uno caratterizzato dalla stessa struttura primaria recentemente pubblicata.
- la  $\beta$ -CN ha una carica netta negativa e un punto isoelettrico molto simili a quelli dell'omologa bovina. Anch'essa è risultata eterogenea per la presenza di tre componenti fosforilati (7P, 6P e 5P) e da una forma non allelica deleta del peptide  $\beta$  (f27-34) a sua volta presente negli stessi tre gradi di fosforilazione. Le analisi elettroforetica e cromatografica hanno messo in evidenza quattro varianti genetiche a questo locus (A, B, C e D) mentre la spettrometria di massa ha permesso di identificare le sostituzioni amminoacidiche caratterizzanti.
- l' $\alpha_{s2}$ -CN di asina esibisce la più elevata carica netta negativa rispetto alle altre frazioni caseiniche e un pI molto simile a quello delle  $\beta$ -CN. La sua struttura primaria consiste in una proteina lunga 221 amminoacidi con peso molecolare di 26029 Da presente in almeno tre gradi di fosforilazione (10, 11 e 12P).
- la  $\kappa$ -CN è stata visualizzata nei diversi profili elettroforetici solo dopo immunocolorazione con anticorpi policlonali specifici, probabilmente per il



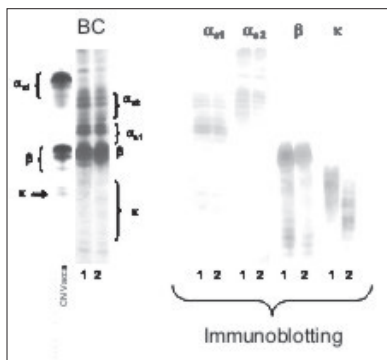


Fig. 1 Analisi PAGE pH 8,6 di due caseine individuali di asina rilevati con il Blue Coomassie (BC) e con anticorpi policlonali contro le quattro frazioni caseiniche  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -CN

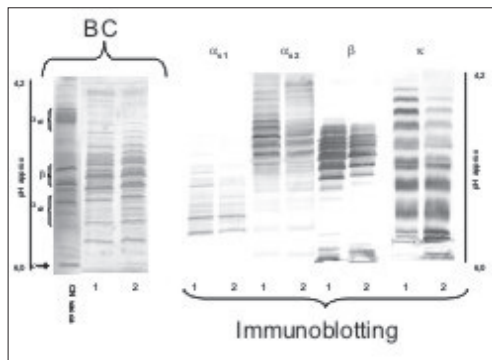


Fig. 2 Analisi UTLIEF di due caseine individuali di asina rilevati con il Blue Coomassie (BC) e con anticorpi policlonali contro le quattro frazioni caseiniche  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -CN

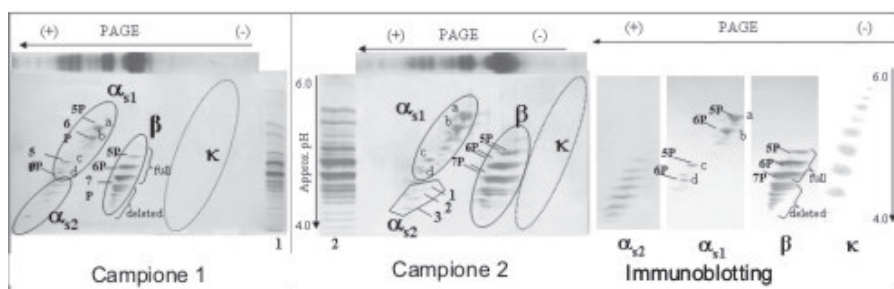


Fig. 3 Analisi 2D di due caseine individuali di asina rilevati con il Blue Coomassie (BC) e con anticorpi policlonali contro le quattro frazioni caseiniche  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -CN

suo basso livello di espressione. I risultati mettono in evidenza, anche per questa specie, una elevata eterogeneità compositiva, che, in analogia con le altre specie, è dovuta al diverso grado di glicosilazione.

### *Caratterizzazione della frazione sieroproteica di asina*

Il profilo UTLIEF rappresentativo della frazione sieroproteica è risultato monomorfo sia per l' $\alpha$ -La che per la  $\beta$ -Lg I entrambe costituite da 2 componenti (fig. 4). Polimorfo è risultato invece quello della  $\beta$ -Lg II per la presenza, oltre che delle varianti note A, B, C e D, della nuova variante E. Di quest'ultima è stata determinata la struttura primaria. Infine l'assenza di

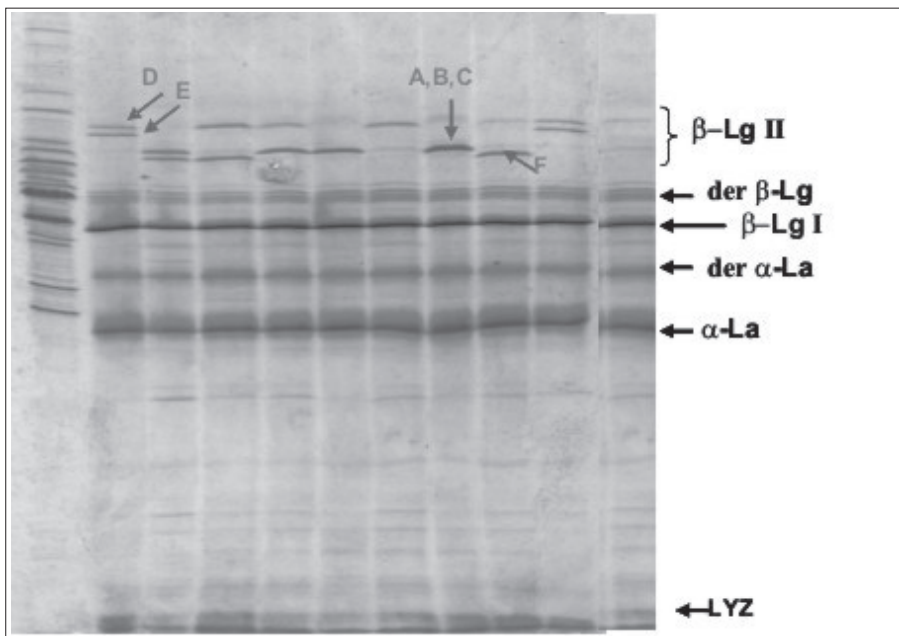


Fig. 4 *Profili UTLIEF di campioni individuali di sieroproteine d'asina*

$\beta$ -Lg II in alcuni campioni indica un polimorfismo anche di tipo quantitativo a questo *locus*.

#### *Peptidi ad attività antiossidanti nell'NPN del latte di asina*

Un'altra peculiarità compositiva che rende il latte di asina più simile a quello umano, rispetto al più usato latte bovino nella produzione delle formule, è il livello di NPN (0,23 in asina contro lo 0,34 umano). Come è noto, esso è costituito in gran parte da peptidi derivanti all'idrolisi delle caseine per attività enzimatiche endogene. Lo studio di questa frazione in campioni di latte di altre specie ne ha messo in evidenza bioattività interessanti tra cui quella antiossidante. A tal fine, nel presente lavoro di ricerca, sulla frazione NPN estratta da alcuni campioni di latte di asina è stata valutata l'attività antiossidante mediante TBARS-test e determinata la composizione peptidica corrispondente mediante spettrometria di massa. I risultati ottenuti hanno indicato che la maggiore attività antiossidante caratterizza lattici che contengono peptidi derivanti dalla sequenza C-terminale della  $\beta$ -CN e fosfopeptidi derivanti dalla sequenza N-terminale dell' $\alpha_2$ -CN con 1, 2 e 3 gruppi fosfato.

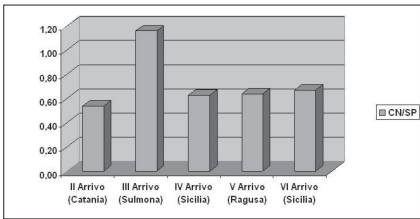


Fig. 5 Determinazione del rapporto CN/SP mediante analisi densitometrica dei profili PAGE-SDS dei campioni di latte di asina

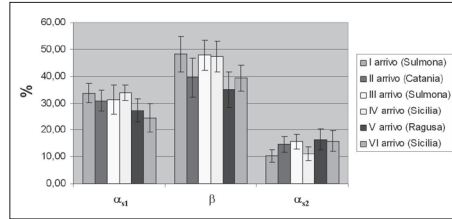


Fig. 6 Percentuale relativa media di as1, b ed as2-CN mediante analisi densitometrica dei profili PAGE

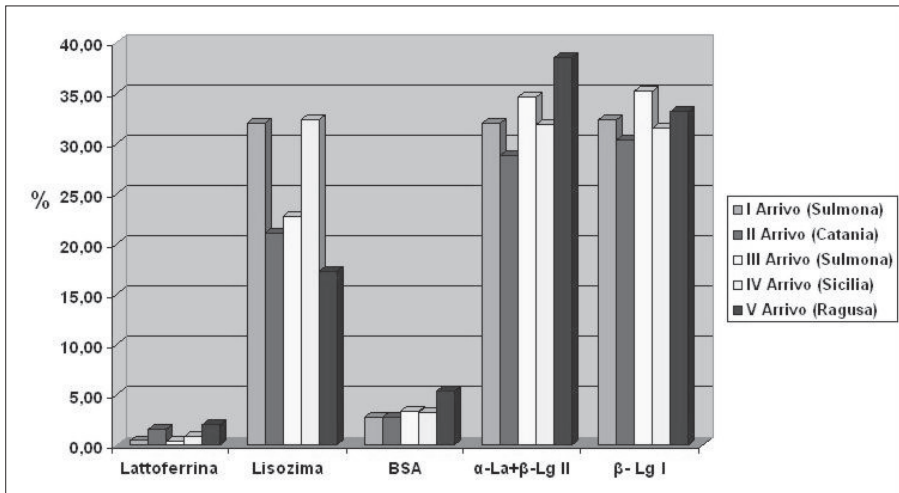


Fig. 7 Percentuale relativa delle sieroproteine asinine determinata mediante analisi RP-HPLC

### Analisi quantitative

Come prima riportato, l'interesse per il latte di asina quale succedaneo del latte materno quando non disponibile, dipende da una composizione in macronutrienti molto simile tra i due. Oltre al lattosio, il livello delle proteine totali (1,8 asina contro 1,5 umano) e valori molto simili di caseine e sieroproteine danno origine a un rapporto CN/SP (maggiore dell'unità) nel latte di asina simile a quello del latte umano (fig. 5). Tale rapporto è stato determinato nella popolazione in esame mediante analisi densitometrica dei profili PAGE-SDS.

I risultati, vengono riportati sotto forma di istogrammi, assieme a quelli relativi al livello delle singole frazioni caseniniche e sieroproteiche (fig. 6 e 7).

### Conclusioni

I risultati fin qui acquisiti, oltre al contributo alla conoscenza di base delle proteine del latte di asina, possono essere di supporto a programmi di selezione genetica della specie asinina per la produzione di latte “funzionalizzato” per l’alimentazione neonatale.

### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Ferranti P. (Professore associato)  
 Mauriello R. (Ricercatore)  
 Garro G. (Ricercatore)  
 Quarto M. (Assegnista)  
 De Simone C. (Dottoranda)  
 Costanzo A. (Dottoranda)

### PRODOTTI

### TRASFERIMENTO

### PUBBLICAZIONI

- 1) CHIANESE L., CALABRESE M.G., FERRANTI P., MAURIELLO R., GARRO G., DE SIMONE C., QUARTO M., ADDEO F., COSENZA G., RAMUNNO L. (2010): *Resolution of donkey caseome by proteomic approach*, «Journal of Chromatography A», accettato per la pubblicazione.
- 2) MAURIELLO R., CALABRESE M.G., FERRANTI P., GARRO G., QUARTO M., RAMUNNO L., COSENZA G. e CHIANESE L. (2010): *Approccio proteomico per la caratterizzazione della frazione caseinica del latte di asina*, «Alimenti funzionali», 2, pp. 14-17.
- 3) DE SIMONE C., FERRANTI P., STIUSO P., ALESSANDRA DICITORE A., VANACORE D., MAURIELLO R., CHIANESE L. (2009): *Identificazione e proprietà antiossidanti dei componenti peptidici della frazione azotata non proteica del latte di asina*, Atti 9° CISETA, Milano 11-12 giugno 2009, 13.
- 4) MAURIELLO R., CALABRESE M.G., FERRANTI P., GARRO G., QUARTO M., CHIANESE L. (2009): *Caratterizzazione molecolare della caseina di asina*, Nota 1. Atti 9° CISETA, Milano 11-12 giugno 2009, 28.
- 5) MAURIELLO R., GARRO G., QUARTO M., CHIANESE L. (2009): *Determinazione del livello quantitativo delle quattro frazioni caseiniche e del rapporto CN/SP nel latte di asina*, Nota 2. Atti 9° CISETA, Milano 11-12 giugno 2009, 28.

PAOLA CREPALDI\*

## Analisi di geni candidati nelle variazioni quanti-qualitative della frazione lipidica del latte caprino\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

La componente lipidica del latte ha una grande importanza sia per le caratteristiche nutrizionali e aromatiche che conferisce al prodotto, sia per le implicazioni di ordine tecnologico legate alla sua conservazione e trasformazione. Nella specie bovina, per la quale sono largamente disponibili informazioni molecolari, sono noti numerosi geni e polimorfismi responsabili o associati alle variazioni lipidiche del latte. Le informazioni molecolari sono invece ancora molto ridotte nella specie caprina, per la quale è ancora attesa la pubblicazione della sequenza completa del genoma. Si è dunque condotta una ricerca volta a trasferire alla specie caprina le informazioni molecolari disponibili in altre specie, per individuare e studiare Polimorfismi di Singolo Nucleotide (SNP) di alcuni fra i principali geni coinvolti nei processi che determinano le caratteristiche quanti-qualitative della frazione lipidica del latte.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Si sono raccolti in collaborazione con AssoNaPa e LGS i campioni biologici di 549 animali appartenenti a 12 razze caprine cosmopolite e autoctone allevate in Italia e gli indici genetici (EBV) per grasso (kg e %), proteine (kg e %), latte (kg) e merito totale per i becchi delle razze Camosciata delle Alpi, Saanen e Maltese. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando un kit commer-

\* *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Zootecnica Agraria*

\*\* *Unità di ricerca Università di Milano, responsabile scientifico dott. Paola Crepaldi*

ciale. Si sono messi a punto, con un approccio di genomica comparata, numerosi protocolli di PCR per studiare i geni ACACA, FASN, LPL, DGAT1 e SCD. L'individuazione degli SNP è stata condotta attraverso l'allineamento e il confronto di prodotti di PCR su 12 soggetti appartenenti ad alcune razze incluse nello studio. Tutti i soggetti campionati sono stati genotipizzati in outsourcing (<http://kbioscience.co.uk>) per gli SNP individuati. Le analisi dei dati sono state condotte con il software Power Marker v.3.25 (<http://statgen.ncsu.edu/powermarker>) e con il software JMP v.3.2.2 (Sas Inst., 1989) per la stima dei principali parametri genetici e per l'analisi di associazione.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

I cinque geni indagati sono coinvolti a diverso titolo nel metabolismo lipidico. In particolare il gene Acetil CoA carbossilasi  $\alpha$  (ACACA) codifica per una proteina implicata nella biosintesi degli acidi grassi, influenzando la lipogenesi e la secrezione dei lipidi nella ghiandola mammaria; il gene Fatty acid synthase (FASN) svolge un ruolo funzionale nella lipogenesi in quanto codifica per un enzima che catalizza la sintesi di palmitato da acetil-coA a malonyl-coA in acidi grassi saturi a lunga catena; il gene Lipoprotein lipase (LPL) è responsabile dell'idrolisi dei trigliceridi in acidi grassi liberi nel latte; il gene Diacylglicerolo acil transferasi 1 (DGAT1) codifica per un enzima che catalizza lo stadio finale della biosintesi dei trigliceridi e il gene Stearoyl CoA denaturasi (SCD) è implicato nelle variazioni di acido linoleico coniugato (CLA) nel latte dei ruminanti.

Gli SNP identificati (tab. 1) nei 5 geni descritti e di cui sono stati ottenuti i dati di genotipizzazione sono 25, 18 identificati nel presente progetto e 7 già noti in letteratura (Yahyaoui et al., 2003; Angiolillo et al., 2007; Badaoui et al., 2007).

Nel gene DGAT1 sono stati individuati 2 SNP negli introni 12 e 14 e si è confermata la presenza di uno SNP nell'introne 16 già riportato in letteratura, rivelando un basso livello di polimorfismo di questo gene in capra. Per il gene SCD si è validata la presenza di 2 SNP già noti nell'esone 5 (sinonimi) e nella regione 3'UTR, sono stati identificati 3 nuovi SNP negli esoni 2 (sinonimo), 3 (non sinonimo) e 4 (sinonimo). Nel gene LPL si è confermata la presenza di uno SNP non sinonimo nell'esone 1 e di uno SNP nella regione 3' UTR ed è stato identificato uno SNP nell'introne 7. Nel gene ACACA si è confermata la presenza di uno SNP nell'esone 45 (sinonimo) e sono stati rilevati 4 SNP, 1 nell'esone 14 e 2 nell'esone 46, sinonimi e 1 nell'introne 46.

GENE	REGIONE GENICA	SNP	NOTE	GENE	REGIONE GENICA	SNP	NOTE
DGAT1	Introne 12	A/G		ACACA	Esone 14	C/T	sinonimo
	Introne 14	Indel(C)			Esone 45	C/T	sinonimo
	Introne 16	C/T			Esone 46	C/T	sinonimo
SCD	Esone 2	A/G	sinonimo		Esone 46	C/T	sinonimo
	Esone 3	A/G	non sin.	FASN	Introne 3	A/G	
	Esone 4	G/T	sinonimo		Introne 3	G/C	
	Esone 5	C/T	sinonimo		Esone 8	G/T	sinonimo
	Esone 5	G/T	non sin.		Esone 8	A/G	non sin.
	3'UTR	IndelTGT			Introne 16	A/G	
LPL	Esone 1	C/G	non sin.		Introne 16	C/T	
	Introne 7	C/T			Esone 18	C/T	sinonimo
	3'UTR	C/T			Esone 34	C/T	sinonimo
					Introne 34	A/G	

Tab. 1 *SNP studiati nella presente ricerca (in grassetto SNP ricavati dalla letteratura)*

Infine nel gene FASN, studiato per la prima volta in capra, si sono identificati 10 SNP: 2 nell'introne 3, 2 nell'esone 8 (1 non sinonimo), 1 nell'introne 8, 2 nell'introne 16, 1 nell'esone 18 (sinonimo), 1 nell'esone 34 (sinonimo) e 1 nell'introne 34.

I risultati dell'analisi di genotipizzazione dei 25 SNP sui 549 soggetti appartenenti alle 12 razze caprine indagate (Camosciata delle Alpi –CAM–, Saanen –SAA–, Maltese –MALT–, Sarda –SAR–; Nicastrese –NIC–, Aspromontana –ASP–, Orobica –Oro–, Bionda dell'Adamello –BIO–, Valdostana –VAL–, Derivata di Siria –DSI–, Molisana –MOL–, Garganica –GAR–) sono riportati in tabella 2 insieme alle principali statistiche descrittive. Si può notare che 6 SNP sono risultati rari, presentano infatti una frequenza dell'allele maggiore superiore a 0,95. Ognuno dei 5 geni indagati presenta 1 SNP raro, FASN ne presenta 2. Per quanto riguarda il numero dei genotipi la maggior parte degli SNP presenta tutti i 3 genotipi tranne 5 SNP, 4 di questi sono SNP rari. I valori di  $F_{st}$  calcolati per polimorfismo sono in generale decisamente bassi evidenziando una scarsa differenziazione fra le razze in questi geni. Soltanto 3 SNP hanno fatto registrare valori superiori a 0,10, lo SNP nell'introne 3 di FASN, lo SNP nel 3'UTR di LPL e lo SNP nell'esone 45 del gene ACACA.

Per quanto riguarda le analisi di associazione, in tabella 3 sono riportate le stime degli effetti di sostituzione allelica calcolate su un sottocampione di 80 becchi di razza Saanen e Camosciata delle Alpi. 4 SNP hanno mostrato una associazione significativa con l'EBV per i kg di grasso, mentre 2 SNP con gli EBV per la % in grasso. Di questi però soltanto lo SNP nell'esone 5

MARCATORI	N. CAM- PIONI	FREQUENZA AL- LELE MAGGIORE	N. GE- NOTIPO	H. EXE.	H. OBS.	PIC	F <sub>ST</sub>
ACACAEX14_CT	520	0,83	3	0,29	0,29	0,25	0,01
ACACAEX45_CT	506	0,71	3	0,41	0,25	0,33	0,11
ACACAEX46_1CT	419	0,9	3	0,19	0,16	0,17	0,04
ACACAEX46_2CT	526	0,97	2	0,06	0,07	0,06	0,07
DGATIINT7_CT	529	0,98	3	0,04	0,04	0,04	0,03
DGATIINT12_AG	271	0,93	3	0,12	0,05	0,12	0,04*
DGATIINT16_C703T	525	0,94	3	0,12	0,12	0,11	0,07
DGATIINT14_INSC	471	0,91	3	0,16	0,13	0,15	0,09
LPLEX1_C50G	430	0,88	3	0,21	0,19	0,18	0,06°
LPLINT7_CT	497	0,9	3	0,18	0,16	0,17	0,05
LPL3UTR_C2094T	327	0,98	3	0,04	0,04	0,04	<b>0,11</b> §
SCDEX2_AG	506	0,59	3	0,48	0,48	0,37	0,02
SCDEX3_AG	488	0,59	3	0,48	0,48	0,37	0,04
SCDEX4_GT	527	0,98	2	0,03	0,03	0,03	0,04
SCDEX5_CT	440	0,55	3	0,5	0,43	0,37	0,05
SCDEX5_GT	466	0,84	3	0,27	0,19	0,23	0,06
SCD3UTR_DELTGT	481	0,61	3	0,47	0,46	0,36	0,03
FASNINT3_IAG	501	0,62	3	0,47	0,38	0,36	0,16
FASNINT3_2GC	480	0,85	3	0,25	0,24	0,22	0,07
FASNEX8_AG	441	0,99	2	0,01	0,01	0,01	0,04*
FASNEX8_GT	450	0,99	2	0,01	0,01	0,01	0,04°
FASNINT16_AG	210	0,93	2	0,12	0,13	0,12	0,04§
FASNINT16_CT	336	0,82	3	0,29	0,28	0,25	0,10#
FASNEX18_CT	505	0,79	3	0,33	0,29	0,28	0,07
FASNINT34_AG	273	0,84	3	0,27	0,25	0,23	0,07®
FASNEX34_CT	535	0,89	3	0,2	0,16	0,18	0,2

Tab. 2 *Principali statistiche descrittive degli SNP analizzati per i 5 geni candidati nel campione I segni in apice indicano statistiche che non comprendono le razze: \*Derivata di Siria, Garganica, Molisana e Sarda; ° Derivata di Siria, Garganica e Molisana; § Camosciata, Maltese, Molisana, Derivata di Siria, Garganica, Saanen e Sarda; # Sarda; ® Camosciata, Saanen e Sarda.*

del gene ACACA ha mostrato un effetto significativo ( $P < 0,037$ ) in entrambe le razze per il contenuto in grasso, con un effetto di sostituzione allelica negativo per l'allele minore. Queste osservazioni concordano con quanto osservato su razze di capre spagnole, nelle quali si era osservata una associazione positiva con la % in grasso del latte, la conta delle cellule somatiche e il contenuto in lattosio (Badoui et al., 2007). Lo SNP osservato nell'introne 16 del gene FASN presenta l'effetto significativo più elevato ( $p = 0,006$ ) per l'allele maggiore nella razza Saanen. Anche lo SNP individuato nell'introne 7 del gene LPL ha mostrato un effetto significativo sul contenuto in grasso



EBV	SNP	ALLELE	FREQUENZA	ALPHA	P	RAZZA
GRASSO (KG)	ACACAex14_CT	T	0.14	0.936	0.052	SAA
	ACACAex45_CT	T	0.24	-1.145	0.015	ALP
	ACACAex45_CT	T	0.26	-0.762	0.041	SAA
	FASNint16_CT	T	0.60	0.184	0.006	ALP
	LPLint7_CT	T	0.80	-1.508	0.021	ALP
GRASSO (%)	ACACAex45_CT	T	0.14	-0.03	0.037	SAA
	ACACAex46_2CT	T	0.09	0.10	0.013	SAA

Tab. 3 *Stima degli effetti di sostituzione allelica (alpha) e delle frequenze degli SNP con effetto significativo nelle razze Saanen e camosciata delle Alpi per gli EBV grasso kg e %*

e l'allele maggiore osservato in questa razza avrebbe un effetto di sostituzione negativo. Sulla percentuale di grasso lo SNP sull'esone 46 del gene ACACA presenta un effetto significativo nella razza Saanen con un effetto di sostituzione allelica positivo per l'allele minore. Va rilevato inoltre che le analisi di *selection signature* svolte con il Software Lositan indicano un effetto di selezione positiva per lo SNP sull'esone 45 del gene ACACA nelle 12 popolazioni caprine studiate.

In conclusione la presente ricerca ha permesso di identificare alcune associazioni interessanti fra i polimorfismi genetici studiati e gli EBV per il tenore e il contenuto in grasso del latte. Si apre quindi la possibilità di utilizzare in selezione anche le informazioni relative a questi polimorfismi, sia per migliorare queste caratteristiche sia per disporre di nuovi marcatori SNP per una maggior caratterizzazione della variabilità genetica conservata nelle diverse popolazioni caprine allevate in Italia.

#### BIBLIOGRAFIA

- ANGIOLILLO A. ET AL. (2007): «J. Dairy Res.», 74, pp. 47-51.  
 BADAoui B. ET AL. (2007): «J. Dairy Sci.», 90, pp. 3012-3017.  
<http://statgen.ncsu.edu/powermarker>  
 Sas Inst. (1989).  
 YAHYAoui M.H. ET AL. (2003): «Anim Genet.», 34 (6), pp. 474-5.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Nicoloso Letizia (COCOCO)  
 Milanese Elisabetta (Assegnista)  
 Coizet Beatrice (Laureata)

## PRODOTTI

- Protocolli di PCR per l'analisi delle regioni polimorfiche dei geni candidati studiati; 18 SNP identificati nei 5 geni candidati.

## TRASFERIMENTO

Informazioni sul genotipo ai principali loci caseinici di riproduttori maschi delle diverse razze studiate; informazione circa la possibilità di utilizzare il pannello di SNP individuato per la caratterizzazione delle razze caprine studiate; dati di genotipizzazione per 549 animali appartenenti a 12 razze.

## PUBBLICAZIONI

- 1) RAMUNNO L., COSENZA G., CREPALDI P., PILLA F. (2008): *Biologia molecolare e miglioramento genetico delle caratteristiche quanti-qualitative del latte ovi-caprino*, Suppl. «Large Animal Review», 14, pp. 117-121.
- 2) MILANESI E., NICOLOSO L., COIZET B., RAMUNNO L., FRESI P., MURRU S., CREPALDI P. (2010): *Preliminary association studies between EBV and SNPs in 5 candidate genes for milk fat in goats*, Proc 9th WCGALP, Leipzig, Germany, August in c.d.s.
- 3) COIZET B., MILANESI E., NICOLOSO L., CREPALDI P. (2010): *Lo studio del polimorfismo di geni candidati per il contenuto in grasso del latte: uno strumento di valorizzazione delle popolazioni caprine autoctone?*, Atti Congresso Coltivare la biodiversità, Milano, 10-11 giugno 2010.

MARIA FELIGINI\*

## Caratterizzazione quali-quantitativa delle proteine del latte di bufalo Mediterraneo\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Durante gli ultimi 15 anni la popolazione italiana di bufalo mediterraneo è cresciuta di circa dieci volte. Dato che la maggior parte del latte prodotto viene trasformato in formaggio (mozzarella DOP), risulta essenziale conoscere la composizione delle proteine del latte per ottimizzare le trasformazioni casearie e ottenere la migliore resa. In particolare, la conoscenza delle differenze di espressione delle frazioni caseiniche, dovute anche a fattori genetici, può favorire sia il miglioramento dell'attitudine casearia del latte sia l'incremento del valore aggiunto della filiera lattiero-casearia, aspetto prioritario per il produttore.

Gli obiettivi della ricerca sono stati:

- Ottimizzazione di protocolli analitici per la separazione proteica mediante cromatografia liquida
- Quantificazione assoluta delle singole caseine (alpha-s1, alpha-s2, beta e kappa), delle maggiori sieroproteine (alfa-lattoalbumina, beta-lattoglobulina e albumina serica)
- Identificazione di varianti genetiche.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Mediante cromatografia liquida (RP-HPLC) sono stati analizzati 210 cam-

\* *Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani*

\*\* *Unità di ricerca Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani, responsabile scientifico dott. Maria Feligini*

pioni di latte individuali provenienti da cinque allevamenti campani. Ciascuna frazione proteica è stata identificata in base al suo peso molecolare (ESI-Q-TOF) e/o sequenza N-terminale. Attraverso la costruzione di una curva di calibrazione utilizzando standard commerciali, è stato possibile quantificare le proteine con accuratezza, precisione e ripetibilità elevate. In totale (campioni e standard) sono state effettuate 550 analisi cromatografiche.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

In questo studio sono stati sviluppati due protocolli analitici per la separazione e quantificazione assoluta delle proteine del latte bufalino (caseine e sieroproteine). La strategia è stata quella di conseguire una rapida separazione delle frazioni proteiche, l'identificazione di varianti proteiche e la quantificazione assoluta di ogni singola frazione mediante cromatografia liquida.

*Analisi delle caseine:* L'analisi diretta del latte mediante HPLC, ha mostrato una buona qualità di separazione, rivelando contemporaneamente tutte le frazioni caseiniche ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -CN), identificate mediante l'impiego di standard commerciali, sulla base del tempo di ritenzione di ciascun picco proteico lungo il tracciato cromatografico. I risultati hanno mostrato che la deviazione standard del tempo di ritenzione di ciascun picco è stata inferiore all'1%, assicurando in tal modo una robusta ripetitività per il riconoscimento di ogni frazione proteica; l'identificazione di ciascuna proteina è stata confermata dalla determinazione del peso molecolare di ogni frazione proteica mediante spettrometria di massa. Le analisi hanno consentito di rilevare due varianti genetiche al locus  $\alpha_{s1}$ -CN, in accordo con i risultati ottenuti dalla UO UNINA (prof. Ramunno). In generale la struttura dei profili osservati nei campioni di latte ha mostrato un'alta eterogeneità. In particolare, sono state evidenziate due frazioni di  $\alpha_{s1}$ -CN con peso molecolare di 23.490 Da e 23.516 Da, e tre frazioni di  $\kappa$ -CN con peso molecolare di 19.165 Da, 19.177 Da e 19.247 Da. La  $\beta$ -CN e l' $\alpha_{s2}$ -CN hanno mostrato, in tutti i campioni analizzati, una sola frazione proteica con peso molecolare rispettivamente di 24.033 Da e 22.741 Da. La quantificazione delle frazioni caseiniche in 90 campioni di latte ha permesso di determinare le seguenti concentrazioni medie:  $\alpha_{s1}$ -CN 13,97 g/l;  $\alpha_{s2}$ -CN 3,58 g/l,  $\kappa$ -CN 3,97 g/l,  $\beta$ -CN 17,21 g/l. La determinazione Kjeldhal del contenuto azotato è stata svolta su 8 campioni; il valore di azoto caseinico, espresso come proteina equivalente, e la somma delle concentrazioni delle frazioni caseiniche determinate mediante HPLC sono stati sottoposti a test t accoppiato per la significatività della differenza

tra medie, dopo correzione per la densità relativa del latte di bufala (1,07). Il risultato non supporta la presenza di differenze significative (p-value di 0,4009).

*Analisi delle sieroproteine:* Il protocollo HPLC, ottimizzato per la separazione delle maggiori proteine del siero di latte bufalino (SA,  $\alpha$ -LA and  $\beta$ -LG), consente di completare l'analisi in 24 min con una buona precisione del tempo di ritenzione per un'esplicita identificazione di ogni frazione proteica. Il metodo ha mostrato una ripetibilità e riproducibilità dei tempi di ritenzione inferiori con variazioni inferiori all' 1,5% permettendo quindi un immediato riconoscimento dei picchi ascrivibili a ciascuna proteina d'interesse. I risultati dell'analisi di spettrometria di massa sono stati: 14.236 Da, 18.266 Da e 66.397 Da rispettivamente per SA,  $\alpha$ -LA and  $\beta$ -LG. A differenza delle caseine, i tracciati cromatografici delle sieroproteine non hanno mostrato eterogeneità, ogni frazione è risultata caratterizzata dalla presenza di un solo picco cromatografico. Le sieroproteine non hanno mostrato la presenza di polimorfismi. Tuttavia, l' $\alpha$ -LA ha mostrato nei 120 campioni analizzati, la presenza di un secondo picco con peso molecolare di 16.663 Da) dovuto, probabilmente, a fenomeni di glicosilazione. L'analisi quantitativa, effettuata per mezzo di una curva di calibrazione costruita con standard commerciali, ha permesso di determinare le seguenti concentrazioni medie: SA 0,35 g/l,  $\alpha$ -LA 2,45 g/l e  $\beta$ -LG 4,04 g/l.

In questa ricerca sono state analizzate le caseine e le maggiori sieroproteine del latte di bufalo Mediterraneo, con lo scopo di acquisire nuove informazioni sulla loro composizione sia da un punto di vista qualitativo sia quantitativo. Le analisi sono state effettuate utilizzando l'unico approccio analitico che consente di effettuare una quantificazione assoluta, cioè l'analisi cromatografia mediante RP-HPLC. In particolare, per quanto riguarda le caseine sono state rilevate:

- Elevata variabilità qualitativa dei profili caseinici nei campioni analizzati
  - Variabilità quantitativa di ciascuna frazione caseinica ( pari al 20 - 25%)
  - Un polimorfismo proteico per l' $\alpha_{s1}$ -CN
  - Differenze quantitative significative nel contenuto di  $\alpha_{s2}$ -CN
  - Il contenuto caseinico totale risulta meno variabile delle singole frazioni
- Per quanto riguarda le maggiori sieroproteine:
- Si sono trovate differenze significative tra aziende, in particolare il latte di un'azienda ha mostrato concentrazioni (g/l) di sieroproteine significativamente più elevate
  - Il contenuto medio dell' $\alpha$ -LA risulta piuttosto elevato
  - Non sono stati rilevati polimorfismi proteici

I risultati ottenuti forniscono nuove informazioni sulla composizione proteica del latte di bufalo Mediterraneo che possono essere utilizzate per scopi di selezione e per sostenere il lavoro dell'allevatore nell'incrementare il valore aggiunto della filiera (resa alla trasformazione).

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Ivan Bonizzi (Ricercatore)  
Natalia Buffoni (Assegnista)

#### PRODOTTI

- Protocolli per la quantificazione assoluta delle singole frazioni proteiche del latte.

#### TRASFERIMENTO

Conoscenze trasferite: Dati sulla composizione quali-quantitativa delle proteine del latte di bufalo Mediterraneo.

#### BREVETTI

#### PUBBLICAZIONI

- 1) FELIGINI M., BONIZZI I., BUFFONI J.N., COSENZA G., RAMUNNO L. (2009): *Identification and Quantification of alpha(S1), alpha(S2), beta, and kappa-Caseins in Water Buffalo Milk by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 57, pp. 2988-2992.
- 2) BUFFONI J.N., BONIZZI I., PACIULLO A., RAMUNNO L., FELIGINI M. (2010): *Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo*, «Food Chemistry», sottomesso.

FABIO PILLA\*

## Individuazione nella razza Comisana di geni che influenzano le qualità nutrizionali del latte\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

Il miglioramento genetico per la produzione di latte negli ovini presenta una situazione molto diversificata a seconda delle razze. Mentre per la razza Sarda e la Delle Langhe vengono calcolati gli indici genetici per i riproduttori, per la razza Comisana (una delle più diffuse) esiste un nucleo di selezione nel quale produrre il miglioramento da diffondere poi nella popolazione. Inoltre la selezione è, attualmente, praticata solo per la quantità di latte e non vengono ancora pienamente considerati caratteri rilevanti quali il contenuto in grasso e proteina e per nulla le caratteristiche funzionali (con diretto effetto sulla salute dell'uomo) quali quelle relative al profilo degli acidi grassi del latte. Lo scopo della unità operativa è, quindi, quello di individuare nella razza Comisana i geni che influenzano le qualità nutrizionali del latte.

### MATERIALI E METODOLOGIE

L'indagine è stata svolta ricercando le associazioni tra polimorfismi del DNA in loci candidati e caratteri relativi alla produzione e al profilo degli acidi grassi del latte. A questo scopo sono stati prelevati e analizzati campioni di latte da 100 animali del nucleo di selezione, 70 di razza Comisana e 30 di Massese. I polimorfismi del DNA sono stati individuati mediante sequenziamento di

\* *Università degli Studi del Molise, Dipartimento Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente*

\*\* *Unità di ricerca Università di Campobasso, responsabile scientifico prof. F. Pilla*

geni candidati e analisi della letteratura. Relativamente ai fenotipi sono stati utilizzati quelli ottenuti dai controlli funzionali e il profilo acidico prodotto mediante analisi HPLC di campioni individuali di latte.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I geni considerati sono stati scelti in base alla funzione nota e alle informazioni di letteratura. Il primo codifica per l'enzima Stearoil CoA-Desaturasi (SCD), uno degli enzimi chiave del metabolismo lipidico; la sua funzione è quella di inserire un doppio legame in posizione *cis*-9 in un largo spettro di acidi grassi a media e lunga catena. Il secondo è il gene codificante per l'enzima diacilglicerolo acetil transferasi (DGAT1) che è stato scelto in quanto nel bovino e nell'ovino è risultato avere un effetto importante sulla quantità e qualità del grasso del latte.

Poiché per il gene SCD non erano disponibili informazioni relative ai polimorfismi nella specie ovina, queste sono state ricercate mediante il sequenziamento di un campione di 14 individui di razze diverse (Altamurana, Leccese, Gentile di Puglia, Sarda, Comisana, Laticauda, Bagnolese). In questo modo sono stati individuati 7 polimorfismi di tipo (SNP, single nucleotide polymorphism): due nel promotore, 4 a livello intronico e uno localizzato nel secondo esone.

Nel nucleo di selezione si è proceduto alla identificazione di 100 pecore pluripare (30 di razza Massese e 70 di razza Comisana) per le quali si è estratto il DNA dal pelo conservato presso il laboratorio genetica e servizi (LGS). In questi animali sono stati determinati i genotipi a 10 SNP polimorfici, ovvero 8 nel gene SCD (7 precedentemente descritti più uno già analizzato nella razza Sarda) e in due nel gene DGAT1 presenti in letteratura e per i quali era riportata una associazione con il contenuto in grasso. Tutti gli SNP sono stati genotipizzati con successo in tutti gli animali, ma cinque (tutti nel gene SCD e incluso quello con un effetto nella razza Sarda) non sono risultati polimorfici e sono quindi stati esclusi da ogni ulteriore analisi.

Per quanto riguarda i fenotipi si sono considerati in primo luogo quelli relativi ai controlli funzionali e cioè la produzione nella lattazione, al contenuto percentuale di grasso e proteina e alla quantità di grasso e proteina totale.

Il profilo degli acidi grassi non era disponibile per cui si è proceduto alla sua determinazione. Allo scopo è stato prelevato un campione di latte individuale dai 100 soggetti nello stesso giorno e quando gli animali erano alimentati al pascolo in modo da poter far risaltare le differenze individuali nella sintesi degli



acidi grassi. La frazione lipidica del latte è stata analizzata mediante HPLC e i dati sottoposti ad analisi statistica. È risultato che il fattore più influente sul contenuto dei singoli acidi grassi è la distanza dal parto. Tuttavia anche a parità di distanza dal parto, si possono evidenziare delle notevoli differenze individuali. Ad esempio, il contenuto totale in isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA), un parametro di grosso interesse salutistico, varia di circa sette volte tra minimo e massimo. In definitiva i dati hanno rilevato una forte variabilità individuale dei parametri relativi agli acidi grassi anche a parità di fattori ambientali, questo suggerisce l'esistenza di una variabilità genetica corrispondente.

I dati fenotipici e i dati molecolari sono stati analizzati con gli opportuni metodi statistici per la ricerca di eventuali associazioni. Le associazioni con i caratteri produttivi sono state ricercate utilizzando il data set dei controlli funzionali che comprendeva 246 lattazioni con almeno tre controlli per 86 degli animali in cui erano stati determinati i genotipi mentre per il profilo degli acidi grassi sono stati impiegati i dati sopra descritti, prodotti nel progetto. I dati sono stati trattati con un modello che comprendeva l'effetto dell'ordine di parto, della distanza dal parto, della razza e del genotipo e l'effetto animale entro il genotipo. Le analisi sono state svolte anche separatamente per razza.

Per quanto riguarda il polimorfismo del gene SCD situato nell'introne 4, l'allele C è risultato associato a un maggiore contenuto di proteina percentuale, la grandezza dell'effetto è di dello 0,15 % pari a circa il 20% della variabilità fenotipica. Nella razza Comisana lo stesso allele è risultato significativamente associato anche alla quantità di latte e di proteina. Inoltre lo stesso polimorfismo è risultato correlato al contenuto in acido oleico (C18:1 cis 9) e al contenuto in acidi grassi saturi. In questo caso però l'effetto positivo era determinato dalla presenza dell'allele A.

Un altro SNP del gene SCD situato nell'introne 5 è risultato significativamente legato alla percentuale di proteina nel latte nelle pecore Comisane con un effetto di sostituzione allelica pari a 0,18 %.

Relativamente al gene DGAT1, analizzando i dati senza suddividere le razze, si è evidenziato che il polimorfismo nella regione 5' UTR è in relazione al contenuto di un acido grasso polinsaturo (C20:5, c5, c8, c11, c14, c17) e due monoinsaturi C18:1 trans 10 e C18:1 cis 13.

Infine il secondo polimorfismo del gene DGAT1 situato nell'introne 2 ha mostrato associazioni molto significative con una serie di acidi grassi: C15, C18:1 cis 11, C11, C18:1 trans 9, C 17:1 cis 9, C18:1 trans 12.

In conclusione i dati prodotti hanno evidenziato che:

- Anche a parità di condizioni ambientali esiste una elevata variabilità fenotipica individuale nel profilo degli acidi grassi del latte

- I geni SCD e DGAT1 sono polimorfici nelle razze di interesse per la produzione di latte (Comisana e Massese)
- Un locus SNP del gene SCD influenza la quantità di proteina prodotta per cui può essere considerato negli schemi di selezione

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

D'Andrea Mariasilvia (Ricercatore a tempo determinato)

#### PRODOTTI

- Es. un clone, un software, una metodica di analisi.

#### TRASFERIMENTO

Valutazione dei riproduttori di razza Comisana per il profilo degli acidi grassi e la quantità di proteina nel latte

#### BREVETTI

#### PUBBLICAZIONI

D'ANDREA M., MELE M., DIMAURO C., PILLA F., FRESI P., BRACCIAFERRI C., MACCIOTTA N.P.P. (2010): *Effetto di polimorfismi in geni candidati sulle caratteristiche qualitative del latte ovino*, XIX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C., Pesaro 22-25 settembre 2010.

ANDREA RANDO\*

## Caratterizzazione delle caseine calcio sensibili e delle siero proteine in latte di asina\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

L'ipoallergenicità del latte di asina, che risiede certamente nella frazione proteica, non è stata sufficientemente indagata e la caratterizzazione a livello molecolare delle proteine è ancora in una fase iniziale. Maggiori informazioni riguardano le sieroproteine mentre lo studio delle caseine è piuttosto limitato. Una prima evidenza di polimorfismo quali-quantitativo è stata rilevata in campioni di latte di asine Ragusane in cui Criscione et al. (2009) hanno evidenziato la presenza di pattern isoelettroforetici diversi caratterizzati mediante spettrometria di massa e cromatografia liquida. Il profilo proteico più comune (pattern A) è stato usato come riferimento. Due pattern sono invece risultati difettivi: il pattern B (1 asina) caratterizzato dall'assenza di  $\alpha_{s1}$ -caseina e il pattern C (12 asine) dall'assenza di  $\beta$ -Lattoglobulina II. Obiettivo dell'Unità di Ricerca è stato quello di indagare la natura genetica di tali differenze al fine di identificarne le mutazioni causative.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Il DNA è stato ottenuto da prelievi di sangue o da cellule somatiche del latte. Le sequenze del DNA sono state ottenute attraverso il disegno di appositi primers per l'amplificazione step by step delle diverse regioni che compongono

\* *Università degli Studi della Basilicata, Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali*

\*\* *Unità di ricerca Università della Basilicata, responsabile scientifico prof. Andrea Rando*

i geni della  $\alpha_{s1}$ -caseina (CSN1S1),  $\beta$ -caseina (CSN2) e  $\beta$ -Lattoglobulina II (BLGII). I polimorfismi sono stati evidenziati tramite la sequenza e la comparazione di regioni omologhe di individui diversi (da 8 a 16).

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

Il gene CSN1S1 relativo alla  $\alpha_{s1}$ -caseina è stato sequenziato (acc.n. FN386610) completamente (17053 nucleotidi). Nell'asino, come nel cavallo e nei poligastrici, questo gene è caratterizzato da 19 esoni che sintetizzano una proteina costituita da un peptide leader di 15 aminoacidi e da una proteina matura di 197 aminoacidi. Inoltre, le sequenze delle regioni esoniche di un numero variabile di campioni (da 8 a 15) hanno evidenziato due polimorfismi. Uno dei due polimorfismi, localizzato nel secondo esone, è specifico dell'animale che produce latte privo di  $\alpha_{s1}$ -caseina. Tuttavia, la mutazione osservata non sembra essere causativa di particolari eventi che potrebbero spiegare l'assenza di sintesi. In ogni caso è stato messo a punto un metodo di PCR che permette di identificare i portatori di tale mutazione che, in base ai riscontri fenotipici ottenuti dal gruppo di ricerca diretto dalla prof. Marletta, è tipica della variante genica responsabile dell'assenza di  $\alpha_{s1}$ -caseina nel latte.

Il gene CSN2 relativo alla  $\beta$ -caseina è stato anch'esso sequenziato completamente (9378 nucleotidi) (acc.n. FN598778). Tale gene ha una struttura molto simile a quella osservata nei poligastrici: infatti è organizzato in 9 esoni e, tra questi, l'esone 7 è il più grande (528 nucleotidi) ed è responsabile della sintesi di 176 dei 226 aminoacidi della proteina matura. Anche in questo caso, le sequenze delle regioni esoniche di un numero variabile di campioni hanno evidenziato un polimorfismo nel secondo esone a livello del peptide leader che, oltre a non avere alcun effetto sulla struttura primaria della proteina matura non sembra essere associato a differenze di tipo quantitativo. In collaborazione con la prof. Chianese, che ha osservato alcune varianti elettroforetiche della  $\beta$ -caseina in campioni di latte di asina raccolti nell'ambito del progetto, stiamo effettuando sequenze di regioni specifiche del gene CSN2 allo scopo di identificare le mutazioni responsabili delle differenze osservate.

Infine, nell'ambito del progetto è stato sequenziato il gene della  $\beta$ -Lattoglobulina di tipo II: le sequenze nucleotidiche delle regioni codificanti degli alleli B e C sono state depositate nella banca dati dell'EBI (acc. n° HM012799.1, HM012800.1). Le coppie di *primers* utilizzate sono state disegnate sulla base della sequenza del gene BLG del cavallo (acc. n°

AF107201). Nell'asino, come nel cavallo, il gene è costituito da 6 esoni di lunghezza compresa tra i 17 e 140 nt (546 nucleotidi complessivamente). Gli introni hanno una lunghezza che varia dai 256 nt del V ai 1526 nt del III. Inoltre è stata sequenziata una regione di 226 nt a monte del primo esone. L'analisi di sequenza è stata condotta complessivamente su 10 individui tra normali e "difettivi", cioè soggetti che presentano un pattern IEF di tipo C, apparentemente privo di  $\beta$ -Lattoglobulina di tipo II. La proteina è lunga 163 AA con un peptide segnale di 18 AA. Nell'asina la sequenza presenta in complesso 9 sostituzioni aminoacidiche rispetto alla proteina di cavallo. L'esone I è risultato monomorfo e identico a quello del cavallo, mentre 10 transizioni sono state osservate nelle restanti regioni esoniche. Sebbene 3 dei 10 soggetti sequenziati producano latte apparentemente privo di  $\beta$ -Lattoglobulina di tipo II, non sono state identificate le mutazioni responsabili del profilo difettivo nel latte, né alcuna forma di associazione tra polimorfismo genetico e pattern IEF.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Masina Piero (Professore ordinario)  
 Di Gregorio Paola (Professore associato)  
 Marletta Donata (Professore associato)  
 Zuccaro Antonio (Dottorando)  
 Tidona Flavio (Dottorando)

#### PRODOTTI

- Le sequenze ottenute sono depositate presso il sito [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) gestito dallo European Bioinformatics Institute. I metodi di tipizzazione tramite PCR dei polimorfismi evidenziati sono disponibili presso il nostro laboratorio.

#### TRASFERIMENTO

Il metodo di tipizzazione per l'identificazione dei portatori dell'allele nullo della  $\alpha_{s1}$ -caseina è pronto per l'utilizzazione da parte degli allevatori di asini.

#### BREVETTI

PUBBLICAZIONI

- 1) DI GREGORIO P., RANDO A., ZUCCARO A., MARLETTA D., COSENZA G., CHIANESE L., RAMUNNO L. (2010): *DNA sequences of milk protein genes in Equus asinus*, 32nd Conference for the International Society for Animal Genetics, 26-30 luglio 2010, Edinburgh, Scotland.

Unità operativa componenti funzionali  
per la salute umana in alimenti di origine animale





## Relazione del coordinatore

L'Unità operativa ha indirizzato le proprie ricerche su tre distinte aree di indagine: a) l'azione ACE inibitoria e ipotensiva dei componenti del latte, b) l'azione calciofissatrice dei caseinofosfopeptidi e c) l'azione regolatoria del metabolismo energetico dei componenti del latte.

Sono state sviluppate quattro linee di ricerca, due per lo studio dell'azione ACE inibitoria e ipotensiva, condotte presso l'Università di Viterbo, una per quella calciofissatrice e una per la regolazione del metabolismo energetico, condotte presso l'Università di Brescia.

Le due linee di ricerca relative all'azione ACE inibitoria e ipotensiva hanno riguardato:

- a) La comparazione dell'attività ACE inibitoria e dell'attività ipotensiva del latte delle specie bovina, ovina, caprina, bufalina e asinina.
- b) Lo studio nella specie bovina delle:
  - i) differenze nell'attività di ACE inibizione dovute a base genetica
  - ii) attività ACE inibitoria e ipotensiva di derivati del latte, potenzialmente a forte attività.

I risultati ottenuti ampliano le conoscenze sull'azione ACE inibitoria/ipotensiva di componenti del latte di diverse specie, sull'azione calciofissatrice e regolatoria (metabolismo energetico) di peptidi del latte bovino. Taluni risultati, relativi a ricerche mai condotte in precedenza, hanno dato una chiara indicazione di prospettive interessanti per l'impiego di composti del latte e /o suoi derivati come prodotti nutraceutici.

\* *Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Produzioni Animali*

## STATO DELL'ARTE

I cibi funzionali sono alimenti o componenti alimentari che, oltre ad avere proprietà nutritive possono avere azioni benefiche sulla salute umana. Tra i componenti molta attenzione è rivolta ai peptidi bioattivi che presentano differenti attività biologiche (oppiode antagonista e agonista, antiipertensiva, antitrombotica, trasporto di minerali, antimicrobica). Questi peptidi vengono liberati dalle proteine presenti negli alimenti mediante l'azione degli enzimi proteolitici che sono nell'apparato gastrointestinale umano. Differenti peptidi bioattivi (Murray B.A. and FitzGerald R.J., 2007) sono liberati dalla proteolisi delle proteine presenti nel latte, nella carne, nel pesce e nei prodotti di origine vegetale.

Numerosi sono gli studi *in vivo* sia su ratti ipertesi che su uomo per la determinazione dell'azione ipotensiva di alcuni biopetidi (Cadée J.A. et al., 2007; Tsai J.S. et al., 2008; Van Mierlo L.A.J. et al., 2009). Altri approcci sperimentali utilizzati per dimostrare l'attività antiipertensiva sono gli studi *in silico* e *in vitro*. *In silico* viene simulata la digestione mediante appositi software (Vercruysse L. et al., 2009), *in vitro* la digestione gastrointestinale è simulata con l'impiego di enzimi digestivi e per i peptidi che si liberano, separati mediante tecniche cromatografiche, viene saggiata l'attività ACE-inibitoria (Ohsawa K. et al., 2008; Weimann C. et al., 2009; Miguel M. et al., 2009).

I caseinofosfopeptidi (CFP), possiedono la capacità di legare e solubilizzare minerali come  $\text{Ca}^{2+}$ . L'elevata biodisponibilità di  $\text{Ca}^{2+}$  nel latte e derivati è stata in parte attribuita alla produzione di CFP dotati di diversi livelli di fosforilazione, con una relazione diretta fra grado di fosforilazione e capacità di trasporto dei minerali. Diversi studi (Donida B.M. et al., 2009; Cosentino S. et al., 2009) hanno evidenziato come la regione fosforilata dei CPP e la parte N-terminale siano necessarie per un effetto positivo dei fosfopeptidi sull'assunzione di calcio in cellule umane in cultura.

Le siero proteine, a seguito di proteolisi, liberano dei peptidi in grado di inibire la proteasi DDP4 (dipeptidilpeptidasi) con conseguente aumento in circolo di "incretine". Quest'ultime giocano un ruolo importante nell'omeostasi glicemica. Infatti inducono il senso di sazietà, potenziano la secrezione insulinica in risposta al glucosio, sopprimono la secrezione di glucagone e aumentano la sopravvivenza delle cellule beta-pancreatiche.

Dal punto di vista genetico, l'attività biologica dei peptidi bioattivi derivati da digestione di prodotti di origine animale può essere influenzata da scambi o delezioni di aminoacidi derivanti da mutazioni geniche. Rispetto a questo evento l'interesse dal punto di vista applicativo è legato alla possibilità di individuare popolazioni animali e/o di selezionare particolari genotipi che diano prodotti che rilasciano in fase digestiva umana peptidi con elevata attività biologica.

ALESSANDRO NARDONE\*

## Comparazione dell'attività ACE inibitoria e dell'attività ipotensiva del latte delle specie bovina, ovina, caprina, bufalina e asinina\*\*

### OBIETTIVO

Confrontare in diverse specie l'attività ACE inibitoria e ipotensiva di peptidi, latte totale scremato e caseine.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Sono state indagate le specie: bovina, ovina, caprina, bufalina e asinina.

Sono state utilizzate tre metodologie di analisi: *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

#### Analisi *in silico*

Sono stati utilizzati gli aplotipi caseinici noti per le specie bovina, ovina, caprina, bufalina e asinina, per un totale di 37 aplotipi (tab. 1). Al fine di comparare il pattern di peptidi che si liberano da tutti gli aplotipi, a seguito di digestione gastrointestinale delle caseine, è stata simulata una digestione con Peptide cutter (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/>) utilizzando gli enzimi pepsina, tripsina, chimotripsina. A ogni peptide liberato è stato assegnato un valore di  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$  = concentrazione di ogni peptide per inibire al 50% l'attività dell'enzima ACE), utilizzando i valori di ACE inibizione di peptidi ACE inibitori per i quali sono presenti i valori di  $IC_{50}$  nel database Biopep (Iwaniak et al., 2005; 545 peptidi) e nel database prerealizzato allo

\* Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Produzioni Animali

\*\* Unità di ricerca Università di Viterbo, responsabile scientifico prof. Alessandro Nardone

SPECIE	APLOTIPO αS1, αS2, β, κ
B.TAURUS	B,A,A2,A; B,A,A1,A; B,A,A1,E; B,A,B,B; B,A,A2,B; B,A,A1,B; B,A,A2,E; C,A,A3,A; B,A,B,A; A,A,A,D; A,B,A,B; A,C,A,D; A,F,A,D; A,E,A,D; B,A,A,A; B,A,A,B; B,A,A,D; B,C,A,D; B,F,A,D; EBAA, EBAD, E,C,A,D; F,A,A,D; F,C,A,D; F,F,A,A; F,F,A,D; 0,C,A,A;
C. HIRCUS	
O.ARIES	C,A,1,1; C,B,1,1; D,A,1,1; D,B,1,1; H,A,1,1; H,B,1,1;
B.BUBALIS	H,B,1,1; S,1,1,1;
E. ASINUS	2,1A,2,2; 2,1B,2,2;

Tab. 1 *Aplotipi considerati per singola specie*

scopo entro il progetto Selmol, (<http://www.selmol.eu/>; 119 peptidi). Per ogni aplotipo caseinico è stato stimato il valore complessivo di efficienza di ACE inibizione (EAI) utilizzando la seguente formula:

$$\sum_1^n 1/IC_{50}$$
 (n= numero di peptidi derivanti da ogni aplotipo).

I valori di EAI così ottenuti sono stati utilizzati per la comparazione tra le specie prese in esame (sommando i valori di EAI degli aplotipi della specie) e tra gli aplotipi entro ciascuna specie.

Analisi *in vitro*

Per l’analisi *in vitro* è stato utilizzato latte scremato e caseinato, estratto da latte delle tre specie che hanno dato il valore più elevato di EAI all’analisi *in silico*: *E. asinus*, *B. taurus* e *B. bubalis*. Inizialmente il latte scremato e le caseine sono stati sottoposti a una digestione gastrointestinale simulata *in vitro* utilizzando pepsina (1h 30min a 37°C) e tripsina-chimotripsina (5h 30min a 37°C) e successivamente è stata determinata la concentrazione, mediante fluorimetro, degli idrolizzati. L’attività ACE inibitoria degli idrolizzati è stata determinata utilizzando un saggio spettrofotometrico, in accordo al protocollo di Cushman & Cheung (1971), ed è stata espressa con il parametro IC<sub>50</sub>. Per tutti i campioni i saggi sono stati ripetuti in triplicato.

Analisi *in vivo*

È stato valutato l’effetto ipotensivo del latte e del caseinato delle due specie (*B. taurus* e *E. asinus*) che hanno dato un’attività ACE inibitoria più forte all’analisi *in vitro*.

Per l’analisi *in vivo* sono stati utilizzati ratti SHR (spontaneously hyper-

	B. TAURUS	B. BUBALIS	C. HYRCUS	O. ARIES	E. ASINUS
APLOTIPI CONSIDERATI/NOTI	9/9	2/2	18/18	6/6	2/2
PEPTIDI RILASCIATI (N°)	136-139	132	99-131	127-130	132
PEPTIDI CON IC <sub>50</sub> NOTO (N°)	25-26	23	18-24	23	17
EAI	0,448-0,449	0,445	0,228-0,319	0,319	1,041

Tab. 2 Numero dei peptidi rilasciati e numero di peptidi ACE inibitori per specie

tensive rat) di 10 settimane del peso di 250 gr. Gli animali sono stati stabulati alla temperatura di 24°C, con un ciclo giorno notte di 12h, nutriti *ad libitum* con una dieta standard e acqua. Il controllo positivo era captopril a una dose di 2mg/kg mentre il controllo negativo era acqua naturale. I trattamenti sono stati somministrati una volta a settimana (per 5 settimane) tra le 7 e le 9 a.m. La pressione sanguigna (sistolica e diastolica) è stata misurata a 0h, 6h, 12h e 24h dal trattamento utilizzando un sistema non invasivo tail-cuff.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

### Analisi *in silico*

La digestione gastrointestinale *in silico* dei 37 aplotipi delle caseine ha prodotto 352 peptidi differenti e per ogni specie è stato calcolato di ciascun aplotipo il valore di EAI. In *E. asinus* (EA) il numero totale di peptidi è 132, di cui per 17 si conosce il valore di IC<sub>50</sub> (la k-caseina non libera peptidi con IC<sub>50</sub> noto). L'EAI è pari 1.041 (tab. 2). In *B. taurus* (BT) il numero totale di peptidi varia da 136 (aplotipi BAA<sub>2</sub>A, BAA<sub>2</sub>B, BAA<sub>2</sub>E) a 139 (aplotipo CAA<sub>3</sub>A). Il numero di peptidi per cui si conosce il valore di IC<sub>50</sub> è di 26 per l'aplotipo CAA<sub>3</sub>A, con un valore di EAI pari 0.449, e 25 per i restanti 8 aplotipi, con un valore uniforme di EAI, per tutti e 8, pari a 0.448 (tab. 2). In *B. bubalis* (BB) il numero totale di peptidi è 132, dei quali solo per 23 si conosce il valore di IC<sub>50</sub>, con l'EAI pari a 0.445 (tab. 2). Per *C. hyrcus* (CH) il numero varia da 99 (aplotipo 0CAA) a 131 (aplotipo ABAB). Il numero di peptidi di cui si conosce il valore di IC<sub>50</sub> varia da un minimo di 18 a un massimo di 23. Il valore di EAI varia da 0.228 a 0.319 (tab. 2). In *O. aries* (OA) il numero di peptidi rilasciati varia da un minimo di 127 (aplotipo HA11) a un massimo di 130 (aplotipo CB11) (tab. 2). Il numero di peptidi di cui si conosce il valore di IC<sub>50</sub> è 23 e l'EAI è pari 0.319 per tutti gli aplotipi.

BT/BB/OA/CH	BT/OA/CH/EA	BT/BB/OA/EA	BB/OA/CH/EA	BT/BB/EA	BT/OA/CH	BB/OA/CH
43	2	1	2	1	9	4
BT/BB	BT/OA	BT/CH	BT/EA	BB/OA	BB/CH	OA/CH
33	1	1	1	1	1	40

Tab. 3 *Peptidi comuni tra le specie*

Dalla comparazione interspecie emerge che:

- di tutti i peptidi liberati, 103 sono presenti solo in EA, 32 solo in BT, 27 solo in BB, 22 in CH e 15 in OA; il numero di peptidi comuni a tutti e cinque le specie è pari a 13. Il numero di peptidi che risultano comuni dal confronto di ciascuna specie con le altre quattro è riportato nella tabella 3.
- Rispetto all'efficienza di ACE inibizione le specie presentano una elevata variabilità. In base al nostro indice la specie asinina ha una efficienza (EAI=1,041) più che doppia di quella delle specie bovina e bufalina (0.448-0.449 e 0.445 rispettivamente), e più che tripla della efficienza di quella riscontrata per le due specie di piccoli ruminanti (0.319 per OA e 0.299 per CH).

Da ultimo l'analisi *in silico* ha accertato il considerevole numero di peptidi che si possono ottenere dalle caseine delle cinque specie prese in esame rispetto al limitato numero di peptidi per i quali è noto il valore di  $IC_{50}$ .

#### Analisi *in vitro*

Il valore di  $IC_{50}$  dei latti scremati è risultato mediamente forte per tutte e tre le specie prese in esame (asinina, bovina e bufalina), risultate a più elevata attività ACE inibitoria alla analisi *in silico* (tab. 4). Per le tre specie i valori di  $IC_{50}$  si distribuiscono nello stesso ordine dell'indice EAI. Invece per quanto riguarda il caseinato, il valore più forte di  $IC_{50}$  è dato dai bovini, ma anche per le altre due specie i valori riscontrati sono da ritenere molto forti. (tab. 4).

L'attività ACE inibitoria del caseinato bovino era stata valutata precedentemente da Miguel et al. (2009), ma il valore di  $IC_{50}$  era 2,5 volte maggiore (quindi meno forte) rispetto a quello da noi valutato. La differenza probabilmente è da attribuire al fatto che noi abbiamo simulato una digestione con tre enzimi (pepsina, chimo-tripsina e tripsina) che meglio simula quella umana, mentre Miguel ha utilizzato solo la pepsina. È da ritenere che l'aggiunta della chimo-tripsina e tripsina causi la formazione di peptidi più piccoli, che interagiscono più facilmente con il sito attivo dell'enzima ACE, risultando mag-

PRODOTTO	IC <sub>50</sub> ±ES (UG/ML)	PRODOTTO	IC <sub>50</sub> ±ES (UG/ML)
LATTE ASININO	63,52±3,58	Caseinato bovino	19,03±3,33
LATTE BOVINO	85,65±7,03	Caseinato asinino	30,71±3,10
LATTE BUFALINO	91,17±10,21	Caseinato bufalino	32,3±1,58

Tab. 4

PRODOTTO	ENZIMI	IC <sub>50</sub> µG/ML	BIBLIOGRAFIA
BOVINE CASEIN	Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin	19,03±3,33	Il seguente studio (Miguel et al., 2009)
BOVINE CASEIN	Pepsin	52.8±2.6	
OVINE CASEIN	Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin	56.62	(Gómez-Ruiz et al., 2007)
WHEY PROTEIN	Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin	70	(Vermeirssen et al., 2004)
ROYAL JELLY	Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin	99	(Matsui et al., 2002)
PEA	Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin	120	(Vermeirssen et al., 2004)
MUNG BEAN	Pepsin, Pancreatin	510±8	(Li et al., 2006)
ACTINE	Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin	611	(Vercruyssen et al., 2009)
OYSTER	Pepsin,	>>1000	(Wang et al., 2008)

Tab. 5 Valore di IC<sub>50</sub> delle proteine estratte da diversi alimenti

giormente ACE inibitori. Il confronto del valore di IC<sub>50</sub> del caseinato bovino con quelli presenti in letteratura per proteine estratte da altri alimenti (tab. 5) supporta la forte azione ACE inibitoria del caseinato bovino da noi trovato.

### Analisi *in vivo*

L'analisi *in vivo*, condotta sulle due specie, bovina e asinina, risultate a più elevata azione ACE inibitoria alla analisi *in vitro*, non ha riscontrato, né per il latte scremato né per il caseinato di entrambe le specie, una azione ipotensiva significativamente diversa dal controllo negativo (acqua), né sulla pressione sistolica nè sulla diastolica (fig. 1 e fig. 2).

Il nostro risultato sul caseinato bovino è in linea con quanto osservato da Miguel et al. (2009), mentre non vi sono riscontri in letteratura per il latte scremato bovino in quanto è la prima volta che viene indagata la sua attività ipotensiva *in vivo*. Il risultato contrastante tra forte azione ACE inibitoria *in vitro* e assenza di azione ipotensiva *in vivo*, da noi trovato per il caseinato di bovino e di asino, trova riscontro con analoghe discordanze riportate in letteratura per i lactotripeptidi (Wuerzner et al., 2009; Mierlo et al., 2009). I risultati delle tre analisi in comparazione sottolineano l'importanza di utilizzare l'analisi *in vivo* per stimare la reale azione ipotensiva dei prodotti.

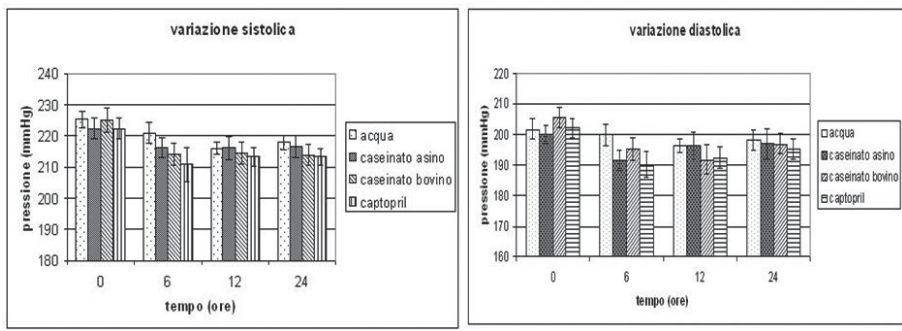


Fig. 1 Andamento della pressione sistolica e diastolica nelle 24 ore a seguito della somministrazione dei lattii scremati

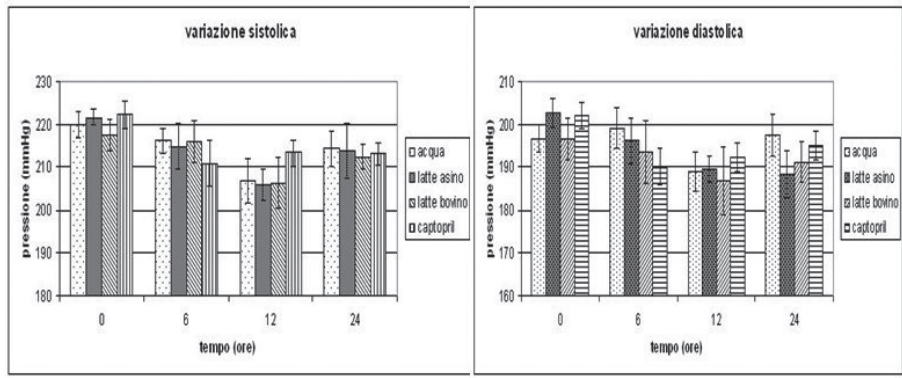


Fig. 2 Andamento della pressione sistolica e diastolica nelle 24 ore a seguito della somministrazione dei caseinati



## Studio nella specie bovina delle differenze nell'attività di ACE inibizione dovute a base genetica e dell'attività ACE inibitoria/ipotensiva di derivati del latte, potenzialmente a forte attività\*\*

### OBIETTIVO

Accertare, nella specie bovina, risultata a forte azione ACE inibitoria/ipotensiva i) la variabilità a base genetica, utile a fini selettivi e ii) l'attività ACE inibitoria/ipotensiva di derivati del latte, potenzialmente a forte attività.

### MATERIALI E METODOLOGIE

#### *a) Ricerca di differenze a base genetica nell'azione ACE inibitoria*

Sono stati scelti quattro genotipi al locus delle caseine ( $\alpha_{s1}$ - $\alpha_{s2}$ - $\beta$ - $\kappa$ : BAA<sub>2</sub>A/BABB, BAA<sub>2</sub>A/BAA<sub>1</sub>A, BAA<sub>2</sub>A/BAA<sub>1</sub>E, BAA<sub>2</sub>A/BAA2A), con frequenza maggiore del 5% (in accordo a Boettcher et al., 2004, in una popolazione di bovine, in lattazione, di razza Frisona). Per ogni genotipo sono state scelte tre bovine, a stati di lattazione diversi, e da ciascuna sono stati prelevati tre campioni di latte in tre periodi differenti dell'anno. Da ogni campione di latte è stato estratto il caseinato secondo il protocollo di Zittle (1966) modificato.

Dai campioni di caseinato sono state purificate, mediante cromatografia a scambio ionico secondo il metodo di Leaver and Law (1992), le 4 frazioni caseiniche ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ). Dalle frazioni  $\beta$  e  $\kappa$  caseina sono state ottenute anche degli eluati arricchiti per le diverse varianti: A1/A2,

\* Università degli Studi della Toscana, Dipartimento di Produzioni Animali.

\*\* Unità di ricerca Università di Viterbo, responsabile scientifico prof. Alessandro Nardone

A2/B per la  $\beta$ -caseina ; A/A, A/B, A/E per la  $\kappa$ - caseina, (le  $\alpha_{s1}$  e  $\alpha_{s2}$  sono monomorfe).

#### *Analisi in vitro*

I caseinati e le frazioni caseiniche estratte dai 36 campioni di latte sono stati sottoposti a una digestione gastrointestinale simulata *in vitro* utilizzando pepsina (1h 30min a 37°C) e tripsina-chimotripsina (5h 30min a 37°C) e successivamente è stata determinata la concentrazione degli idrolizzati mediante fluorimetro. Per ogni campione di caseinato la digestione è stata triplicata. L'attività ACE inibitoria degli idrolizzati è stata determinata utilizzando un saggio spettrofotometrico, in accordo al protocollo di Cushman & Cheung (1971), ed è stata espressa con il parametro  $IC_{50}$ . Per i 108 idrolizzati di caseinato i saggi sono stati triplicati.

#### *b) attività ipotensiva di derivati del latte bovino, potenzialmente a forte attività*

È stato scelto il Parmigiano Reggiano di 32 mesi in quanto il lungo periodo di stagionatura favorisce i fenomeni di proteolisi con rilascio di peptidi ACE inibitori (Meyer et al., 2009; Ong and Shah, 2008) potenzialmente favorevoli all'attività ipotensiva.

Da un campione di Parmigiano Reggiano di 32 mesi prodotto con latte di sole bovine Frisone, fornito dal Consorzio Parmigiano Reggiano, è stata estratta la frazione solubile (WSF) secondo il protocollo di Meyer et al. (2009).

#### *Analisi in vitro*

La WSF è stata sottoposta a una digestione gastrointestinale simulata *in vitro* utilizzando pepsina (1h 30min a 37°C) e tripsina-chimotripsina (5h 30min a 37°C) e successivamente è stata determinata la concentrazione dell'idrolizzato mediante fluorimetro. È stata determinata l'attività ACE inibitoria sia della WSF non digerita sia dell'idrolizzato (WSF digerita) utilizzando un saggio spettrofotometrico, in accordo al protocollo di Cushman & Cheung (1971), ed è stata espressa con il parametro  $IC_{50}$ . I saggi sono stati ripetuti in triplicato.

GENOTIPO ( $\alpha_{s1}$ , $\alpha_{s2}$ , $\beta$ , $\kappa$ )	IC <sub>50</sub> $\pm$ ES ( $\mu$ G/ML)
BAA <sub>2</sub> A/BABB	22.74 $\pm$ 1.34
BAA <sub>2</sub> A/BAA <sub>1</sub> A	23.76 $\pm$ 1.64
BAA <sub>2</sub> A/BAA <sub>1</sub> E	26.51 $\pm$ 1.40
BAA <sub>2</sub> A/BAA <sub>2</sub> A	25.86 $\pm$ 1.52

Tab. 6 Valori di IC<sub>50</sub> dei quattro genotipi

FRAZIONE/VARIANTE	IC <sub>50</sub> $\pm$ ES ( $\mu$ G/ML)
$\alpha_{s1}$	18,47 $\pm$ 0,75
$\alpha_{s2}$	29,62 $\pm$ 5,5
Pool $\beta$	27,64 $\pm$ 1,3
$\beta$ -A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	29,3 $\pm$ 0,2
$\beta$ -A <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	33,1 $\pm$ 2,2
$\beta$ -A <sub>2</sub> B	37,8 $\pm$ 1,1
Pool $\kappa$	33,7 $\pm$ 1,04
$\kappa$ -AB	38,4 $\pm$ 3,22
$\kappa$ -AA	39,20 $\pm$ 3,9
$\kappa$ -AE	40,9 $\pm$ 1,3

Tab. 7 Valori di IC<sub>50</sub> delle frazioni caseiniche*Analisi in vivo*

Per la WSF non predigerita è stata valutata la capacità ipotensiva in ratti SHR (spontaneously hypertensive rat). Sono stati utilizzati 15 ratti di 10 settimane del peso di 250 gr. Gli animali sono stati stabulati alla temperatura di 24°C, con un ciclo giorno notte di 12h, nutriti *ad libitum* con una dieta standard e acqua naturale. Il controllo positivo era captopril a una dose di 2mg/kg mentre il controllo negativo era acqua naturale. I diversi trattamenti sono stati somministrati una volta a settimana (per 5 settimane) tra le 7 e le 9 a.m. La pressione sanguigna (sistolica e diastolica) è stata misurata a 0h, 6h, 12h e 24h dal trattamento utilizzando un sistema non invasivo tail-cuff.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

*a) Ricerca di differenze a base genetica nell'azione ACE inibitoria**Analisi in vitro*

I caseinati estratti dal latte dei diversi genotipi al locus delle caseine hanno dato valori forti di IC<sub>50</sub> (da 22,74 a 25,86). Le differenze tra i genotipi non sono risultate significative (tab. 6).

PEPTIDE	IC <sub>50</sub> ±ES (UM)
NSL	263,8147±55,9 <sup>A</sup>
TER	234,1351±28,10 <sup>ABa</sup>
VYFPFGPIPNL	103,5663±13,04 <sup>Bb</sup>
VYFPFGPIH	28,2381±8,6 <sup>C</sup>
TESQS	> 1000
QSL	> 1000

Tab. 8 Valori di ACE inibizione dei sei peptidi sintetici

Le frazioni caseiniche hanno dato tutte valori forti di IC<sub>50</sub>. Particolarmente potente è risultata l'azione della frazione caseinica  $\alpha_{s1}$  significativamente diversa ( $P < 0,01$ ) da quella delle altre tre frazioni e da quella delle singole varianti delle frazioni  $\beta$  e  $\kappa$  (tab. 7).

Va sottolineato che sia i risultati relativi ai caseinati dei tipi genetici sia quelli delle frazioni caseiniche non hanno riscontro in letteratura in quanto mai indagati precedentemente.

*Approfondimento.* I risultati acquisiti con la linea di ricerca 2 hanno motivato un approfondimento sull'azione ACE-inibitoria di peptidi sintetici derivanti da varianti differenti della  $\beta$  caseina bovina.

Questa frazione, benché abbia dato un valore di IC<sub>50</sub> meno forte della frazione  $\alpha_{s1}$ , a differenza di quest'ultima monomorfa presenta varianti genetiche che liberano peptidi diversi a seconda del polimorfismo. Tra i 30 peptidi che possono essere liberati dalla  $\beta$  caseina sono stati scelti i soli sei peptidi che risultano diversi tra le tre varianti (A1, A2 e B) presenti nei quattro genotipi da noi indagati.

Le analisi *in vitro* ha evidenziato una elevata variabilità di IC<sub>50</sub> tra i sei peptidi prescelti (tab. 8), e per uno di questi, il peptide VYFPFGPIH, il valore di IC<sub>50</sub> è risultato pari a 28.24, che lo colloca al quinto posto tra i peptidi ad attività ACE inibitoria nota.

Con la determinazione del valore di IC<sub>50</sub> di questi sei peptidi, il progetto ha incrementato del 25% il numero di peptidi del latte per i quali è oggi noto il valore di IC<sub>50</sub>.

#### *b) Attività ipotensiva di derivati del latte bovino, potenzialmente a forte attività*

##### *Analisi in vitro*

I valori di ACE inibizione sia della frazione solubile estratta da Parmigiano Reggiano di 32 mesi digerita differisce significativamente (168,24 vs 310,80) da quella non digerita. Comunque entrambi i valori sono da ritenere di debole azione.

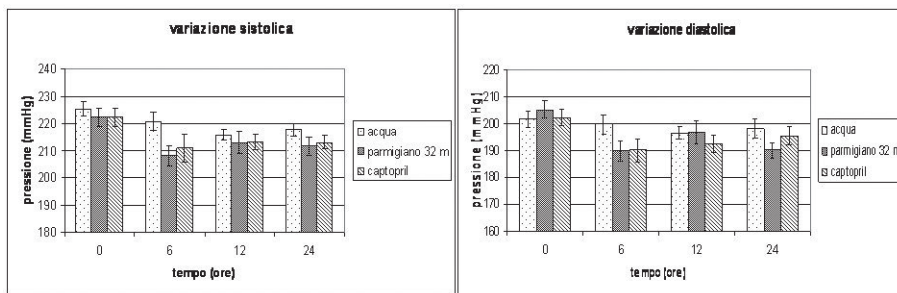


Fig. 3 Andamento della pressione sistolica e diastolica nelle 24 ore con i diversi trattamenti

### Analisi *in vivo*

La frazione solubile del Parmigiano Reggiano somministrata ai ratti, ha provocato, a 6 ore dalla somministrazione, sia per la pressione sistolica sia diastolica, un abbassamento significativo rispetto al controllo negativo (acqua) e un andamento analogo a quello determinato dal controllo positivo (captopril), mettendo in evidenza una interessante azione ipotensiva del prodotto, mai accertata in precedenza.

In conclusione i risultati più significativi delle linee di ricerca sull'azione ACE inibitoria/ipotensiva dei componenti del latte riguardano l'ampia gamma di peptidi individuati, che vengono rilasciati in fase di digestione gastrointestinale, a fronte della quale soltanto per un numero limitato è noto il valore di  $IC_{50}$ . Peraltro in merito a questa situazione la ricerca ha dato un contributo significativo determinando il valore di ulteriori 6 peptidi rispetto ai 26 già noti. Di particolare interesse è il valore di ACE inibizione accertato per il peptide VYPFPGPIH, che lo colloca tra quelli a più forte azione, verso i quali vi è una grande attenzione della ricerca internazionale di settore.

L'assenza di variabilità nella azione ACE inibitoria dei caseinati relativi a genotipi bovini diversi, non fa escludere del tutto l'interesse per un'azione selettiva mirata. Ciò sulla base sia delle differenze significative accertate tra i valori di  $IC_{50}$  dei differenti peptidi riconducibili ai diversi polimorfismi della  $\beta$  caseina sia della forte azione ACE inibitoria riscontrata per la caseina  $\alpha_{s1}$ . In particolare per questa frazione in letteratura risulta un valore di ereditabilità medio-alto ( $h^2 = 0,47$ , Schopen, 2009). Infine di grande rilievo appare il risultato acquisito relativo all'azione ipotensiva della frazione solubile del Parmigiano Reggiano, mai indagata precedentemente su nessun tipo di formaggio.

Da ultimo, pur se non è da escludere la utilità di ulteriori approfondimenti, l'insieme dei risultati, in particolare quelli relativi al Parmigiano e alle frazioni caseiniche, fa ritenere che esistano concrete prospettive per l'impiego di composti e /o derivati del latte come prodotti nutraceutici.

#### BIBLIOGRAFIA

- BOETTCHER P.J. ET AL. (2004): «J. Dairy Sci.», 87, pp. 4311-7.  
 CADÉE J.A. ET AL. (2007): «Amer.J.Hypertens.», 20, pp. 1-5.  
 COSENTINO S. ET AL. (2010): «J Nutr Biochem.», 21 (3), pp. 247-254.  
 CUSHMAN D.W. AND CHEUNG H.S. (1971): «Biochem Pharmacol», 20 (7), pp. 1637-48.  
 DONIDA B.M. ET AL. (2009): «Peptides», 30 (12), 2233, 41.  
 GÓMEZ-RUIZ J.Á. ET AL. (2007): «Electrophoresis», 28, pp. 4202-11.  
 IWANIAK A. ET AL. (2005): «Acta Alimentaria», 34 (4), pp. 417-425.  
 LI G.H. ET AL. (2006): «Eur.Food.Res.Technol.», 222, pp. 733-736.  
 MATSUI T. ET AL. (2002): «J.Nutr.Biochem.», 13, pp. 8-16.  
 MEYER J. ET AL. (2009): «J.Dairy Sci.», 92, pp. 826-836.  
 MIERLO L.A.J. ET AL. (2009): «Am. J. Clin. Nutr.», 89, pp. 1-7.  
 MIGUEL M. ET AL. (2009): «Food Chem.», 112, pp. 211-214.  
 MURRAY B.A. AND FITZGERALD R.J. (2007): «Curr.Pharm.Design.», 13, pp. 1-19.  
 OHSAWA K. ET AL. (2008): «J.Agri.Food Chem.», 56, pp. 854-858.  
 ONG L. AND SHAH N.P. (2008): «Food Sci. and Tech.», 41, pp. 1555-1566.  
 SCHOPEN G.C.B. (2009): «J.Dairy Sci.», 92, pp. 1182-1191.  
 TSAI J.S. ET AL. (2008): «Food Chem.», 106, pp. 552-558.  
 VAN MIERLO L.A.J. ET AL. (2009): «Am.J.Clin.Nutr.», 89, pp. 1-7.  
 VERCRUYSE L. ET AL. (2009): «Peptide», 30, pp. 575-582.  
 VERMEIRSEN V. ET AL. (2004): «Biochimie», 86, pp. 231-9.  
 WANG J. ET AL. (2008): «Food Chem», 111, pp. 302-308.  
 WEIMANN C. ET AL.: «J.Dairy Sci.», 92, pp. 1885-1888.  
 WUERZNER G. ET AL. (2009): «J. Of Hyper.», 27, pp. 1404-1409.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Di Giovanni Michela (Assegnista)  
 Marchitelli Cinzia (Ricercatore a tempo determinato)  
 Cicconardi Francesco (Assegnista)  
 Marabottini Rosita (Assegnista)  
 Danieli Pier Paolo (Ricercatore)  
 Bernabucci Umberto (Professore associato)  
 Antonio Trani (Assegnista)  
 Di Luccia Aldo (Professore associato)

## PRODOTTI

- Implementazione di un Banca dati di 119 peptidi derivanti da diverse proteine animali e vegetali
- Determinazione del valore di  $IC_{50}$  di 6 nuovi peptidi derivanti da latte bovino
- Determinazione del valore ACE inibizione delle frazioni caseiniche del latte bovino
- Determinazione dell'attività ACE inibitoria e ipotensiva dell'estratto solubile di Parmigiano Reggiano
- Implementazione di un indice per il calcolo della efficienza ACE inibitoria
- Standard HPC Grant CASPUR 2009 "Simulazione di dinamica molecolare per lo studio dell'interazione tra caseinofosfopeptidi e l'angiotensin converting enzyme"

## TRASFERIMENTO

Possibilità di trasferire alla selezione le differenze riscontrate a base genetica sulla efficienza ACE inibitoria

Possibilità di fornire elementi determinanti per la realizzazione di prodotti nutraceutici ad azione ACE inibitoria e/o ipotensiva derivati dal latte bovino

## BREVETTI

È in fase di valutazione il deposito di un brevetto su azione ACE inibitoria/ipotensiva di  $\alpha_{s1}$  CN e Parmigiano

## PUBBLICAZIONI

- 1) DI GIOVANNI M., MARCHITELLI C., CICCONARDI F., BERNABUCCI U. AND NARDONE A. (2009): *Comparison of ACE inhibitor in cow, buffalo and goat milk by in silico and in vitro digestion of casein*, Proceedings of the A.S.P.A. (Associazione Scientifica Produzioni Animali), XVIII Congress, Palermo, Italy, 9-12 June, pp. 350.
- 2) MARCHITELLI C., DI GIOVANNI M., GROTTESI A., MANCINI G., CHILLEMI G. AND NARDONE A. (2010): *Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived by different bovine  $\beta$ -casein variants: molecular dynamics simulation*, XXXII International Conference on Animal Genetics ISAG, Edinburgh, poster P2039, session Bioinformatics, Statistical Genetics.
- 3) DI GIOVANNI M., CICCONARDI F. MARCHITELLI C., TRANI. A., DANIELI P.P., BERNABUCCI U. AND NARDONE A.: *ACE inhibition of casein genetic variants in B. taurus*, In prep.
- 4) MARCHITELLI C., MARABOTTINI R., DI GIOVANNI M. CICCONARDI F., BERNABUCCI U. AND NARDONE A.: *Antihypertensive effect of water solution fraction extracted from Parmigiano Reggiano*, In prep.

- 5) MARCHITELLI C., DI GIOVANNI M., GROTTESI A., MANCINI G., CHILLEM I G. AND NARDONE A.: *Molecular dynamic simulation on the interaction of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) with biopeptides derived by different bovine  $\beta$ -casein variants*, In prep.



ANNA CAROLI\*

## Studio dell'azione calcio fissatrice dei caseinofosfopeptidi (CFP)\*\*

### OBIETTIVO

Valutare l'attività biologica inerente il trasporto di  $\text{Ca}^{2+}$  di calciofosfopeptidi (CFP) del latte caratterizzati da differenze genetiche nella loro sequenza.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Analisi *in silico*. Le sequenze delle caseine bovine, ovine e caprine sono state allineate mediante il software Bioedit. È stato verificato se il polimorfismo genetico modifica la sequenza dei CFP.

Analisi *in vitro*. È stato valutato su osteoblasti murini l'effetto sulla mineralizzazione ossea di 4 CFP caratterizzati da differenze genetiche nella loro sequenza e ottenuti mediante sintesi chimica.

### RISULTATI E CONCLUSIONI

#### Analisi *in silico*

Le sequenze delle caseine bovine, caprine e ovine sono state allineate e sono stati ricercati nelle sequenze caprine e ovine i CFP individuati in letteratura

\* Università di Brescia, Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie

\*\* Unità di ricerca Università di Brescia, responsabile scientifico prof. Anna Caroli

per la specie bovina. Inoltre, è stato verificato se la presenza di polimorfismo genetico lattoproteico modificasse la sequenza dei peptidi analizzati. In particolare sono state considerate 3 sequenze dell'alfas1-caseina (CSN1S1), 2 della beta-caseina (CSN2) e 3 dell'alfas2-caseina (CSN1S2), contenenti ciascuna diversi CFP.

Dal confronto delle sequenze analizzate sono state individuate in totale 30 differenze tra le 3 specie e le 52 varianti genetiche considerate in base alla letteratura. Delle 30 differenze riscontrate, 14 riguardano l'alfaS1-caseina. In particolare si riscontrano delle delezioni a carico di una variante genetica nel bovino e di una nella specie caprina. Nella specie bovina questa delezione riguarda una variante rara, la CSN1S1\*H, ed è a carico di un numero di aminoacidi che varia da 2 a 8 a seconda del peptide considerato. La delezione a carico dell'allele CSN1S1\*F caprino riguarda invece tutto il gruppo di peptidi che si originano dalla sequenza compresa fra l'amminoacido 59 e il 78. Gli animali portatori di questo allele, piuttosto comune nella maggior parte delle razze caprine, non sono quindi in grado di produrre tali peptidi e potrebbero potenzialmente presentare una minore attività di trasporto dei minerali.

Meno numerose dal punto di vista quantitativo (7 su 30) sono le differenze riscontrate a livello di beta-caseina. Fra queste riveste particolare interesse la perdita di una serina fosforilata nella variante CSN2\*C, che può essere considerata come la quarta variante in ordine di frequenza nella specie bovina, all'interno del peptide 29-41 di beta-caseina. Infatti, come già detto in precedenza, è stata evidenziata una relazione diretta fra la capacità di trasportare i minerali e il grado di fosforilazione dei peptidi e pertanto la perdita di una serina fosforilata potrebbe ridurre l'attività di questo peptide.

Nell'alfaS2-caseina sono state riscontrate le restanti 9 differenze. Fra queste la variante CSN1S2\*B bovina, diffusa principalmente in *Bos indicus* ma anche in alcune razze di *B. taurus*, è caratterizzata dalla perdita di una serina fosforilata all'interno della sequenza 1-21, con le possibili conseguenze già indicate per la beta-caseina. In conclusione, è stato evidenziato come le numerose varianti genetiche che caratterizzano le caseine bovine, ovine e caprine, modificano la sequenza amminoacidica di frammenti contenenti diversi CFP.

In conclusione, dall'analisi effettuata sono risultati di particolare interesse alcune mutazioni nelle sequenze amminoacidiche, specialmente alcune delezioni e la perdita di residui fosforilati, con potenziale alterazione dell'attività biologica dei peptidi. La selezione di razze o linee genetiche caratterizzate dalla presenza di particolari CFP nel proprio assetto caseinico potrebbe avere importanti ripercussioni sulla valorizzazione del patrimonio zootecnico e sulle caratteristiche nutraceutiche del latte.

*Analisi in vitro*

È stato effettuato uno studio *in vitro* per l'identificazione delle differenze a livello di peptidi bioattivi legate alle sequenze lattoproteiche dei ruminanti e all'eventuale presenza di polimorfismo genetico a livello di tali peptidi. Allo scopo di individuare differenti effetti biologici dovuti alla variabilità genetica nella sequenza amminoacidica, sono stati implementati modelli sperimentali *in vitro* per la valutazione delle attività biologiche inerenti il trasporto del calcio. È stato analizzato l'effetto sulla mineralizzazione ossea, valutata mediante analisi *in vitro* su osteoblasti murini, di quattro CFP caratterizzati da differenze genetiche nella loro sequenza.

I peptidi prescelti sono stati ottenuti mediante sintesi chimica e sono stati testati su linee cellulari osteoblastiche murine (cellule MCT3T3-E1). Due peptidi derivavano dalla beta-caseina del genere Bos: KIEKFQSEKQQQT (variante CSN2\*C) e KIEKFQSpEEQQQT (altre varianti). Gli altri due CFP originano dall'alfas2-caseina: EQLSPISPEENS (variante CSN1S2\*C) e QL-SPTSpEENSI (altre varianti).

I risultati ottenuti hanno dimostrato innanzitutto che i CFP possono influire direttamente sulla crescita cellulare degli osteoblasti, sull'assorbimento del calcio e, in definitiva, sulla deposizione di calcio nella matrice extracellulare. Gli effetti esercitati dai CFP sull'osteogenesi *in vitro* possono essere stimolatori o inibitori. Brevi tratti differenziali nella sequenza di aminoacidi rappresentano i determinanti molecolari dell'attività biologica osservata sugli osteoblasti. Infatti, È stato evidenziato che le due varianti genetiche di CFP derivate dall'alfas2-caseina e caratterizzate solo da una variazione amminoacidica nella loro sequenza differiscono profondamente nelle loro attività biologica. Infatti la sostituzione di treonina con isoleucina riduce la capacità di formare complessi stabili di Ca<sup>2+</sup> in soluzione.

In conclusione, i nostri risultati indicano come i differenti peptidi possano avere un effetto differenziale sulla deposizione del calcio nella matrice extracellulare e come la variazione genetica sia coinvolta in tale effetto. Va inoltre sottolineato come gli effetti diretti dei CFP sull'attività osteoblastica non possano essere predetti solamente in base al loro contenuto in fosfato ma come singole sostituzioni amminoacidiche, come nel caso della variante C di alfas2-caseina, possano modificare significativamente tali effetti.

## COLLABORATORI DELLA RICERCA

Giovanni Tulipano (Ricercatore)  
Omar Bulgari (Assegnista)  
Stefania Chessa (Assegnista)

Daniela Rignanese (Assegnista)  
Daniela Cocchi (Professore Ordinario)  
Alessandro Nardone (Professore Ordinario)

#### PRODOTTI

- Informazioni sulle differenze genomiche delle varianti genetiche dei CFP in bovini, ovini e caprini.
- Implementazione di un protocollo sperimentale per la misurazione della mineralizzazione ossea *in vitro*.

#### TRASFERIMENTO

Dimostrazione dell'effetto diretto di CFP sulla mineralizzazione ossea *in vitro* e delle differenze legate a sostituzioni amminoacidiche.

Possibilità di applicare alla selezione le informazioni ottenute sulle differenze genetiche riscontrate tra specie e, nell'ambito della stessa specie, tra alcune varianti genetiche dei peptidi.

#### BREVETTI

#### PUBBLICAZIONI

- 1) TULIPANO G., CHESSA S., BULGARI O., RIGNANESE D., COCCHI D., CAROLI A.M. (2009): *Analysis in silico and in vitro of caseinophosphopeptides from different milk protein genetic variants*, ADSA-ASAS-CSAS Joint Annual Meeting, Montréal, Québec, Canada, 12-16 July 2009.
- 2) CHESSA S., BULGARI O., RIGNANESE D., TULIPANO G., CAROLI A. (2009): *In silico analysis of caseinophosphopeptides in ruminants*, «Italian Journal of Animal Science», 8 (2), p. 455.
- 3) CAROLI A., BULGARI O., CHESSA S., COCCHI D., TULIPANO G. (2009): *In vitro evaluation of caseinophosphopeptides from different genetic variants on bone mineralization*, «Italian Journal of Animal Science», 8 (2), pp. 42-44.
- 4) TULIPANO G., BULGARI O., CHESSA S., NARDONE A., COCCHI D., CAROLI A. (2010): *Direct effects of casein phosphopeptides on growth and differentiation of in vitro cultured osteoblastic cells (MC3T3-E1)*, «Regulatory Peptides», 160, pp. 168-174.
- 5) CHESSA S., BULGARI O., RIGNANESE D., CERIOTTI G., TULIPANO G., CAROLI A.M. (2010): *Analisi in silico di caseinofosfopeptidi (CFP) nei ruminanti*, «Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria», 61, pp. 47-56.

ANNA CAROLI\*

## Studio dell'attività di regolazione del metabolismo energetico di biopeptidi del latte\*\*

### OBIETTIVO

Identificazione di inibitori della proteasi (DPP4) inattivante le incretine tra i peptidi derivati per proteolisi da proteine del siero nel corso della digestione del latte.

### MATERIALI E METODOLOGIE

- Analisi *in silico* delle sequenze aminoacidiche delle varianti A e B di  $\beta$ -LG bovina.
- Definizione dei prodotti di proteolisi delle proteine del siero sulla base della posizione nella sequenza di putativi siti di taglio proteolitico e della letteratura.
- Selezione dei peptidi più promettenti sulla base dei dati teorici.  
Analisi *in vitro* dell'attività inibitoria mediante saggio enzimatico.

### RISULTATI E CONCLUSIONI

Sono stati selezionati i seguenti peptidi:

- LA: dipeptide dotato di potenziale attività di DPP-4 inibitore. È presente una sola copia nella variante A (22-23) di  $\beta$ -LG mentre la variante B ne contiene due copie (22-23; 117-118).

\* Università di Brescia, Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie

\*\* Unità di ricerca Università di Brescia, responsabile scientifico prof. Anna Caroli

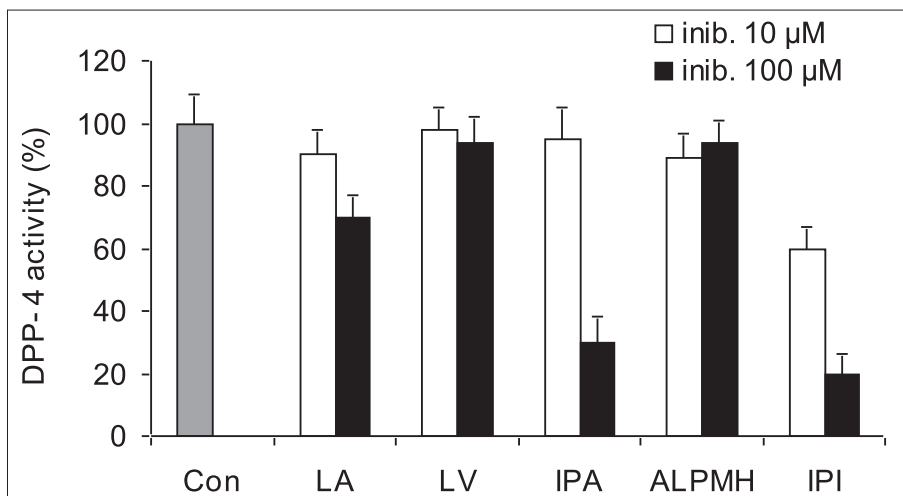


Fig. 1

- LV: sostituisce LA in posizione 117-118 nella variante A rispetto alla B.
- IPA: tripeptide presente in entrambe le varianti (78-80), contiene il dipeptide PA (79-80) che risulta essere un potenziale DPP-4 inibitore.
- LLF: contiene LL (103-104) che è un potenziale DPP-4 inibitore.
- ALPMH: per analogia strutturale con inibitori noti (residuo di Prolina in posizione tre) potrebbe essere un DPP-4 inibitore.

I peptidi IPA, LLF, ALPMH e i dipeptidi LL e LV sono stati descritti in idrolizzati di  $\beta$ -LG ottenuti mediante enzimi digestivi o proteasi batteriche. I peptidi utilizzati sono stati ottenuti per sintesi chimica. È stato condotto un saggio *in vitro* mediante kit commerciale dell'attività inibitoria dei peptidi selezionati sulla proteasi DPP-4. Sono state saggiate due diverse concentrazioni di peptidi. Il peptide IPI è un inibitore noto di DPP-4 ed è stato utilizzato come controllo positivo.

Il peptide LA è risultato avere un effetto inibitorio sull'attività di DPP-4. Tuttavia, l'effetto è risultato modesto se comparato a quello dell'inibitore di riferimento (peptide IPI). Il peptide IPA ha manifestato un effetto inibitorio sull'attività di DPP-4 con efficacia simile all'inibitore di riferimento IPI ma una minore affinità per l'enzima. È risultato infatti attivo solo alla dose 100  $\mu$ M. I peptidi ALPMH e LV non hanno avuto effetti significativi.

La variante B di  $\beta$ -LG contiene due copie di LA mentre la variante A ne contiene una sola a causa della sostituzione aminoacidica di -A- con -V-. La sequenza IPA è presente in un'unica copia in entrambe le varianti. Si potrebbe supporre che dalla digestione di  $\beta$ -LG variante B derivi una maggior quantità

di inibitori di DPP-4 rispetto alla digestione di una quantità equimolare di  $\beta$ -LG variante A. In realtà, non esistono dati a supporto del fatto che dalla digestione di beta-LG variante B si formi il peptide corrispondente agli aminoacidi 117-118. Il legame L-A, infatti, è esso stesso suscettibile di taglio proteolitico da parte di alcune proteasi. Le due varianti di beta-LG potrebbe essere pertanto equivalenti in termini di resa di peptidi DPP-4 inibitori.

Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono che dalla proteolisi della  $\beta$ -LG bovina possa derivare una miscela di deboli inibitori della proteasi DPP-4 in forma di di-aminoacidi o tri-aminoacidi, in grado di rallentare la degradazione delle incretine endogene prodotte dal sistema neuroendocrino a livello intestinale. Questo potrebbe in linea teorica contribuire agli effetti positivi dell'ingestione di proteine del siero sul controllo glicemico post-prandiale già descritti.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Giovanni Tulipano (ricercatore)  
Daniela Cocchi (professore ordinario)

#### PRODOTTI

- Informazioni sulle differenze genomiche delle 2 principali varianti genetiche della  $\beta$ -lattoglobulina bovina riguardo alla presenza di corti peptidi inibitori di DPP-4 nei prodotti di proteolisi.

#### TRASFERIMENTO

Possibilità di applicare alla selezione le informazioni ottenute sulle differenze genetiche riscontrate tra le varianti genetiche dei peptidi.

#### BREVETTI

#### PUBBLICAZIONI

Manoscritto in preparazione.





Unità operativa tracciabilità e rintracciabilità



## Relazione del coordinatore

I sistemi basati sulla *tracciabilità* e sulla *rintracciabilità*, oltre a fornire strumenti di controllo per la sicurezza degli alimenti e a tutelare il consumatore da possibili frodi, contribuiscono all'autenticazione di un prodotto, conferendo un valore aggiunto alla certificazione di origine (IGP, DOP, DOC, STG); tale autenticazione riveste particolare importanza nel caso di prodotti forniti da tipi genetici autoctoni (specialmente antichi) contribuendo alla tutela della biodiversità e quindi a uno sviluppo rurale multifunzionale sostenibile.

A tal proposito, l'unità operativa 'Tracciabilità e Rintracciabilità', avvalendosi della collaborazione delle singole unità, ha sviluppato un piano di ricerca che ha interessato le specie bovina, caprina, ovina e suina allo scopo di identificare marcatori genomici, proteici e lipidici da impiegare come validi strumenti ai fini della rintracciabilità di razza e dell'autenticazione di prodotti. È stata adottata una strategia basata essenzialmente su due approcci differenti che concettualmente è possibile distinguere in:

- a) *'deterministico'* che, avvalendosi della ricerca di polimorfismi specifici in una determinata razza, mira all'individuazione di marcatori *'esclusivi'* o *'discriminanti'* o *'privati'* caratterizzanti un tipo genetico [es. *varianti di natura genetica* specialmente a livello di SNP (*alleli fissati*) o marcatori proteici];
- b) *'probabilistico'* che, a partire dai valori di frequenze alleliche disponibili per una serie di razze di riferimento, mira all'*assegnazione probabilistica* di un individuo e/o di un prodotto previa costituzione di un *dataset* di marcatori di riferimento di alcuni tipi genetici.

\* Consorzio per la Sperimentazione, Divulgazione e Applicazione di Biotecniche Innovative

I risultati a oggi conseguiti dall'UO 'Tracciabilità e rintracciabilità' hanno portato alla messa a punto di sistemi '*sicuri*' e '*non falsificabili*' in grado di garantire l'attribuzione di un individuo e/o di un prodotto al tipo genetico di appartenenza.

In particolare, sono stati messi a punto test molecolari in grado di:

- i) assegnare un individuo o un prodotto di origine suina o bovina mediante applicazione di un "population assignment test", utilizzando panel di marcatori (SNPs e/o microsatelliti);
- ii) discriminare tra le varie razze a livello della specie suina, ovina e caprina grazie all'identificazione di polimorfismi caratteristici nei geni *MC1R*, *ASIP* e *KIT*;
- iii) distinguere tra prodotto "*originale*", derivante da latte fresco, e prodotto "*di imitazione*", derivante da semilavorati (precisamente cagliate importate) grazie all'individuazione di un marcatore proteico, denominato '*ALMP*'.

DONATO MATASSINO\*

## Rintracciabilità di razza e autenticazione di prodotto mediante approccio proteomico\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

La rintracciabilità dei prodotti carnei si basa sull'individuazione di marcatori molecolari la cui caratterizzazione ne consente la ricerca nelle varie fasi del diagramma di flusso. Le proteine sono espressione del patrimonio genetico dell'animale e i relativi frammenti sono il risultato dei processi proteolitici che avvengono nel corso della maturazione e/o conservazione dei prodotti derivati dalla materia prima; inoltre, le proteine possono subire varie modificazioni post-traduzionali, in particolare fosforilazioni, glicosilazioni e acetilazioni, il cui studio mediante applicazione delle tecniche di proteomica può aiutare a differenziare anche le specie animali.

Obiettivo della ricerca è quello di individuare biomarcatori peculiari utilizzabili in sistemi di autenticazione di alcuni prodotti monorazza [Fiocco (prodotto locale tradizionale costituito, sostanzialmente, da tre muscoli: *Semimembranosus*, *Biceps femoris* e *Semitendinosus*) e Prosciutto] derivati da razze locali suine.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Ogni campione di 'Fiocco fresco' è stato prelevato, distintamente per soggetto, da 20 suini [10 del TGA 'Casertana' e 10 del TGA 'Apulo Calabrese' (Calabrese) allevati con le medesime tecniche presso la Stazione sperimentale del ConSDABI azienda Casaldianni, Circello (BN)]. I campioni dei suddetti tipi genetici, processati in parallelo, sono stati analizzati mediante:

\* Consorzio per la Sperimentazione, Divulgazione e Applicazione di Biotecnologie Innovative

\*\* Unità di ricerca ConSDABI, responsabile scientifico prof. Donato Matassino

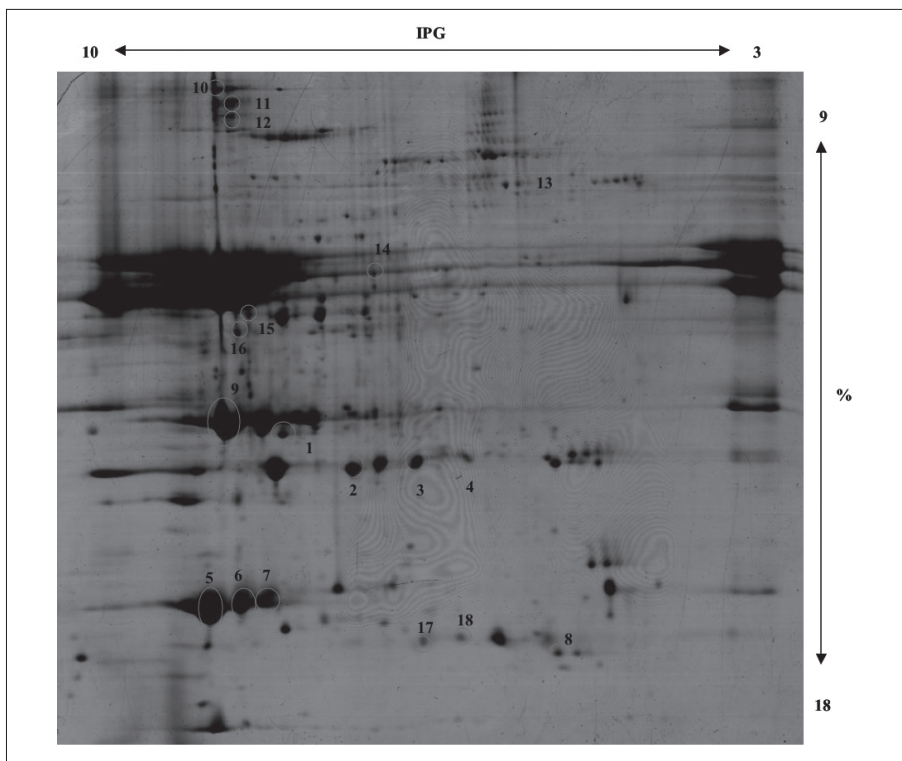


Fig. 1

- (a) tecniche a elevata risoluzione (2D-IPG-SDS-PAGE) al fine di frazionare la componente proteica;
- (b) analisi d'immagine (Image Master 2D-Platinum) al fine di evidenziare eventuali variazioni nell'espressione proteica mediante l'analisi della variazione relativa di intensità (vol. %);
- (c) tecniche di caratterizzazione a livello strutturale (spettrometria di massa MALDI-TOF) al fine di identificare le proteine di interesse.

L'omoscedasticità dei dati è stata verificata mediante il test di Bartlett. La differenza tra le medie è stata saggiata mediante test t di Student.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

L'analisi dell'immagine sulla frazione solubile delle proteine muscolari (fig. 1) ha rilevato la presenza di un numero di *spot* che varia da un minimo di 304 a un massimo di 442 nella 'Calabrese' e da un minimo di 279 a un massimo di 450 nella

SPOT, N	PROTEINA	SIGNIFICATIVITÀ
1	Creatina chinasi	$P < 0,01$
2	DJ-1	$P < 0,60$
3	DJ-1	$P < 0,10$
4	DJ-1	$P < 0,01$
5	Mioglobina	$P < 0,20$
6	Mioglobina	$P < 0,05$
7	Mioglobina	$P < 0,01$
8	Tioredoxina	$P < 0,001$
9	Triosofosfato isomerasi	$P < 0,05$
10	Non identificata	$P < 0,01$
11	Non identificata	$P < 0,05$
12	Non identificata	$P < 0,05$
13	Non identificata	$P < 0,05$
14	Non identificata	$P < 0,05$
15	Non identificata	$P < 0,05$
16	Non identificata	$P < 0,05$
17	Non identificata	$P < 0,05$
18	Non identificata	$P < 0,05$
In grassetto gli <i>spot</i> eterogenei		

Tab. 1

‘Casertana’. Il valore medio del numero degli *spot* è risultato pari a  $382 \pm 50,5$  (C.V., % = 13) per la ‘Calabrese’ e a  $336 \text{ spot} \pm 49,8$  (C.V., % = 15) per la ‘Casertana’. Il confronto tra i due tipi genetici non è risultato statisticamente significativo. Dei 63 *spot* comuni alla quasi totalità dei campioni, 35 *spot* (56%) sono stati identificati mediante spettrometria di massa MALDI-Tof e raggruppati in due classi:

- qualità della carne;
- rintracciabilità di prodotto.

Per la qualità della carne le proteine differenzialmente espresse (*spot*, N 4, 6, 7, 8; tab. 1, fig. 1) sono:

- a) DJ-1;
- b) Tioredossina;
- c) Mioglobina.

La DJ-1 è una proteina ad attività antiossidante e ‘*chaperone simile*’ essendo implicata nella risposta cellulare allo stress ossidativo. La funzione ‘*chaperone simile*’ permette anche un rallentamento del processo di denaturazione proteica e, conseguentemente, un rallentamento del fenomeno di perdita di acqua per gocciolamento (Hwang, 2004). Il potere di ritenzione idrica della carne è un importante parametro di qualità in quanto condiziona diretta-

mente non solo il rendimento ma anche la qualità sensoriale di prodotto.

La tioredossina è una proteina ad attività antiossidante e agisce contro il processo di aggregazione e/o di inattivazione delle proteine citosoliche; in tal modo, esse sono più facilmente soggette al fenomeno della proteolisi da parte degli enzimi gastro-enterici con conseguente maggiore biodisponibilità di piccoli peptidi e/o singoli amminoacidi. Inoltre, va tenuto in conto che una maggiore espressione di tioredossina si riflette anche in una maggiore concentrazione in cisteina, amminoacido utile per la sintesi del glutatione, potente antiossidante cellulare (Williamson et al., 1982).

La mioglobina, da un punto di vista nutrizionale, rende biodisponibile il ferro, elemento importante per evitare o contenere le anemie (Mahoney et al., 1984; Park et al., 1983).

Per la rintracciabilità di prodotto, invece, sono prese in considerazione le proteine eterogenee differenzialmente espresse (*spot*, N 4, 6, 7; tab. 1, fig. 1):

a) DJ-1;

b) Mioglobina.

Per la DJ-1 abbiamo notato una notevole eterogeneità attribuibile a modifiche post traduzionali riguardanti l'acetilazione della lisina e la fosforilazione della tirosina (Choudhary et al., 2009; Rush et al., 2005).

Per la mioglobina le tre forme osservate sono il risultato di un polimorfismo di natura genetica (Wykle et al., 1978), come avviene per le catene  $\alpha$  dell'emoglobina. Inoltre, dall'analisi delle mappe elettroforetiche, le tre isoforme mostrano un gradiente di espressione pari a circa 29-14-7 nella '*Calabrese*' e circa 32-13-5 nella '*Casertana*'. Nei mammiferi, i segmenti di DNA codificanti polipeptide/polipeptidi ('geni') duplicati e/o triplicati dell'emoglobina producono quantità ineguale delle catene  $\alpha$  della globina probabilmente per effetto di un'azione di dominanza incompleta o di effetto epistatico dovuto fondamentalmente alla posizione della sequenza codificante rispetto al promotore; in particolare, come osservato negli ovini, la percentuale di efficienza dei 'geni' duplicati,  $^I\alpha$ - $^{II}\alpha$ , e di quelli triplicati,  $^I\alpha$ - $^{II}\alpha$ - $^{III}\alpha$ , genera un gradiente di espressione dal 5' iniziale al 3' finale, pari a circa 32-18 e 30-14-6, rispettivamente (Vestri et al., 1991).

Nei limiti del campo di osservazione, sono risultate maggiormente espresse ( $P < 0,01$ ) nel TGA *Apulo Calabrese* (*Calabrese*) le proteine DJ-1 e mioglobina mentre nel TGA *Casertana* la tioredossina ( $P < 0,001$ ). Queste proteine, differenzialmente espresse nei due tipi genetici, possono essere utilizzate come biomarcatori per l'analisi di rintracciabilità delle due razze esaminate; infatti, si sta procedendo a un campionamento più ampio al fine di stabilire valori quantitativi e/o indici che possano definire i due tipi genetici. Inoltre, la DJ-1, la mioglobina e la tioredossina possono essere anche utilizzabili quali validi biomarcatori per la qualità della carne suina.



## BIBLIOGRAFIA

- CHOUDHARY C. ET AL. (2009): «Science», 325, pp. 834-840.  
 HWANG I. (2004): «Food Sci. Biotechnol.», 13, pp. 208-214.  
 MAHONEY A. ET AL. (1984): «Nutrition Research», vol. 4, issue 5, pp. 913-922.  
 PARK Y.W. ET AL. (1983): «J. Nutr.», 113, pp. 680-687.  
 RUSH J. ET AL. (2005): «Nat. Biotechnol.», 23, pp. 94-101.  
 VESTRI R. ET AL. (1991): «Br. J. Haematol.», 77, pp. 110-116.  
 WILLIAMSON J.M. ET AL. (1982): «Proc. Natl Acad. Sci.», 79, pp. 6246-6249.  
 WYKLE B. ET AL. (1978): «J. Anim. Sci.», 47, pp. 1260-1264.

## COLLABORATORI DELLA RICERCA

Aldo Di Luccia (Professore associato)  
 Roberta Boscaino (Amministrativo)  
 Nadia Castellano (Ricercatore)  
 Vincenzo Golia (Tecnico)  
 Fabiola Del Grosso (Ricercatore)  
 Carmen Di Prisco (Ricercatore)  
 Domenico Falasca (Ricercatore)  
 Gianluca Gigante (Ricercatore)  
 Simona Gramazio (Tesista)  
 Michela Grasso (Ricercatore)  
 Caterina Inconato (Ricercatore)  
 Filomena Inglese (Ricercatore)  
 Marianna Manzone (Ricercatore)  
 Mariaconsiglia Occidente (Ricercatore)  
 Francesca Pane (Ricercatore)  
 Rolando Pasquariello (Ricercatore)  
 Luigina Rillo (Ricercatore)  
 Francesco Romagnuolo (Ricercatore)  
 Cristofaro Emilio Rossetti (Ricercatore)  
 Giovanna Varricchio (Ricercatore)

## PUBBLICAZIONI

- 1) MATASSINO D., DI PRISCO C., INGLESE F., ROMAGNUOLO F., DI LUCCIA A. (2010): *Differential expression of sarcoplasmic proteins in Casertana, Calabrese and Pen Ar Lan pork*, 7th International Symposium on Mediterranean Pig, 14-16 October 2010 Cordoba ESPAÑA (Poster Abstract).



DONATO MATASSINO\*

## Ricerca di 'biomarcatori peculiari' del tipo genetico nella componente lipidica di prodotti tradizionali o locali di origine animale. Specie 'Suina'<sup>\*\*</sup>

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

L'enzima Stearoil Coenzima A Desaturasi (SCD) riveste un importante ruolo nella modulazione dei livelli di acido stearico e acido oleico. Nel suino, il suo sito di azione ha sede principalmente nel tessuto adiposo sottocutaneo (lardo) (Kouba et al., 1997) e la sua attività è influenzata dal tipo genetico (TG), dalla temperatura ambientale (Kouba et al., 1999), nonché dall'alimentazione (Kouba et al., 1998): in particolare, temperature tendenzialmente alte (31°C) sembrerebbero associate a una riduzione dell'attività della SCD rispetto a temperature moderate (20°C), con conseguente alterazione della composizione in acidi grassi della carne e del lardo. Inoltre, anche un'alimentazione arricchita in acido linoleico potrebbe ridurre l'attività della SCD nonché del contenuto in acido oleico. Obiettivo di questo lavoro è indagare sulla eventuale differenza nel profilo acidico quantitativo tra il lardo del suino TGA 'Casertana' e quello del suino TGA 'Apulo Calabrese' (Calabrese).

### MATERIALI E METODOLOGIE

Per la sperimentazione sono stati selezionati 20 suini [10 del TGA 'Casertana' e 10 al TGA 'Apulo Calabrese' (Calabrese)] allevati presso la Stazione Sperimentale del ConSDABI [azienda Casaldianni, Circello (BN)] nelle medesime condizioni. Da 20 campioni di lardo prelevati dalla regione lombare

\* Consorzio per la Sperimentazione, Divulgazione e Applicazione di Biotecniche Innovative

\*\* Unità di ricerca ConSDABI, responsabile scientifico prof. Donato Matassino

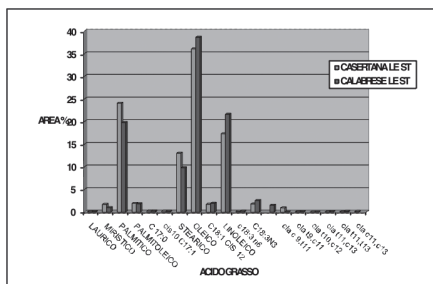


Fig. 1

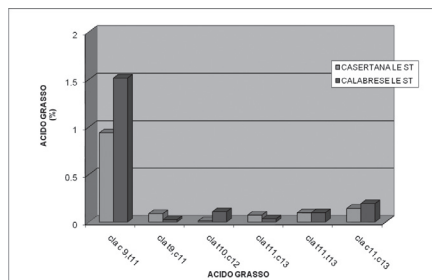


Fig. 2

esterna del tessuto adiposo sottocutaneo e stagionati per 4 mesi, è stata estratta la frazione lipidica secondo il metodo di Folch. La successiva transesterificazione degli acidi grassi legati al glicerolo è stata realizzata impiegando alcool metilico e idrossido di potassio (KOH) quale catalizzatore. Gli esteri metilici degli acidi grassi sono stati poi separati mediante gascromatografo con rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e iniettore on-column, equipaggiato con colonna CP-Sil 88 di lunghezza 100 m, al fine di consentire una migliore separazione degli isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA). Il contenuto in acidi grassi è stato espresso come percentuale sugli acidi grassi identificati.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Il profilo acidico del tessuto adiposo sottocutaneo stagionato (lardo) di 'Casertana' e 'Calabrese' ha consentito di evidenziare alcune differenze tra questi due tipi genetici nel contenuto dei principali acidi grassi (miristico, palmitico, stearico, oleico, linoleico e  $\gamma$ -linolenico) (tab. 1). In particolare, l'acido stearico e l'acido oleico sono presenti, rispettivamente, nella percentuale del 13,0 % e del 36,1 %, nel TGA 'Casertana' e del 9,8 % e del 38,6 % nel TGA 'Calabrese'. Inoltre, come riportato in tabella 2 e ancor più evidenziato dal confronto tra i due TG illustrato in figura 1, il contenuto percentuale nei principali acidi grassi saturi è superiore nel tessuto adiposo sottocutaneo del TGA 'Casertana' (39,4 %) rispetto al TGA 'Calabrese' (31,2 %); situazione opposta si verifica nel caso dei principali acidi grassi insaturi (60,4 % e 68,8 % per i TGA 'Casertana' e 'Calabrese', rispettivamente). In relazione alla composizione acidica rilevata, interessante è sottolineare il rapporto UFA/SFA (Unsaturated Fatty Acids/Saturated Fatty Acids; Acidi Grassi Insaturi/ Acidi Grassi Saturi) pari a 1,55 e 2,23 per i TGA 'Casertana' e 'Calabrese', rispettivamente. Infine, il contenuto percentuale in CLA varia da 1,36 % nel TGA 'Casertana' a 1,98 % nel

ACIDO GRASSO	COMPOSIZIONE ACIDICA (%)	
	TIPO GENETICO	
	CASERTANA	CALABRESE
C 12:0	0,102	0,138
C 14:0	1,716	1,007
C 16:0	24,056	19,787
C 16:1	1,936	1,850
C 17:0	0,267	0,259
<b>cis10 C17:1</b>	0,239	0,216
C 18:0	13,002	9,787
C18:1	36,073	38,611
<b>C18:1 cis 12</b>	1,742	1,947
C18:2	17,318	21,623
<b>c18:3 n6</b>	0,189	0,241
<b>C18:3 n3</b>	1,805	2,553
<b>CLA c 9, t11</b>	0,938	1,516
<b>CLA t9, c11</b>	0,090	0,026
<b>CLA t10, c12</b>	0,013	0,110
<b>CLA t11, c13</b>	0,074	0,034
<b>CLA t11, t13</b>	0,098	0,100
<b>CLA c11, c13</b>	0,144	0,195

Tab. 1

TIPO GENETICO AUTOCTONO	ACIDI GRASSI(%)		RAPPORTO INSATURI/ SATURI	INDICE ATE- ROGENICO (I.A.)	INDICE TROM- BOGENICO (I.T.)
	SATURI	INSATURI			
Casertana	39,142	60,660	1,55	1,77	1,02
Calabrese	30,978	69,022	2,23	1,09	0,75

\* $\Delta = [(2,23-1,55)/2,23] \times 100$

Tab. 2

TGA 'Calabrese' (tab. 1) e, come meglio evidenziato in figura 2, il CLA più rappresentativo, per entrambi i TGA, è il C18:2 c9, t11 (0,9 % e 1,5 % per i TGA 'Casertana' e 'Calabrese', rispettivamente). Infine il TGA 'Apulo Calabrese' (Calabrese) presenta, limitatamente al campo di osservazione, Indice Aterogenico (IA) e Indice Trombogenico (IT) inferiori rispetto al TGA 'Casertana' (tab. 2).

Sebbene le differenze risultate non siano significative tuttavia una tendenza particolarmente rilevante è stata osservata per gli acidi grassi saturi (palmitico e stearico) e per l'acido linoleico. Chung, K. Y. et al. (2007) hanno dimostrato che l'espressione e l'attività dell'enzima SCD sono significativamente differenti, a livello del tessuto adiposo sottocutaneo, tra

bovini Angus e Wagyu, sottoposti allo stesso regime alimentare e che questa differenza è significativamente associata a quella osservata nei rapporti MUFA/SFA (Monounsaturated fatty acids/saturated fatty acids) nello stesso tessuto.

Considerato che i soggetti del TGA '*Casertana*' e del TGA '*Apulo Calabrese*' (Calabrese) sono allevati nelle stesse condizioni, si può ipotizzare che le differenze rilevate nella composizione acidica potrebbero essere attribuite a fattori genetici che regolano il metabolismo lipidico nelle due razze, come già osservato nei bovini (Chung et al., 2007).

È interessante sottolineare inoltre, che nel tessuto adiposo sottocutaneo il contenuto percentuale in acido linoleico varia in relazione alla specie e, entro la specie, alla razza, a parità di altre condizioni. Infatti mentre per il bovino (Smith et al., 2009) e molti TG suini (Whittington et al., 2006) tale contenuto è inferiore al 10÷15 %, nei TGA suini '*Casertana*' e '*Apulo Calabrese*' (Calabrese) è circa il 20 %. Considerato che l'acido linoleico è un acido essenziale (Rule et al., 1994) e, pertanto, necessariamente assunto con l'alimentazione, il maggiore contenuto rilevato nel TGA '*Casertana*' e nel TGA '*Apulo Calabrese*' (Calabrese) sarebbe da attribuirsi a meccanismi biochimici non ancora conosciuti che incrementano la desaturazione.

Nei limiti del campo di osservazione e della letteratura consultata, il metabolismo di acidi grassi essenziali, in particolare dell'acido linoleico, può variare in relazione alla specie e, entro la specie, alla razza (a parità delle condizioni di allevamento), ma il biochimismo che regola tale metabolismo non è ancora noto. Pertanto, l'elevato contenuto in acido linoleico rilevato nel tessuto adiposo sottocutaneo dei tipi genetici '*Casertana*' e '*Apulo Calabrese*', nonché la differenza osservata tra i TG, fa ben presagire che è possibile individuare marcatori lipidici discriminanti la specie e, entro la specie, la razza, a esempio il rapporto UFA/SFA, l'indice 'aterogenico' e l'indice 'trombogenico'.

#### BIBLIOGRAFIA

- CHUNG K.Y. ET AL. (2007): «J. Anim. Sci.», 85, pp. 380-387.  
 KOUBA M. ET AL. (1997): «Comp. Biochem. Physiol.», 118B (3), pp. 509-514.  
 KOUBA M. ET AL. (1998): «Reprod. Nutr. Dev.», 38, pp. 31-37.  
 KOUBA M. ET AL. (1999): «Comp. Biochem. Physiol.», 124B (3), pp. 7-13.  
 RULE D.C. ET AL. (1994): «J. Anim. Sci.», 72, pp. 2735-2744.  
 SMITH S.B. ET AL. (2009): «Asian-Aust. J. Anim. Sci.», 22 (9), pp. 1225-1233.  
 WHITTINGTON F.M. ET AL. (2006): «J. Sci. Food and Agriculture», 37, pp. 753-761.

## COLLABORATORI DELLA RICERCA

Aldo Di Luccia (Professore associato)  
Roberta Boscaino (Amministrativo)  
Nadia Castellano (Ricercatore)  
Vincenzo Golia (Tecnico)  
Fabiola Del Grosso (Ricercatore)  
Carmen Di Prisco (Ricercatore)  
Domenico Falasca (Ricercatore)  
Gianluca Gigante (Ricercatore)  
Simona Gramazio (Tesista)  
Michela Grasso (Ricercatore)  
Caterina Incoronato (Ricercatore)  
Filomena Inglese (Ricercatore)  
Marianna Manzone (Ricercatore)  
Mariaconsiglia Occidente (Ricercatore)  
Francesca Pane (Ricercatore)  
Rolando Pasquariello (Ricercatore)  
Luigina Rillo (Ricercatore)  
Francesco Romagnuolo (Ricercatore)  
Cristofaro Emilio Rossetti (Ricercatore)  
Giovanna Varricchio (Ricercatore)

## PUBBLICAZIONI

- 1) MATASSINO D., GIGANTE G., GRASSO M., RILLO L., VARRICCHIO G., DI LUCCIA A. (2010): *Lipid composition of fresh and cured lard in 'Calabrese' and 'Casertana' ancient autochthonous genetic types (AAGT) pigs*, 7th International Symposium on Mediterranean Pig Cordoba, España, Spagna, October (14), 15, 16th 2010.





## Individuazione, a livello del DNA, di marcatori 'esclusivi' o 'discriminanti' o 'privati' caratterizzanti un tipo genetico. Specie 'Suina'\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

In un contesto ove è sempre più radicata la convinzione che l'alimento debba rispondere a determinati requisiti di sicurezza, maggiore attenzione va rivolta all'applicazione di strumenti basati sull'analisi del DNA. Le differenze nucleotidiche a livello del genoma costituiscono un'etichetta indelebile e inalterabile nonché un codice identificativo univoco (McKean et al., 2001).

Il ConSDABI, nell'ottica della tutela delle produzioni di *'qualità'* derivanti da tipi genetici autoctoni (TGA)/tipi genetici autoctoni antichi (TGAA), ha sviluppato una linea di ricerca basata sull'impiego di marcatori STR e SNP da ritenere validi strumenti ai fini dell'assegnazione di un individuo alla popolazione di origine e dell'autenticazione di un prodotto.

Lo studio è, dunque, finalizzato al trasferimento operativo del *know-how* necessario all'identificazione e al controllo dell'origine razziale di carni e di prodotti derivati, attraverso l'ottimizzazione di *set* di marcatori genomici e la costituzione di un archivio di dati molecolari.

### MATERIALE E METODOLOGIE

257 soggetti {Duroc (N=17), Landrace (N=18), Large White (N=18) Pietrain (N=16), Apulo-Calabrese [Calabrese (N=50), Nero Lucano (N=58)], Casertana (N=50), Nero Siciliano (N=30)} sono stati tipizzati a pannelli di

\* Consorzio per la Sperimentazione, Divulgazione e Applicazione di Biotecnologie Innovative

\*\* Unità di ricerca ConSDABI, responsabile scientifico prof. Donato Matassino

marcatori STR (N=20) e SNP (N=59). L'analisi degli STRs, scelti sulla base delle raccomandazioni ISAG /FAO (2004), è stata condotta mediante 4 multiplex-PCR; la separazione è stata eseguita su sequenziatore ABI PRISM 310 Genetic Analyzer e la determinazione della 'size' in bp degli alleli è stata effettuata con il software GenMapper 4.0. Per la valutazione della riproducibilità delle analisi molecolari è stato condotto un *ring test* tra i laboratori afferenti al progetto. La genotipizzazione di 59 SNPs, scelti *in silico* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), è stata effettuata in outsourcing presso la KBioscience (UK) (<http://kbioscience.co.uk>).

Inoltre, gli stessi marcatori molecolari sono stati impiegati in test di rintracciabilità su campioni di DNA estratto da 25 prodotti (fresco e/o stagionato) individuali ottenuti da 23 suini del TGAA 'Casertana' e da 2 soggetti di controllo 'non Casertana'.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

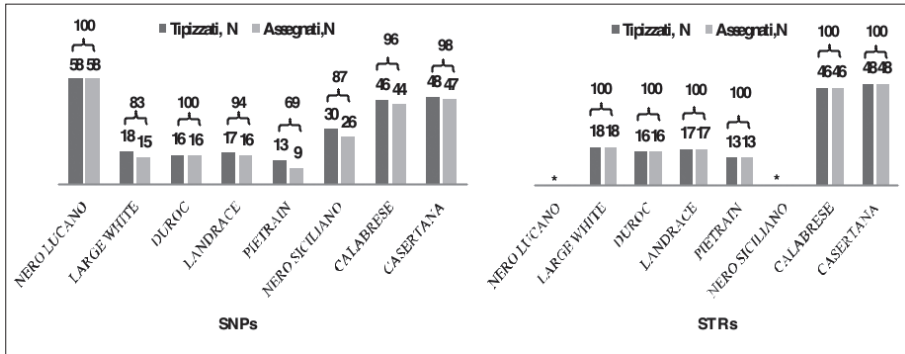
La valorizzazione di prodotti '*monorazza*' derivati da TGA/TGAA specifici ha portato a sviluppare sistemi di tracciabilità razziale che consentono di attribuire un prodotto di origine animale o un animale stesso alla sua razza di appartenenza.

L'attività di ricerca del ConSDABI, svolta in collaborazione con le unità di ricerca LGS e Istituto Lazzaro Spallanzani, è stata rivolta alla messa a punto di sistemi di rintracciabilità e di autenticazione attraverso l'adozione di "*population assignment tests*", mediante l'impiego di marcatori genetici. Attualmente, le classi di marcatori molecolari più utilizzati sono gli SNPs e gli STRs, caratterizzati da bassi costi, tempi brevi di analisi, elevato contenuto informativo, facilità di interpretazione, standardizzazione dei risultati e potenzialità di automazione.

Durante la prima fase del progetto, le unità di ricerca (ConSDABI, LGS e Istituto Lazzaro Spallanzani) hanno definito i *set* di marcatori comuni da impiegare per la tipizzazione di gruppi di popolazioni di riferimento.

Dei 59 SNPs potenzialmente informativi, localizzati in regioni codificanti e non codificanti, 47 hanno superato il test di validazione condotto dalla KBioscience e di questi, 6 SNPs sono risultati monomorfici in tutti i campioni analizzati e pertanto esclusi dal *dataset*. Dati completi di genotipizzazione a un *panel* di 41 SNPs sono stati ottenuti per 246 dei 257 campioni di DNA inviati.

Al fine di verificare la possibile presenza di *linkage disequilibrium* e di escludere dal *dataset* marcatori non indipendenti, è stato impiegato il *software*



-\* Dati non disponibili, in fase di elaborazione.

Graf. 1

TG/TGAA	PROBABILITÀ MEDIA DI ASSEGNAZIONE	
	SNPS	STRs
NERO LUCANO	100	-*
LARGE WHITE	97	96
DUROC	97	100
LANDRACE	99	99
PIETRAIN	100	98
NERO SICILIANO	98	-*
CALABRESE	99	99
CASERTANA	98	97
TOTALE	98	98

-\* Dati non disponibili, in fase di elaborazione.

Tab. 1

PowerMarker v.3.0 (URL:<http://www.powermarker.net>): dei possibili confronti tra *loci* STR e tra *loci* SNP, nessuno è risultato in *linkage*.

I dati ottenuti dalla genotipizzazione dei soggetti a *loci* microsatellite e SNP sono stati impiegati in test di assegnazione mediante il programma GeneClass ver. 2.0 (<http://www.ensam.inra.fr/URLB/genececlass/genececlass.html>). Tale programma, sulla base delle frequenze alleliche, utilizza un approccio di massima verosimiglianza al fine di calcolare la significatività dell'assegnazione (Paetkau et al., 1995; Rannala and Mountain, 1997).

Nel grafico 1, sono riportati il numero e la percentuale degli individui assegnati al TG di appartenenza utilizzando i due *panel* di marcatori. La percentuale di assegnazione è calcolata come rapporto tra il numero di animali assegnati correttamente a una determinata razza e il numero di animali analizzati per quella stessa razza. Nei limiti del campo di osservazione si eviden-

zia che i marcatori STR hanno fornito un valore medio percentuale pari al 100%, mentre gli SNPs un valore pari al 94%.

Nei limiti del campo di osservazione, i risultati del test di assegnazione indicano che entrambi i marcatori utilizzati sono efficaci nell'attribuzione di un individuo alla razza di appartenenza, sebbene la percentuale di assegnazione sia apparentemente più elevata per gli STRs.

Al fine di valutare le potenzialità dei *dataset* di marcatori e la validità del metodo, sono state eseguite *'prove di campo'* genotipizzando per lo stesso panel di microsatelliti e SNP 25 campioni di DNA estratti da prodotti monorazza individuali, dei quali 23 ottenuti dal TGAA 'Casertana' e 2 di controllo 'non Casertana'. I test di assegnazione hanno attribuito i 23 prodotti di Casertana analizzati alla razza di appartenenza con una probabilità del 99%, sia nel caso dei marcatori microsatellite che degli SNP. I campioni controllo non sono stati attribuiti alla 'Casertana' ma sono stati assegnati alla razza di origine, a dimostrazione dell'idoneità del metodo molecolare di autenticazione.

Entro i limiti del campo di osservazione, i preliminari risultati di assegnazione dei prodotti alle razze di riferimento sembrerebbero promettenti e confermerebbero l'idoneità dei marcatori impiegati ai fini dell'autenticazione di un prodotto *'monorazza'*.

Tuttavia, l'attività di ricerca sta procedendo per incrementare sia la numerosità dei campioni di DNA tipizzati entro ciascuna razza, sia quella dei TG indagati, nell'ottica della costituzione di un modello genomico di riferimento meglio rappresentativo della specie suina.

#### BIBLIOGRAFIA

- McKEAN J.D. ET AL. (2001): «Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.», 20 (2), pp. 363-71.  
 PAETKAU D. ET AL. (1995): «Mol. Ecol.», 4, pp. 347-54.  
 RANNALA B. AND MOUNTAIN J.L. (1997): «Proc. Natl Acad. Sci.», USA, 94, pp. 9197-221.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Aldo Di Luccia (Professore associato)  
 Roberta Boscaino (Amministrativo)  
 Nadia Castellano (Ricercatore)  
 Vincenzo Golia (Personale tecnico)  
 Fabiola Del Grosso (Ricercatore)

Carmen Di Prisco (Ricercatore)  
 Domenico Falasca (Ricercatore)  
 Gianluca Gigante (Ricercatore)  
 Simona Gramazio (Tesisista)  
 Michela Grasso (Ricercatore)  
 Caterina Incoronato (Ricercatore)  
 Filomena Inglese (Ricercatore)  
 Marianna Manzone (Ricercatore)  
 Mariaconsiglia Occidente (Ricercatore)  
 Francesca Pane (Ricercatore)  
 Rolando Pasquariello (Ricercatore)  
 Luigina Rillo (Ricercatore)  
 Francesco Romagnuolo (Ricercatore)  
 Cristofaro Emilio Rossetti (Ricercatore)  
 Giovanna Varricchio (Ricercatore)

#### PRODOTTI

– *Dataset* di marcatori molecolari rappresentativo della specie suina.

#### TRASFERIMENTO

Messa a punto di protocolli di analisi per la rintracciabilità di razza e l'autenticazione di prodotti monorazza attraverso l'impiego di marcatori molecolari (microsatelliti e SNPs) mediante approccio probabilistico. Inoltre, la ricerca ha permesso di confrontare l'idoneità dei marcatori microsatelliti e SNPs ai fini della tracciabilità genetica.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) BLASI M., IAMARTINO D., BONGIONI G., GUASTELLA A.M., PASQUARIELLO R., PANE F., MATASSINO D. (2009): *STRs vs SNPs for pig traceability purposes*, Proceedings of the ASPA 18th Congress, Palermo 9-12 giugno 2009.
- 2) MATASSINO D., BLASI M., BONGIONI G., INCORONATO C., OCCIDENTE M., PANE F., PASQUARIELLO R., NEGRINI R. (2010): *Authentication of swine derived products by means of SNP and STR markers*, 61<sup>st</sup> Meeting of the European Association for Animal Production, Heraklion, Creta (Grecia), 23-27 agosto 2010, *in press*.



MICHELE BLASI\*

## Individuazione, a livello del DNA, di marcatori ‘esclusivi’ o ‘discriminanti’ o ‘privati’ caratterizzanti un tipo genetico. Specie ‘Suina’\*\*

### STATO DELL’ARTE E OBIETTIVO

La tracciabilità alimentare per la sicurezza e la qualità e per la salvaguardia dei prodotti “*Made in Italy*” è sempre più importante e i metodi molecolari rappresentano un valido strumento complementare per realizzarla.

L’obiettivo è la ricerca di marcatori molecolari (microsatelliti e SNP) che possano permettere lo sviluppo di sistemi diagnostici di tracciabilità e di rintracciabilità utili per: la sicurezza del consumatore, il controllo delle sofisticazioni, la trasparenza del mercato e la promozione dei prodotti locali tradizionali.

Ai fini della tracciabilità genetica individuale e di razza nella specie suina, l’LGS ha indagato sul grado di variabilità e di demarcazione tra popolazioni suine cosmopolite ai fini di poter effettuare una corretta attribuzione di un individuo alla popolazione di provenienza con metodi probabilistici.

### MATERIALE E METODOLOGIE

#### *Microsatelliti*

Sono stati analizzati 77 suini (20 Large White, 19 Landrace, 18 Pietrain, 20 Duroc) con 17 *loci* microsatelliti (SW1370, SW2038, SW1035, S0017,

\* Laboratorio Gruppi Sanguigni, Cremona

\*\* Unità di ricerca Laboratorio Gruppi Sanguigni, responsabile scientifico dott. Michele Blasi

SW1823, SWR153, SW1928, SW1873, SW1693, SW1556, SW240, SW951, SW857, S0155, S0101, S0355, S0005). I genotipi sono stati ottenuti in LGS con sequenziatore ABI 3100 (*Applied Biosystems*). I *software* GENETIX 4.05, FSTAT e ARLEQUIN ver. 3.1 sono stati impiegati per calcolare i parametri di variabilità genetica. Le relazioni tra le popolazioni sono state valutate anche mediante AFC (*Factorial Correspondance Analysis*) e l'attribuzione di popolazione è stata eseguita con i *software* WhichRUN e STRUCTURE.

### SNPs

È stato definito un *panel* di 60 marcatori SNP derivati da una ricerca in letteratura e in banca dati ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). 246 suini di razze cosmopolite e di Tipi Genetici Autoctoni (TGA) sono stati genotipizzati in outsourcing presso Kbioscience (UK). L'attribuzione di popolazione è stata eseguita con il *software* STRUCTURE.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

### Microsatelliti

Tutti i *loci* sono risultati polimorfici, il numero medio di alleli per popolazione è: Large White (LW) 5,65, Landrace (L) 5,59, Pietrain (P) 5,82 e Duroc (D) 4,23.

Nella tabella 1 si riportano i valori medi per popolazione di eterozigotà attesa ( $H_e$  exp) in accordo con la legge di HW e osservata ( $H_e$  obs); i valori più elevati si osservano per la popolazione LW e i più bassi per D.

L'equilibrio di HW è stato stimato con il programma ARLEQUIN basandosi sulla significatività della differenza tra eterozigotà attesa e osservata per ogni *locus* entro ogni popolazione. Solo il *locus* SW1556 nelle popolazioni Landrace, Pietrain e Duroc non risulta in equilibrio.

In base agli indici F di Wright (secondo Weir & Cockerham, 1984), calcolati con il *software* GENETIX basandosi su 1.000 *bootstrap*, considerando l'insieme delle popolazioni, si rileva che la riduzione di eterozigotà *entro*-popolazione rappresentata dall'indice  $F_{is}$  è di  $0,071 \pm 0,02$ , la riduzione di eterozigotà totale ( $F_{it}$ ) è di  $0,255 \pm 0,04$ . Con FSTAT (Goudet,



TIPO GENETICO	HE EXP	HE OBS
LW	0,667±014	0,653±0,19
L	0,645±0,13	0,594±0,22
P	0,621±0,20	0,589±0,25
D	0,531±0,20	0,471±0,25

Tab. 1

2000) sono stati calcolati gli indici  $F_{is}$ ,  $F_{it}$  e  $F_{st}$  per ogni *locus* (tab. 2) e la riduzione di eterozigosità più elevata si osserva per SW1556. In generale, i valori osservati per gli indici F, per l'eterozigosità e per il numero di alleli, non sono dissimili dai valori trovati in precedenti lavori (Laval et al., 2000; San Cristobal et al., 2006) anche se non tutti i *loci* microsatelliti utilizzati coincidono.

La riduzione di eterozigosità *inter*-popolazione è rappresentata dall'indice  $F_{it}$  che rappresenta anche un indice di differenziazione tra le popolazioni, infatti spiega quanta parte di variabilità genetica è distribuita *tra* le popolazioni e nel nostro caso è  $0,177 \pm 0,03$ ; tale valore, secondo la classificazione di Wright, indica una *forte* differenziazione tra le popolazioni oggetto di studio.

L'analisi di corrispondenza fattoriale (AFC) che simula l'indice  $F_{st}$  di Robertson and Hill (Robertson et al., 1984), eseguita con il software GENETIX 4.05, distingue 4 *cluster* relativi alle 4 popolazioni.

Visto il grado di demarcazione tra le popolazioni suine oggetto di studio l'LGS ha proceduto con l'attribuzione probabilistica di un individuo alla popolazione di appartenenza con 17 microsatelliti utilizzando i *software* WhichRUN e STRUCTURE e come soglia di significatività la stringenza 2. L'attribuzione degli individui si basa sull'utilizzo del metodo delle frequenze alleliche di Paetkau et al. (1995).

Con 17 microsatelliti è possibile effettuare la corretta attribuzione per il 100% degli animali (tab. 3) con valori di stringenza molto elevati (es. *Lod Ratio* >10).

### SNPs

Il *panel* di 60 SNPs è stato scelto in collaborazione tra LGS, Istituto Spallanzani e ConSDABI e gli SNPs sono situati sia in regioni genomiche codificanti sia in regioni non-codificanti. Sono stati genotipizzati in *outsourcing* 246 suini appartenenti a 8 popolazioni di cui 4 razze cosmopolite (LW =18, L =17,

LOCUS	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>
SW1370	0,083	0,309	0,246
SW2038	0,020	0,163	0,146
SW1035	0,081	0,261	0,196
SO017	0,044	0,367	0,337
SW1823	-0,035	0,102	0,132
SWRI53	-0,032	0,080	0,109
SW1928	0,046	0,081	0,061
SW1873	0,012	0,177	0,166
SW1693	-0,114	0,004	0,106
SW1556	0,822	0,880	0,322
SW240	-0,006	0,197	0,202
SW951	0,250	0,259	0,012
SW857	0,088	0,246	0,173
SO155	0,208	0,399	0,241
SO101	0,101	0,255	0,171
SO355	0,266	0,410	0,196
SO005	0,125	0,246	0,139

Tab. 2 *Indici F di Wright entro ciascun locus microsatellite.*

POPOLAZIONE	N	LARGE WHITE	LANDRACE	PIETRAIN	DUROC	STRINGENZA
LARGE WHITE	20	20				LOD ratio>2
LANDRACE	19		19			LOD ratio>2
PIETRAIN	18			18		LOD ratio>2
DUROC	20				20	LOD ratio>2

Tab. 3 *Attribuzione di popolazione con 17 loci microsatelliti.*

P =13, D =16) fornite da LGS e 4 Tipi Genetici Autoctoni di cui uno fornito dall’LGS [Apulo Calabrese (Nero Lucano) =58] e 3 dal ConSDABI [Apulo-Calabrese (Calabrese) =46, Casertana =48, Nero Siciliano = 30).

Dei 60 SNPs scelti, 44 sono risultati essere idonei per eseguire il profilo genotipico dei suini perché alcuni non si sono amplificati e altri sono risultati monomorfici. I 44 SNPs sono stati utilizzati per l’assegnazione di un individuo alla popolazione usando il software STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al., 2003) applicando l’analisi “*parametric genetic mixture*”. Il numero di *cluster* K (k=8) è stato testato usando il modello *admixture* e un *burning period* di 10.000.

Anche se il grado di demarcazione tra le razze cosmopolite Large White e Pietrain è basso, il *panel* riesce a distinguere chiaramente le altre due razze Landrace e Duroc e tutti i TGA, uno degli obiettivi della presente linea di ricerca. Inoltre, per il TGA Calabrese si rileva una strutturazione in due sub-popolazioni.

### *Conclusioni*

I due *panel* di marcatori (microsatelliti e SNP) sono risultati essere entrambi efficaci per la demarcazione tra le popolazioni e per l'assegnazione di un individuo alla popolazione d'origine.

A causa del loro più basso livello d'informazione in termini di polimorfismo, rispetto ai microsatelliti, sarebbe opportuno incrementare il numero di SNPs per ottenere un potere di esclusione più alto ai fini della tracciabilità di razza.

### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Daniela Iamartino (Ricercatore CRSA)  
Adele Lanza (Ricercatore LGS Potenza)  
Cinzia Varlotta (Tecnico LGS Potenza)

### TRASFERIMENTO

Conoscenze trasferibili:

*Panel* di microsatelliti e *panel* di SNP per la tracciabilità individuale e per la tracciabilità di razza nella specie suina.

### PUBBLICAZIONI

- 1) BLASI M., IAMARTINO D., BONGIONI G., GUASTELLA, A.M., PASQUARIELLO, R., PANE F., MATASSINO D. (2009): *STRs vs SNPs for pig traceability purposes*, Proceedings of the ASPA 18th Congress, Palermo 9-12 giugno 2009.
- 2) MATASSINO D., BLASI M., BONGIONI G., INCORONATO C., OCCIDENTE M., PANE F., PASQUARIELLO R., NEGRINI R. (2010): *Authentication of swine derived products by means of SNP and STR markers*, 61<sup>st</sup> Meeting of the European Association for Animal Production, Heraklion, Creta (Grecia), 23-27 agosto 2010, *in press*.



GRAZIELLA BONGIONI\*

## Rintracciabilità di razze suine autoctone con marcatori SNP\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

La tracciabilità ordinaria nella filiera agro-alimentare è data dalla capacità di “tracciare”, in ogni fase del processo produttivo e distributivo, il percorso di un alimento. Nell'ambito della produzione di prodotti tradizionali o locali questi controlli a campione sono utili per garantire oltre alla provenienza geografica, anche il rispetto dei relativi disciplinari di produzione. È importante, quindi, poter certificare e validare questo percorso in modo oggettivo, al fine di valorizzare gli sforzi compiuti per realizzare un prodotto di qualità. Il tipo genetico autoctono antico (TGAA) suino “Casertana” è impiegato in linee sperimentali di produzione per le quali ogni prodotto è identificato dal numero di lotto di produzione e dall'identificativo del suino. L'obiettivo di questa linea di ricerca è lo sviluppo di un sistema genetico-molecolare che, tramite il confronto di regioni specifiche del DNA, permetta di verificare se il prodotto finito appartenga o no al suino utilizzato per la produzione dello stesso.

### MATERIALE E METODOLOGIE

La linea di ricerca ha riguardato due tipologie di campioni:

- Duecentocinquantesette campioni di DNA: 104 Apulo-Calabrese (46 Calabrese e 58 Nero Lucano), 48 Casertana, 16 Duroc, 17 Landrace, 18 Large White, 30 Nero Siciliano e 13 Pietrain.

\* *Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani*

\*\* *Unità di ricerca Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani, responsabile scientifico dott. Graziella Bongioni*

SNP	LOCUS	AL 1	AL 2	DISTRIBUZIONE NUMERICA DEI GENOTIPI OSSERVATI					FREQUENZA GENOTIPICA			PI
				(1,1) <sup>a</sup>	(2,2) <sup>b</sup>	(1,2) <sup>c</sup>	N.F. <sup>d</sup>	TOT	(1,1) <sup>a</sup>	(2,2) <sup>b</sup>	(1,2) <sup>c</sup>	
SNP_01	G72696	G	A	8	176	49	13	233	0,034335	0,755365	0,2103	0,615981
SNP_02	Y16180	G	C	38	115	77	16	230	0,165217	0,5	0,334783	0,389376
SNP_03	G72449	G	A	0	234	4	8	238	0	0,983193	0,016807	0,966951
SNP_04	G72776	T	C	35	84	119	8	238	0,147059	0,352941	0,5	0,396194
SNP_05	SSERG3	G	A	22	141	79	4	242	0,090909	0,582645	0,326446	0,454306
SNP_06	G72882	T	C	30	134	73	9	237	0,126582	0,565401	0,308017	0,430576
SNP_08	BV103395	T	C	199	4	34	9	237	0,839662	0,016878	0,14346	0,725899
SNP_09	BV677937	T	C	226	9	5	6	240	0,941667	0,0375	0,020833	0,888576
SNP_12	BV103380	G	A	128	50	50	18	228	0,561404	0,219298	0,219298	0,411357
SNP_13	BV678004	T	C	27	111	92	16	230	0,117391	0,482609	0,4	0,406692
SNP_14	BV680515	T	C	195	7	25	19	227	0,859031	0,030837	0,110132	0,751014
SNP_15	BV680501	C	A	205	4	22	15	231	0,887446	0,017316	0,095238	0,79693
SNP_16	BV680504	G	A	187	7	33	19	227	0,823789	0,030837	0,145374	0,700712
SNP_20	BV103318	T	C	177	5	49	15	231	0,766234	0,021645	0,212121	0,632578
SNP_21	G72815	T	A	148	24	57	17	229	0,646288	0,104803	0,248908	0,490628
SNP_23	U70883	C	T	3	216	26	1	245	0,012245	0,881633	0,106122	0,788688
SNP_24	X68247	C	T	0	217	18	11	235	0	0,923404	0,076596	0,858542
SNP_25	BV103322	G	A	184	8	18	36	210	0,87619	0,038095	0,085714	0,776508
SNP_26	AF038553	G	A	78	61	98	9	237	0,329114	0,257384	0,413502	0,345546
SNP_27	E08096	G	A	1	211	32	2	244	0,004098	0,864754	0,131148	0,765016
SNP_28	DQ387970	T	C	141	45	45	15	231	0,61039	0,194805	0,194805	0,448474

a omozigoti per allele 1, <sup>b</sup> omozigote per allele 2, <sup>c</sup> eterozigoti, <sup>d</sup> nessun segnale.

<sup>a</sup> omozigoti per allele 1, <sup>b</sup> omozigote per allele 2, <sup>c</sup> eterozigoti, <sup>d</sup> nessun segnale.

Tab. 1 *SNPs validati: locus, distribuzione numerica dei genotipi osservati, frequenza genotipica e PI (Segue)*

SNP_29	X93016	T	C	160	12	34	40	206	0,776699	0,058252	0,165049	0,633896
SNP_32	AY690660	T	C	143	9	75	19	227	0,629956	0,039648	0,330396	0,507578
SNP_33	Y16039	T	G	156	9	63	18	228	0,684211	0,039474	0,276316	0,546053
SNP_34	AF458070	G	A	235	3	0	8	238	0,987395	0,012605	0	0,975108
SNP_35	AJ557221	G	A	167	16	43	20	226	0,738938	0,070796	0,190265	0,587243
SNP_36	AY870460	G	A	158	13	60	15	231	0,683983	0,056277	0,25974	0,538464
SNP_37	AJ557235	T	C	112	31	82	21	225	0,497778	0,137778	0,364444	0,399585
SNP_40	DQ144454	G	A	137	54	40	15	231	0,593074	0,233766	0,17316	0,436367
SNP_41	BV103107	G	A	187	9	44	6	240	0,779167	0,0375	0,183333	0,642118
SNP_42	U73326	T	C	226	0	10	10	236	0,957627	0	0,042373	0,918845
SNP_43	BV103254	G	A	29	95	108	14	232	0,125	0,409483	0,465517	0,400007
SNP_44	AF087937	G	A	23	148	55	20	226	0,10177	0,654867	0,243363	0,498434
SNP_45	BV103544	G	A	120	26	81	19	227	0,528634	0,114537	0,356828	0,419899
SNP_46	BV103479	G	C	129	36	64	17	229	0,563319	0,157205	0,279476	0,420148
SNP_47	AF329087	G	C	78	85	67	16	230	0,33913	0,369565	0,291304	0,336446
SNP_48	AF451836	T	G	210	1	14	21	225	0,933333	0,004444	0,062222	0,875002
SNP_49	AY233130	G	C	104	32	100	10	236	0,440678	0,135593	0,423729	0,392129
SNP_58	X98558	T	C	201	7	26	12	234	0,858974	0,029915	0,111111	0,751078
SNP_59	AY487830	T	C	112	34	77	23	223	0,502242	0,152466	0,345291	0,394719
SNP_60	AY487830	T	C	197	5	31	13	233	0,845494	0,021459	0,133047	0,733021

<sup>a</sup> omozigoti per allele 1, <sup>b</sup> omozigote per allele 2, <sup>c</sup> eterozigoti, <sup>d</sup> nessun segnale.

Tab. 1 *SNPs validati. locus, distribuzione numerica dei genotipi osservati, frequenza genotipica e PI*

- Quaranta campioni di prodotto finito: campioni individuali di prodotto (fresco e/o stagionato) ottenuti dai TGAA Casertana e Calabrese per la verifica di filiera. L'analisi degli SNP è stata eseguita in *outsourcing* presso KBioscience.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

La prima fase dell'attività del progetto, svolta in collaborazione con LGS e ConSDABI, ha comportato una ricerca in letteratura e in banca dati (www.ncbi.nlm.nih.gov.) al fine di individuare 60 potenziali SNPs informativi per le analisi di *fingerprinting* molecolare. Il pannello è stato testato in *out-sourcing* presso Kbioscience (UK), su 257 campioni di DNA e 47 dei 59 SNPs testati hanno superato il test di validazione. I genotipi ottenuti per i 47 SNPs testati sono stati utilizzati per definire il grado di informatività valutando le frequenze genotipiche e la probabilità d'identità (PI).

In particolare 6 SNPs sono risultati monomorfici in tutti i campioni analizzati: SNP\_10 (BV677952), SNP\_18 (BV677977), SNP\_30 (BV103322), SNP\_39 (AF356175), SNP\_54 (AF326520) e SNP\_55 (AM231528).

Nella tabella 1 sono riportati per ciascun SNP il *locus*, il tipo di polimorfismo, la distribuzione numerica dei genotipi osservati, il numero di analisi che non hanno prodotto genotipi, la frequenza genotipica e la PI; quest'ultima è risultata pari a  $7,74^{-11}$ . È stata calcolata la probabilità di individuare 2 soggetti che, scelti a caso all'interno della popolazione, avessero lo stesso genotipo per i 41 SNPs testati ed è risultata, rispettivamente, pari a:  $5,9 \times 10^{-9}$  per il TGA Calabrese,  $1,0 \times 10^{-8}$  per il TGAA Casertana,  $7,7 \times 10^{-8}$  per la razza Duroc,  $1,33 \times 10^{-8}$  per la razza Landrace,  $1,4 \times 10^{-11}$  per la razza Large White,  $1,4 \times 10^{-5}$  per il TGA Nero Lucano,  $9,4 \times 10^{-9}$  per il tipo genetico Nero Siciliano e  $1,6 \times 10^{-10}$  per la razza Pietrain.

Successivamente è stata condotta l'analisi per i 40 campioni di prodotto.

In questa seconda fase, 3 dei 41 SNPs precedentemente validati (SNP\_26, SNP\_35 e SNP\_40) non hanno dato risultato o non hanno confermato l'andamento della precedente analisi e pertanto sono stati esclusi dal pannello impiegato per il test di tracciabilità genetica.

Il risultato finale dell'attività ha comportato la definizione di un *chip* di 38 SNPs ( $PI = 8,7 \times 10^{-10}$ ) utilizzabili per il test di rintracciabilità genetica sui campioni di prodotto dei TGAA "Casertana e Calabrese".

La ricerca svolta ha evidenziato che l'impiego degli SNPs su larga scala è vantaggioso in quanto l'analisi è automatizzabile e l'interpretazione del risultato è gestibile direttamente dal *software*.



Lo studio della frequenza generale sull'intera popolazione ha evidenziato che il pannello di SNP selezionato è adeguato per le filiere di prodotti locali tradizionali. La possibilità di validare la tracciabilità ordinaria con i risultati dell'analisi molecolare ha ricadute benefiche sulla filiera di produzione e di trasformazione delle carni in quanto, nel caso di esito positivo, le informazioni contenute in etichetta risultano "certificate", mentre gli esiti negativi (etichettatura errata), permettono di individuare i punti critici della filiera e attivare azioni correttive.

L'utilizzo della tracciabilità genetica determina quindi un aumento delle garanzie offerte al consumatore e la possibilità per le imprese di differenziarsi sul mercato e di garantire la veridicità delle informazioni presenti sull'etichetta.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Bongioni Graziella (Ricercatore)  
Cenadelli Silvia (Ricercatore)

#### PRODOTTI

– Metodica di analisi

#### TRASFERIMENTO

Conoscenze trasferibili:  
*Panel* di SNP per la Tracciabilità Genetica

#### BREVETTI

Nessuno

#### PUBBLICAZIONI

- 1) BLASI M., IAMARTINO D., BONGIONI G., GUASTELLA A.M., PASQUARIELLO R., PANE F., MATASSINO D. (2009): *STRs vs SNPs for pig traceability purposes*, Proceedings of the ASPA 18th Congress, Palermo 9-12 giugno 2009.

- 2) MATASSINO D., BLASI M., BONGIONI G., INCORONATO C., OCCIDENTE M., PANE F., PASQUARIELLO R. AND NEGRINI R. (2010): *Authentication of swine derived products by means of SNP and STR markers*, 61<sup>st</sup> Meeting of the European Association for Animal Production, Heraklion, Creta (Grecia), 23-27 agosto 2010, *in press*.

PAOLO AJMONE-MARSAN\*

## Tracciabilità specie bovina\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

I metodi di tracciabilità obbligatori si basano su registrazioni ed etichettature che identificano gli animali e i loro prodotti durante tutte le fasi della filiera produttiva. Affiancare a questi un sistema di tracciabilità molecolare può costituire uno strumento innovativo in grado di aumentarne l'efficienza e il livello di protezione e sicurezza contro errori casuali o frodi.

Con l'analisi statistica di marcatori polimorfici a livello del DNA si può determinare l'appartenenza di un animale a una razza. Di particolare interesse per la tracciabilità di razza sono le mutazioni puntiformi chiamate SNPs (Negri et al., 2008; 2009) (*Single Nucleotide Polymorphisms*) identificate in geni candidati perché fissati in forme diverse nelle diverse razze.

Obiettivo di questa Unità di Ricerca è stato quello di analizzare alcuni geni implicati nella determinazione del colore del mantello nella specie bovina per mettere a punto un pannello di SNPs utile per tracciare gli animali e i prodotti di origine animale monorazza.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Per raggiungere l'obiettivo sono stati raccolti campioni biologici di 350 animali di 13 razze bovine italiane o allevate in Italia con diverso colore del mantello (tab. 1).

\* Università Cattolica del Sacro Cuore, Istituto di Zootecnica

\*\* Unità di ricerca Università Cattolica di Piacenza, responsabile scientifico prof. Paolo Ajmone-Marsan

RAZZA	N° ANIMALI	FENOTIPO AL COLORE DEL MANTELLO
Bruna Italiana	27	Bruno
Cabannina	32	Bruno Scuro
Chianina	27	Bianco Porcellana
Cinisara	8	Nero Uniforme
Frisona Italiana	29	Pezzato Nero
Grigio Alpina	30	Grigio
Jersey	18	Bruno Diluito
Limousine	26	Rosso Diluito
Modicana	12	Rosso Scuro
Podolica	25	Dal Grigio Chiaro al Grigio Scuro
Pezzata Rossa Italiana	33	Pezzato Rosso
Rendena	63	Da Castano Chiaro a Castano Scuro
Valdostana	20	Pezzato Rosso e Pezzato Nero-Castano

Tab. 1

Una volta estratto il DNA, l'identificazione degli SNPs è stata fatta sequenziando alcune regioni codificanti e non di 14 geni implicati nella determinazione del colore del mantello. Gli SNPs identificati sono stati genotipizzati sugli animali campionati. I genotipi ottenuti sono stati analizzati con il *software* PowerMarker (<http://www.powermarker.net>), per stimare alcuni parametri genetici e utilizzati per i test di assegnazione di razza con il *software* GeneClass (<http://www.ensam.inra.fr/URLB/geneclass/gene.html>).

Sono stati inoltre messi a punto protocolli di estrazione di DNA da latte, yogurt e formaggi a diversa stagionatura. Su questi campioni sono state fatte, con l'utilizzo della PCR quantitativa, analisi dei polimorfismi del gene *MC1R* per identificare l'allele "e" recessivo, che in forma omozigote causa il colore rosso, e l'allele dominante "Ed" che determina il colore nero (Klungland et al., 1995).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

L'identificazione degli SNPs è stata condotta sequenziando alcune regioni di 14 geni del colore in 12 animali rappresentativi dei diversi fenotipi al colore del mantello delle razze campionate. L'allineamento delle sequenze ottenute ha permesso di individuare 75 SNPs.

Le genotipizzazioni dei 75 SNPs e di due polimorfismi del gene *MC1R* (il polimorfismo responsabile del rosso recessivo e il polimorfismo per il nero dominante) nei campioni raccolti sono state condotte avvalendosi del servizio offerto dalla Kbioscience (<http://kbioscience.co.uk>). Sono stati ottenuti risultati di genotipizzazione per 70 dei 77 SNPs.

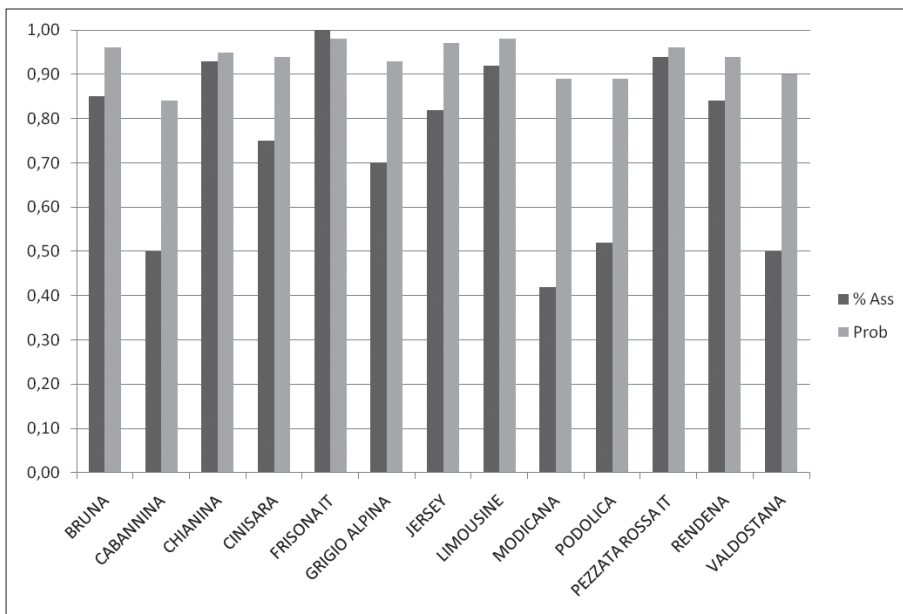


Fig. 1

I risultati sono stati elaborati con il *software* PowerMarker per la stima dei principali parametri genetici utili per la descrizione dei polimorfismi identificati. Sono state calcolate: le frequenze alleliche, l'eterozigosi attesa e osservata e l'indice  $F_{st}$  (Wright, 1965), che indica la capacità di un marcatore di "spiegare" la differenza entro razza. L'indice  $F_{st}$  e le frequenze alleliche dei marcatori nelle diverse razze sono servite per identificare i marcatori più informativi e quindi particolarmente utili per la tracciabilità di razza.

I valori di  $F_{st}$  sono risultati compresi in un intervallo che va da 0,004 a 0,856, con un valore medio pari a 0,133. I 2 polimorfismi del gene *MC1R* mostrano i valori di  $F_{st}$  più elevati: 0,856 per l'allele "e" del rosso recessivo e 0,848 per l'allele "Ed" del nero dominante. Per il gene *KIT* è stato identificato uno SNP sinonimo (cioè che non cambia l'amminoacido) nell'esone 2 che ha mostrato un  $F_{st}$  di 0,405.

Con il *software* PowerMarker è stata condotta l'analisi di *linkage disequilibrium* degli SNPs che permette di individuare coppie di marcatori in *linkage* per eliminarne uno dei due dal pannello da utilizzare per le analisi di assegnazione. Questo valore è compreso tra 0 (l'assenza di *linkage*) e 1, in questo caso è stata scelta la soglia di 0,7 per considerare i 2 marcatori in *linkage*. Il *linkage* fra 2 marcatori rende il loro potere informativo ridondante nelle successive

analisi di assegnazione. Questa analisi ha portato all'eliminazione di 18 SNPs, quindi per le analisi di assegnazione sono stati utilizzati 52 SNPs.

Per i test di assegnazione è stato utilizzato il software GeneClass, in particolare un algoritmo statistico basato su un metodo Bayesiano (Rannala e Mountain, 1997). I metodi Bayesiani utilizzano particolari funzioni di probabilità per stimare le frequenze alleliche delle popolazioni di riferimento a partire dalle frequenze osservabili nel campione. L'attribuzione viene fatta calcolando la probabilità marginale di osservare il genotipo degli individui ignoti all'interno di ciascuna delle popolazioni di riferimento in base alle frequenze alleliche stimate. La percentuale di animali correttamente assegnati (%Ass, fig. 1) è stata calcolata dal rapporto tra il numero di animali assegnati correttamente alla razza "j" e il numero di animali analizzati per la razza "j". La probabilità di assegnazione media (Prob, fig. 1) rappresenta la media delle percentuali di assegnazione degli animali assegnati correttamente calcolata per razza. I risultati dell'assegnazione sono riportati nella figura 1. Il valore soglia di probabilità, cioè la probabilità minima con cui considerare corretta l'assegnazione, è stato considerato pari al 50%.

Il 78% degli animali è risultato correttamente assegnato con una probabilità media di assegnazione del 94%. Le razze meglio assegnate risultano la Pezzata Rossa Italiana e la Frisona Italiana. Questo risultato è atteso visto il forte potere informativo dei marcatori nei geni *MC1R* e *KIT*, rispettivamente legati alla presenza di eumelanina nera o rossa e alla presenza di pezzature bianche. In particolare, tutti gli animali di Frisona italiana sono risultati correttamente assegnati con una probabilità media di assegnazione pari al 98%, e per la Pezzata Rossa Italiana è risultato correttamente assegnato il 94% degli animali con una probabilità di assegnazione media del 96%. Anche per le razze Chianina e Limousine sono stati ottenuti dei buoni risultati. La percentuale di animali correttamente assegnata è risultata, rispettivamente, del 93% e del 92% con una probabilità di assegnazione media del 95% e del 96%.

Le analisi di PCR quantitativa di prodotti lattiero-caseari è stata condotta con particolare attenzione verso i prodotti presenti nella regione Trentino, in quanto parte dei risultati descritti è il frutto di un progetto finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento con obiettivo la valorizzazione della razza Rendena attraverso la messa a punto di metodiche di tracciabilità molecolare di prodotti monorazza.

I risultati ottenuti evidenziano che l'analisi dei 2 polimorfismi del gene *MC1R* è efficace nel determinare l'assenza di latte proveniente da razze feomelaniche (rosse) ed eumelaniche (nere) nei prodotti lattiero-caseari e quindi autenticare prodotti di sola razza Rendena. Infatti, i 33 campioni monorazza di Rendena analizzati (18 formaggi, 14 yogurt e 1 latte) sono stati corretta-

mente assegnati. Inoltre la metodica utilizzata è risultata in grado di funzionare correttamente su diversi tipi di prodotti ottenuti a partire da latte di sola razza Rendena, tra cui formaggi prodotti con metodi di caseificazione diversi e con diversi tempi di stagionatura e diverse tipologie di yogurt (intero o alla frutta).

#### BIBLIOGRAFIA

- <http://kbioscience.co.uk>.  
<http://www.ensam.inra.fr/URLB/geneclass/geneclass.html>.  
<http://www.powermarker.net>  
 KLUNGLAND H. ET AL. (1995): «Mamm. Genome», 6, pp. 636-663.  
 NEGRINI R. ET AL. (2008): «Meat Sci.», 80, pp. 1212-17.  
 NEGRINI R. ET AL. (2009): «Anim. Genet.», 40 (1), pp. 18-26.  
 RANNALA B. E MOUNTAIN J.L. (1997): «Proc. Natl. Acad. Sci.», USA, 94, pp. 9197-221.  
 WRIGHT S. (1965): «Evolution», 19, pp. 395-420.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Letizia Nicoloso (COCOCO)  
 Paola Crepaldi (Ricercatore)  
 Stella Passerotti (Ricercatore)  
 Dott.ssa Manuela Malavolta (Ricercatore)

#### PRODOTTI

- protocolli di PCR per l'analisi delle regioni dei geni candidati studiati; 75 SNP identificati nei 14 geni candidati.
- dati di genotipizzazione di 70 SNP in 350 animali appartenenti a 13 razze bovine.
- protocolli di estrazione di DNA genomico da formaggio, yogurt e latte.
- protocollo PCR quantitativa per la valutazione di due polimorfismi del gene MC1R.

#### TRASFERIMENTO

Possibilità di utilizzare il pannello di SNP individuato per la tracciabilità di razza per le razze bovine studiate; dati di genotipizzazione relativi a 70 SNPs per 350 animali appartenenti a 13 razze; protocolli di analisi di PCR *RealTime*.

PUBBLICAZIONI

- 1) NICOLOSO L., CREPALDI P., MILANESI E., PERINI D., AJMONE MARSAN P., NEGRINI R. (2009): *SNPs discovery and genotyping in coat colour genes towards cattle breeds and products traceability*, ASPA, Associazione Scientifica di Produzione Animale, XVIII Congresso Nazionale, Palermo, 9-12 giugno.



LUCA FONTANESI\*

# Individuazione di marcatori razza specifici in geni del colore del mantello per l'autenticazione di alcuni prodotti monorazza derivati da razze locali suine e ovine\*\*

## STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

L'identificazione di marcatori del DNA razza specifici rappresenta il primo passo per la messa a punto di sistemi di autenticazione di prodotti monorazza con l'obiettivo di valorizzare e di difendere da frodi prodotti di razze locali. Questi aspetti hanno importanti ricadute sull'economicità dell'allevamento di razze meno produttive con conseguenti effetti sulla possibilità di mantenere e di utilizzare la biodiversità zootecnica. Scopo della ricerca è stato quello di individuare, in geni che influenzano il colore del mantello (*ASIP*, *MC1R* e *KIT*), marcatori razza specifici o utilizzabili in sistemi di autenticazione di alcuni prodotti monorazza derivati da razze locali suine, ovine e caprine. Come scopo secondario, ma propedeutico allo scopo primario, lo studio è stato mirato a chiarire i meccanismi genetici che determinano le differenze nel colore del mantello tra razze suine, ovine e caprine. Il carattere colore del mantello, infatti, rappresenta il principale carattere distintivo tra razze.

## MATERIALE E METODOLOGIE

Sono stati ottenuti campioni di materiali biologici e DNA da suini, ovini e caprini di diverse razze e popolazioni locali e cosmopolite. Sono stati sequenziati i geni *MC1R*, *ASIP* e *KIT* nelle diverse specie/razze. Sono stati identificati polimorfismi, alcuni dei quali sono stati utilizzati per la messa a punto di

\* Università degli Studi di Bologna, Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare

\*\* Unità di ricerca Università degli Studi di Bologna, responsabile scientifico dott. Luca Fontanesi

test molecolari utilizzati anche su DNA estratto da formaggi ovini e da carne suina.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

### *Suini*

L'utilizzo combinato di mutazioni nei geni *MC1R* e *KIT* permette, almeno in parte, di poter escludere la provenienza della carne da alcuni tipi genetici. Alcuni di questi marcatori sono stati già riportati dalla letteratura scientifica ma, al momento, non erano stati ancora testati nelle razze oggetto di questa ricerca. In particolare, abbiamo dimostrato che l'analisi di polimorfismi nel gene *KIT*, che determinano il colore bianco dominante del mantello, permette di distinguere la carne proveniente da suini neri (Nero Siciliano) da suini delle razze e ibridi commerciali a mantello bianco. Oltre a questa applicazione, gli studi effettuati nel gene *KIT* hanno permesso di acquisire altre interessanti informazioni per capire la genetica del colore del mantello nel suino, gli effetti della selezione sulla variabilità genetica di questo carattere e dei geni che sono coinvolti nel suo determinismo. Il sequenziamento comparativo del gene *KIT* in 35 suini di diverse razze ha messo in evidenza un totale di 69 polimorfismi. Utilizzando questi marcatori è stato possibile stabilire che i suini di popolazione grigia sono portatori di un allele al locus *KIT*, identificato come  $I^D$ , che era stato supposto essere presente nel suino partendo solo da studi di genetica classica. Inoltre, analizzando gli aplotipi del gene *KIT* nei suini di razza Hampshire e Cinta Senese abbiamo dimostrato che queste due razze cinghiate presentano "selection signature" in questa regione e sono quasi fissate per lo stesso aplotipo. Tuttavia, probabilmente entrambe portano alleli non tipici (che non sono coinvolti nella caratteristica cinghiatura) ma recessivi e che quindi potrebbero essere eliminati da queste razze mediante selezione assistita da marcatori.

### *Ovini*

Lo studio ha permesso di identificare diverse mutazioni nel gene *MC1R* che potrebbero essere utilizzate per alcune applicazioni, sia per l'autenticazione di prodotti monorazza, sia in piani selettivi per la valorizzazione delle fibre. In particolare, una di queste mutazioni, 199C>T, causa una sostituzione amino-

acidica (R67C) in una posizione molto conservata della proteina. Sulla base delle analisi effettuate *in silico*, questo cambiamento aminoacidico dovrebbe inattivare la funzione della proteina causando la produzione di pigmenti rossi. Questa mutazione è stata identificata solo nella razza Valle del Belice e dovrebbe rappresentare l'allele "e" recessivo al *locus Extension*, che fino a ora non era stato riportato dagli studi sul colore del mantello negli ovini. Questo allele potrebbe essere utilizzato per la costituzione di linee specifiche per la produzione di lana colorata naturalmente. Un'altra mutazione nella regione 5'-UTR del gene *MC1R* (-31G>A) è risultata fissata nella razza Massese. Tutti i soggetti analizzati per questa razza erano infatti omozigoti per l'allele -31A. Questo allele è stato identificato anche in altre razze ovine, ma in frequenza molto bassa. Per questo motivo è stato possibile mettere a punto un sistema di autenticazione di formaggi ottenuti con solo latte di Massese. La presenza dell'allele -31G indicherebbe che il formaggio non deriva da solo latte di Massese. Il sistema è basato sull'amplificazione di DNA estratto da formaggio e dall'analisi PCR-RFLP di questo polimorfismo. La sensibilità del metodo permette di identificare la presenza di latte non di Massese con una sensibilità del 5-10% di DNA di altre razze.

L'analisi del gene *ASIP* ha permesso di chiarire i meccanismi genetici che determinano il colore del mantello nella razza Massese. Nella razza Massese sono presenti animali con mantello nero e con mantello grigio. Gli animali con mantello grigio sono risultati portatori di un allele particolare al *locus ASIP*. Questo allele è caratterizzato da una duplicazione completa del gene. Il mantello nero è determinato in parte dalla combinazione di altri alleli del gene *ASIP* e del gene *MC1R*. Molte altre razze ovine italiane sono state caratterizzate sia per mutazioni nel gene *MC1R* che nel gene *ASIP* e queste informazioni potrebbero essere utilizzate per diverse altre applicazioni.

### *Caprini*

Lo studio ha permesso di identificare diverse mutazioni nei geni *MC1R* e *ASIP*, di chiarire alcuni meccanismi genetici che determinano il colore del mantello in razze caprine e proporre sistemi di autenticazione e strategie per l'ottenimento di alcuni prodotti monorazza caprini. Per quanto riguarda il gene *MC1R* sono state identificate tre mutazioni missenso (A81V, F250V e C267W) e una mutazione non-senso (Q225X). Quest'ultima determina un codone di stop che provoca l'eliminazione di una parte della proteina. Questa mutazione è associata al colore rosso del mantello (presenza di macchie rosse)

nella razza Girgentana. Tuttavia la frequenza dell'allele mutato è risultata solo del 33% nella razza Rossa Mediterranea, il che supporta il fatto che questa mutazione non è la sola che determina il colore rosso del mantello in questa razza. Altre mutazioni, probabilmente in altri geni, dovrebbero influenzare il colore del mantello in questa razza. La mutazione C267W è stata associata al colore nero del mantello nella razza Maltese. La mutazione Q225X, essendo quasi fissata nella razza Girgentana, potrebbe essere utilizzata per la messa a punto di sistemi di autenticazione di eventuali produzioni di sola Girgentana. Tuttavia, sarebbe necessario intervenire con la selezione per eliminare gli altri alleli dalla popolazione. L'analisi del gene *ASIP* ha evidenziato un meccanismo di variabilità genetica sorprendente. Il gene è interessato da "copy number variation" cioè dalla presenza di alleli caratterizzati da duplicazioni in tandem del gene. La duplicazione sembra essere associata al colore bianco del mantello nelle razze Saanen e Girgentana aprendo altre prospettive per l'autenticazione di prodotti monorazza.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Francesca Beretti (Dottoranda)  
 Emilio Scotti (Tecnico)  
 Stefania Dall'Olio (Professore associato)  
 Vincenzo Russo (Professore ordinario)

#### PRODOTTI

- Sequenze nucleotidiche depositate in banca dati, polimorfismi, test genetici, protocolli di analisi di prodotti monorazza, metodiche di analisi di CNVs.

#### TRASFERIMENTO

Conoscenza sui meccanismi di determinazione genetica del colore del mantello in razze suine, ovine e caprine, proposte per l'eliminazione di alleli fuori tipo in alcune razze; protocolli di autenticazione di prodotti monorazza.

#### BREVETTI

## PUBBLICAZIONI

*Pubblicazioni su riviste scientifiche con impact factor*

- 1) FONTANESI L., BERETTI F., RIGGIO V., DALL'OLIO S., GÓMEZ GONZÁLEZ E., FINOCCHIARO R., DAVOLI R., RUSSO V., PORTOLANO B. (2009): *Missense and nonsense mutations in melanocortin 1 receptor (MC1R) gene of different goat breeds: association with red and black coat colour phenotypes but with unexpected evidences*, «BMC Genetics», 10, p. 47.
- 2) FONTANESI L., BERETTI F., RIGGIO V., GÓMEZ GONZÁLEZ E., DALL'OLIO S., DAVOLI R., RUSSO V., PORTOLANO B. (2009): *Copy number variation and missense mutations of the agouti signaling protein (ASIP) gene in goat breeds with different coat colours*, «Cytogenetic and Genome Research», 126, pp. 333-347.
- 3) FONTANESI L., D'ALESSANDRO E., SCOTTI E., LIOTTA L., CROVETTI A., CHIOFALO V., RUSSO V. (2010): *Genetic heterogeneity and selection signature at the KIT gene in pigs showing different coat colours and patterns*, «Animal Genetics», DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02054.x.
- 4) FONTANESI L., BERETTI F., RIGGIO V., DALL'OLIO S., CALASCIBETTA D., RUSSO V., PORTOLANO B. (2010): *Sequence characterization of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene in sheep with different coat colour and identification of the putative e allele at the ovine Extension locus*, «Small Ruminant Research», DOI:10.1016/j.smallrumres.2010.03.015.
- 5) FONTANESI L., DALL'OLIO S., BERETTI F., PORTOLANO B., RUSSO V. (2010): *Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signaling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes*, «Animal», in press.
- 6) FONTANESI L., BERETTI F., DALL'OLIO S., PORTOLANO B., MATASSINO D., RUSSO V. (2010): *A melanocortin 1 receptor (MC1R) gene polymorphism is useful for authentication of Massese sheep dairy products*, Submitted.

*Atti di convegni*

- 1) FONTANESI L., D'ALESSANDRO E., SCOTTI E., LIOTTA L., CHIOFALO V., RUSSO V. (2008): *Identification of new alleles at the KIT locus in Nero Siciliano pigs*, Proceedings of the Second European Conference on Pig Genomics, Pig Genome II, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, June 4-5, 2008, p. 56 (Poster - Abstract).
- 2) FONTANESI L., D'ALESSANDRO E., SCOTTI E., LIOTTA L., CHIOFALO V., RUSSO V. (2008): *Investigation of the KIT gene in Nero Siciliano pigs with different coat colour phenotypes*, Proceedings of the ISAG2008 Conference, 20-24 July 2008, Amsterdam, The Netherlands. (Poster - Abstract).
- 3) FONTANESI L., BERETTI F., DALL'OLIO S., RIGGIO V., GOMEZ GONZALES E., DAVOLI R., PORTOLANO B., RUSSO V. (2008): *Copy number variation and missense mutations in the caprine agouti signaling protein (ASIP) gene are present in goat breeds with different coat colours*, Proceedings of the ISAG2008 Conference, 20-24 July 2008, Amsterdam, The Netherlands (Poster - Abstract).
- 4) FONTANESI L., BERETTI F., DALL'OLIO S., RIGGIO V., DAVOLI R., PORTOLANO B., RUSSO V. (2008): *Analisi dei geni ASIP e MC1R in razze caprine con diversa colorazione del mantello*, Atti del XVIII Congresso Nazionale SIPAOC, Villa Cavenago – Trezzo sull'Adda (MI), 17-20 Settembre 2008, p. 178 (Presentazione orale).

- 5) BERETTI F., PORTOLANO B., RIGGIO V., RUSSO V., DAVOLI R., FONTANESI L. (2008): *Identification of SNPs and copy number variation in goat MC1R and ASIP genes: an association study with coat color in a few Mediterranean breeds*, Book of Abstracts of the 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production (EAAP). Book of Abstracts No. 14 (2008) Vilnius, Lithuania, 24-27 August 2008. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2008. ISBN 978-90-8686-074-6, ISSN 1382-6077, p. 111 (Abstract – Oral Communication).
- 6) BERETTI F., PORTOLANO B., DALL'OLIO S., RIGGIO V., RUSSO V., FONTANESI L. (2009): *Investigation of coat colour affecting genes in several sheep breeds*, «Italian Journal of Animal Science», 8 (Suppl. 2), p. 184.
- 7) D'ALESSANDRO E., SCOTTI E., LIOTTA L., CHIOFALO V., RUSSO V., FONTANESI L. (2009): *Hunting for the grey coat colour determinant in a local pig population: analysis of the KIT gene*, «Italian Journal of Animal Science», 8 (Suppl. 2), p. 198.
- 8) FONTANESI L. (2009): *Genetic authentication and traceability of food products of animal origin: new developments and perspectives*, «Italian Journal of Animal Science», 8 (Suppl. 2), pp. 9-18.
- 9) FONTANESI L., BERETTI F., RIGGIO V., DALL'OLIO S., OCCIDENTE M., INCORONATO C., MARTELLI P.L., CASADIO R., PORTOLANO B., MATASSINO D., RUSSO V. (2010): *A comparative analysis of copy number variation of the sheep and goat genomes*, Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany, 1-6 August 2010.

ALDO DI LUCCIA\*

## Ricerca di “marcatori molecolari” peculiari del tipo genetico e/o della materia prima prodotta e/o dei prodotti derivati\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

La proteolisi primaria nei prodotti lattiero-caseari è studiata per valutare l'esistenza di una relazione tra la “rintracciabilità molecolare” e le caratteristiche di prodotto e/o di processo (Izawa et al., 1997; Gaiaschi et al., 2001; Guinee e Wilkinson, 1992; Mc Sweeney e Fox, 1997; Sousa et al., 2001). Tale relazione è stata rivelata attraverso tecniche elettroforetiche su gel e cromatografia liquida ad alte prestazioni; queste tecniche sono “storicamente” utilizzate per gli studi della proteolisi durante la stagionatura dei formaggi (Izawa et al., 1997; Gaiaschi et al., 2001; Guinee e Wilkinson, 1992; Mc Sweeney e Fox, 1997; Sousa et al., 2001; Veloso et al., 2004).

Il rapporto tra l' $\alpha_{s1}$ -CN e i frammenti da essa generati è stato proposto come marcatore del tempo di stagionatura per il formaggio Gouda (Izawa et al., 1997) mentre il frammento  $\gamma$ 1-CN, generato dalla  $\beta$ -CN, è stato individuato come marcatore del tempo di stagionatura per il Grana Padano (Gaiaschi et al., 2001). Il sistema della proteolisi primaria non è stato finora applicato alla rintracciabilità dei formaggi.

Il presente lavoro si prefigge di allestire un metodo per rintracciare la cagliata e la mozzarella vaccina ottenuta da latte fresco da quella ottenuta da cagliata conservata mediante un approccio proteomico.

\* *Università degli Studi Foggia, Dipartimento di Scienza degli Alimenti*

\*\* *Unità di ricerca Università di Foggia, responsabile scientifico prof. Aldo Di Luccia*

## MATERIALI E METODOLOGIE

La cagliata o la mozzarella (1 grammo) è stata disciolta in 10 ml di UREA 9M. Quindi si è proceduto a una:

- a) centrifugazione a 6000g, a 4 °C per 10', allontanando il grasso affiorante;
- b) diluizione a 4 mg/ml con un tampone TRIS-HCl 62 mM pH 8,6, 8M UREA e l'1% di  $\beta$ -ME;
- c) elettroforesi discontinua a pH alcalino in urea 8M su gel di poliacrilamide;
- d) colorazione, decolorazione e acquisizione dei gel;
- e) elaborazione dei tracciati elettroforetici.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Il lavoro svolto ha permesso di individuare e identificare un marcatore molecolare, derivante dalla proteolisi primaria delle frazioni caseiniche, denominato 'ALMI', capace di differenziare la mozzarella ottenuta da cagliate prodotte da latte fresco da quella ottenuta miscelando latte fresco con cagliate conservate.

La produzione dei formaggi a pasta filata è tipica dell'Italia meridionale ed è documentata sin dall'antichità dai testi di autori latini quali Plinio e Columella citato da Addeo (1996). In questi ultimi anni vi è stata una maggiore "industrializzazione" del processo produttivo, con inevitabili ripercussioni sulla qualità: l'impiego di nuove tecniche, in grado di standardizzare il prodotto e di abbattere i costi di produzione ha determinato un quadro estremamente complesso, caratterizzato dalla presenza di una vasta gamma di tipologie e formati di manufatti caseari, con immancabili prodotti di imitazione, versioni innovative e preparati di fantasia. Di particolare rilievo è, oggi giorno, la produzione industriale di mozzarella a partire non da latte fresco, ma da miscele di latte fresco e semilavorati. Di quest'ultimi ne esistono essenzialmente tre tipi:

- cagliate pressate e refrigerate
- cagliate congelate (di origine locale o estera)
- preparati alimentari "fusi" (nella cui "ricetta" di preparazione possono rientrare cagliate, formaggi, caseinati, concentrati lattoproteici, burro e anche sostanze grasse di origine diversa da quella latte).

Il marcatore 'ALMP' si genera nelle cagliate conservate e si ritrova invariato nelle mozzarelle ottenute dalla miscela di latte fresco e cagliata conservata. La sua formazione è la conseguenza di un'attività enzimatica ed è, pertanto,



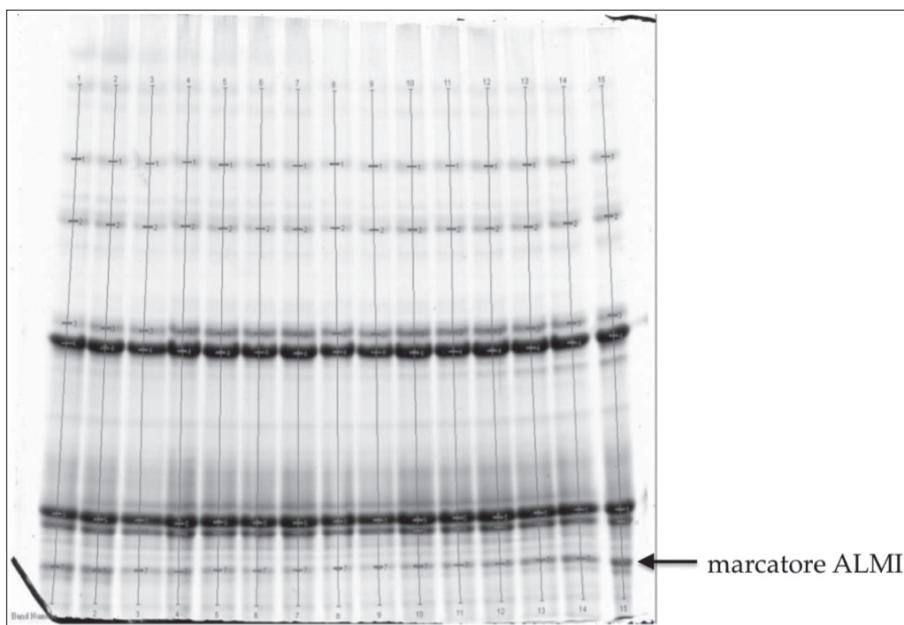


Fig.1

funzione del tempo, della temperatura, della concentrazione dell'enzima, della qualità del latte e del processo di preparazione. Nella “normale” produzione di mozzarella il tempo si riduce a quello della formazione della cagliata, la quale è avviata rapidamente al processo di filatura (vi è solo una breve sosta “tecnologica”, che normalmente copre un intervallo di tempo che va da poche decine di minuti fino a 3÷4 ore). La fase della filatura avviene a una temperatura di circa 90 °C, sufficiente a denaturare e inattivare l'enzima responsabile della formazione del frammento. Pertanto, il marcatore ‘*ALMP*’ è appena percepibile nella mozzarella ottenuta da solo latte. Nella produzione dei semilavorati utilizzati per la manifattura della mozzarella (cagliate refrigerate o congelate), i tempi di produzione si dilatano: soste per il raffreddamento, l'imballaggio, lo stoccaggio, il trasporto. Nel caso delle cagliate congelate vi è anche l'esigenza di scongelare il semilavorato. Tutte queste operazioni (anche se in condizioni di bassa temperatura) favoriscono un'attività idrolitica che serve a liberare il frammento ‘*ALMP*’ che si forma in misura rilevante ed è tanto più abbondante quanto più sono favorevoli le condizioni ambientali per l'attività enzimatica.

Per l'elaborazione dei dati ottenuti dall'analisi densitometrica dei tracciati elettroforetici sono state considerate 7 bande caseiniche. I valori della densità ottica sono stati espressi in “*relative quantity*”. Il marcatore ‘*ALMP*’ si presenta come la

banda numero 7 (fig. 1) e i valori ottenuti dall'analisi densitometrica sono stati elaborati statisticamente, osservando una differenza significativa ( $P < 0,01$ ) tra il valore che il marcatore assume nella mozzarella da cagliata fresca e in quella ottenuta con cagliata importata o comunque conservata. Riportando in grafico i valori dell'intensità delle bande di 'ALMP' in funzione di note quantità crescenti di cagliata importata in miscela con cagliata fresca è stata ottenuta una curva lineare. Ciò ha permesso di stabilire che la soglia minima di rivelazione di 'ALMP' in una mozzarella prodotta con cagliata conservata è del 10% circa.

In conclusione, i dati analitici per ogni tracciato elettroforetico hanno dimostrato che il marcatore 'ALMP' è quasi percettibile nel prodotto ottenuto da cagliata fresca, e aumenta sensibilmente per le cagliate conservate. Inoltre, il marcatore 'ALMP' è stabile per almeno 7 giorni nella mozzarella conservata a 4 °C.

#### BIBLIOGRAFIA

- ADDEO F. (1996): Monografia edita dall'Istituto Sperimentale Lattiero Caseario di Lodi.  
 GAIASCHI ET AL. (2001): «J Dairy Sci», 84, pp. 60-65.  
 GUINEE A.T.M. & WILKINSON M.G.J. (1992): «Soc. Dairy Technol.», 45, pp. 94-104.  
 IZAWA ET AL. (1997): «J. Jpn. Soc. Food Sci.», 44, pp. 871-876.  
 SOUSA M.J.Y. ET AL. (2001): «Int. Dairy J.», 11, pp. 327-345.  
 MC SWEENEY PLH E FOX P.F. (1997): «Lait», 77, pp. 41-76.  
 VELOSO A.C.A. ET AL. (2004): «Food Chemistry», 87, pp. 289-295.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Michele Faccia (Ricercatore)  
 Pasqua Loizzo (Assegnista)  
 Antonio Trani (Assegnista)  
 Agata Bozzi (Contrattista Selmol)

#### BREVETTO

Procedimento per valutare la proteolisi primaria delle frazioni caseiniche del latte e dei suoi derivati, domanda n. MI2009A002206 depositata il 16.12.2009.

Unità operativa cavalli



## Relazione del coordinatore

Durante il periodo di competenza del progetto Selmol, l'UO Cavalli ha concentrato le sue attività di ricerca per il raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- Realizzazione di banche genomiche per razze autoctone (Maremmano, Lipizzano, Bardigiano e Monterufolino)
- Genotipizzazione dei loci A (Agouti) ed E (Estensione) nelle razze campionate
- Caratterizzazione molecolare mediante marcatori molecolari di tali razze
- Caratterizzazione dell'eredità mitocondriale per la differenziazione delle linee femminili e conferma della bontà del libro genealogico
- Studio dell'effetto sulla trascrizione dello stress da esercizio strenuo nel cavallo atleta al fine di individuare, previa una profonda comprensione molecolare, "marcatori di stress fisico" utilizzabili per programmare allenamenti mirati che possano preservare il benessere animale e per una possibile selezione dei soggetti maggiormente adatti alle competizioni.
- Studio del polimorfismo del TNF-alfa (Tumour Necrosis Factor-alpha) e dell'IL-6 (interleukin-6) nelle razze Lipizzano, TPR, Trottatore italiano, Purosangue, Maremmano, Arabo e Catria.
- Correlazione tra citochine e concentrazione di alcuni metalli in cavalli sottoposti a stress da esercizio.

I risultati ottenuti hanno permesso di ottenere una solida base di conoscenza su vari aspetti della genomica e genomica funzionale del cavallo.

\* *Università degli Studi di Perugia, Centro di Studio del Cavallo Sportivo*

Per gli aspetti genomici ora sono disponibili informazioni sulla diversità genetica delle razze autoctone, utilizzabili ai fini della conservazione degli standard di razza (mitocondriale, marcatori molecolari) e della pianificazione degli accoppiamenti (mantelli).

Per la genomica funzionale sono ora definite classi di geni coinvolte nell'esercizio strenuo e influenzabili dalle tipologie e intensità dell'allenamento.

L'individuazione dei range di riferimento plasmatico/sierico per alcuni metalli e la loro relazione con il polimorfismo di alcune citochine infiammatorie avrà ricadute pratiche per le Associazioni di razza.

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

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Crescente è l'interesse per i diversi aspetti di genomica strutturale e funzionale del cavallo. Per la genomica strutturale sono stati testati cavalli di razza Maremmano, Lipizzano, Bardigiano e Monterufolino ai loci Estensione e Agouti, geni legati al colore dei mantelli di base (morello, baio, sauro), ed è stata analizzata la parte ipervariabile (D-loop) del mtDNA. Le informazioni acquisite sono utilizzabili nei programmi di selezione per ottenere con certezza il mantello voluto e differenziare le linee femminili. Per la genomica funzionale si è affrontato lo studio dell'espressione di geni coinvolti nella fisiologia dell'esercizio strenuo nel cavallo atleta per individuare "marcatori di stress fisico" utilizzabili per programmare allenamenti mirati che possano preservare il benessere animale ed evitare il fenomeno dell'overtraining. Avere a disposizione tali "marcatori" negli schemi di miglioramento, insieme ad adeguate pratiche di allenamento potrà in futuro portare a una migliore prestazione agonistica, a una più lunga attività sportiva e soprattutto a una maggior attenzione al benessere e alla salute dell'animale. È questo l'obiettivo del cavallo atleta che lo differenzia dalle altre specie zootecniche e da reddito.

### MATERIALI E METODOLOGIE

- Estrazione di DNA e RNA tramite kit commerciali;
- Analisi qualitativa e quantitativa degli estratti tramite spettrofotometro,

\* *Università degli Studi di Perugia, Centro di Studio del Cavallo Sportivo*

\*\* *Unità di ricerca Università di Perugia, responsabile scientifico prof. Maurizio Silvestrelli*

- fluorimetro, bioanalyzer e corsa elettroforetica;
- PCR, PCR-RFLP per genotipizzare il locus Agouti ed Estensione in Maremmani, Bardigiani, Lipizzani e Monterufolini;
  - AFLP: usando 6 coppie di primers sono stati analizzati 140 Lipizzani;
  - con 30 SSR sono stati analizzati 50 Maremmani e 49 Lipizzani;
  - PCR, sequenziamento: analisi del mtDNA (D-loop) in 147 Lipizzani e 80 Maremmani;
  - RT-qPCR, cDNA-microarray, sequenziamento, cDNA-AFLP: usando RNA derivante da PBMCs si è analizzata l'espressione genica in 10 cavalli da endurance mediante cDNA-microarray. Per alcuni di questi geni mediante RT-qPCR è stato valutato il valore basale di soggetti atleti (10 per l'endurance e 9 per il galoppo) e di soggetti sedentari (9 cavalli). Mediante cDNA-AFLP e RT-qPCR (6 cavalli da endurance) si sono identificati, isolati e sequenziati frammenti di trascritti indotti o repressi dall'esercizio.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

Sono state realizzate banche genomiche per le razze Maremmano, Lipizzano, Monterufolino e Bardigiano e i soggetti genotipizzati ai loci A ed E che determinano il colore di base del mantello (morello, baio e sauro) per aumentare i fenotipi desiderati. Nella razza Maremmana il mantello sauro è indesiderato e determina l'esclusione del soggetto maschio dal Libro Genealogico (L.G.) mentre il mantello morello è fortemente desiderato. Per il Bardigiano e il Monterufolino l'interesse è sovrapponibile a quello del Maremmano. Per il Lipizzano è stata analizzata in particolare la frequenza dell'omozigote recessivo per il locus A, recentemente associato al melanoma in presenza di mantello grigio. Lo studio del mtDNA è stato effettuato nella razza Maremmana e nel nucleo italiano della razza Lipizzana. Con questo marcatore nel Lipizzano sono stati identificati 10 aplotipi e nella razza Maremmana si è evidenziata una notevole diversità mitocondriale. Per quest'ultimo l'analisi del mtDNA è importante per la differenziazione delle linee femminili e di conseguenza per le possibili diverse attitudini. Infatti, oltre alla caratterizzazione della popolazione in termini di variabilità, attualmente si sta cercando di associare mutazioni mitocondriali alle performance sportive. Per le razze Maremmano e Lipizzano, inoltre, sono stati realizzati studi dei polimorfismi con marcatori SSR e AFLP per la tipizzazione delle stesse ed eventuale uso nei programmi di miglioramento genetico. La variabilità genetica esistente attualmente nella razza Maremmana è stata paragonata, con marcatori SSR, a quella di altre 14



razze (Arabo, Hannover, Exmoor Pony, Islandese, Przewalski, Sorraia, Black Forest, Mecklenburg, Rhenish German Draught, Saxon Thuringa, Schleswig Draught, South German, Lusitano e Lipizzano). Per questo studio sono stati utilizzati 30 marcatori SSR su un totale di 549 cavalli. L'analisi dei dati molecolari ha mostrato che nel Maremmano esiste una alta variabilità genetica e che questa razza è correlata, dal punto di vista filogenetico, all'Hannover e al Lusitano. La variabilità genetica esistente nel nucleo Italiano della razza Lipizzana è stata valutata sia con marcatori AFLP che SSR. Nel contesto di conservazione della razza, la caratterizzazione genetica è il primo passo per evitare la perdita di variabilità genetica e in particolar modo di alleli rari.

Per la genomica funzionale, per avere un quadro più completo possibile del fenomeno precedentemente descritto, sono state utilizzate tecniche d'indagine molecolare che hanno portato all'individuazione di geni altamente modulati e di sequenze genomiche potenzialmente regolatorie. Tali dati sono stati sottoposti a una caratterizzazione bioinformatica e i più interessanti validati con tecniche quantitative. La prima tecnologia applicata è stata quella dei cDNA-microarray utilizzando RNA derivante da PBMCs di 10 cavalli da endurance "top performance" secondo il seguente disegno sperimentale time course: prelievo basale (a riposo prima della gara), gara (immediatamente dopo lo sforzo), 24h (da distanza di 24 ore dalla fine della gara). Una volta ottenute le liste di geni significativamente modulati in almeno una delle condizioni rispetto al campione basale, sono state effettuate delle analisi bioinformatiche con vari software (Ingenuity, Blast2GO, Cytoscape) volte all'interpretazione biologica dei risultati stessi. Tutti e tre gli strumenti informatici individuano categorie funzionali comuni più rappresentate quali risposta allo stress, risposta immunitaria e risposta infiammatoria; attraverso il software Ingenuity i geni maggiormente modulati sono stati raggruppati in tre network principali: Network #1 *Cell Death, Cellular Development, and Hematological System Development and Function*; Network #2 *Inflammatory Response, Inflammatory Disease, and Antigen Presentation*; and Network #3 *Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signalling and Interaction, and Free Radical Scavenging*. Sempre lo stesso strumento ha prodotto una lista di top-molecules per le quali è stato effettuato un saggio real-time (IL1R2, MMP1, MMP13, IL18, STON2, CEBPB, CXCL2, FST, IL8, SOCS3, IL1 $\beta$ , CCL3, TLR4, GLUL, UBE2J2, CCR2, LCK, BAG3, FCER1A, MAP3K1, STAT4, CCL5, ELK4, IFNAR1, COX7A2L).

Per alcuni di questi geni, in particolare per le interleuchine, è stato anche valutato il valore basale di soggetti atleti per la specialità dell'endurance, del galoppo (PSI) e soggetti sedentari individuando un effetto che l'allenamento potrebbe avere sulla trascrizione basale di tali geni marker.

Contestualmente a questo esperimento, applicando la tecnica cDNA-AFLP allo stesso disegno sperimentale, è stato possibile individuare, isolare e sequenziare TDF (Transcript Derived Fragments, frammenti di trascritti) di varia natura indotti o repressi dall'esercizio. Sottoponendo tale dataset ad accurate analisi bioinformatiche il 20% delle sequenze è risultato corrispondere a LINE/L1 (Long Interspersed Nuclear Element L1). Tale percentuale è particolarmente elevata se confrontata con il livello medio di trascrizione di sequenze riconducibili a LINE nelle EST di cavallo (2%). Nel regno vegetale e ultimamente anche in campo medico è stato dimostrato il coinvolgimento dei retro-trasposoni in fenomeni riconducibili a "stress genotossico". Per confermare tale modulazione di queste sequenze si è allestito un saggio RT-qPCR utilizzando chimica SyberGreen. I risultati confermano in larga parte l'espressione differenziale dei trascritti e portano a ipotizzare che gli elementi retrotrasponibili, a causa dei meccanismi di "interferenza" dei quali sono capaci, potrebbero essere coinvolti nella regolazione dell'espressione genica indotta da esercizio.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABERLE K.S. ET AL. (2004): «Animal Genetics», 35, pp. 270-7.  
 GLEESON M. (2007): «J Appl Physiol», 103, pp. 693-699.  
 JANSEN T. ET AL. (2002): «Proc Natl Acad Sci USA», 99, 10905-10910.  
 RIEDER S. ET AL. (2001): «Mamm Genome», 12, pp. 450-455.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Andrea Verini Supplizi (Professore associato)  
 Camillo Pieramati (Professore associato)  
 Katia Cappelli (Ricercatore)  
 Daniela Casciotti (Tecnico EP3)  
 Alunni Gianluca (Tecnico C3)  
 Anna Maria Cerboni (Amministrativo D3)  
 Cristina Tamantini (Assegnista)

#### PRODOTTI

- Banca dati genomica.

# TRASFERIMENTO

Identificazione genetica del colore del mantello dei riproduttori per programmazione accoppiamenti.

Identificazione genetica delle linee femminili.

# PUBBLICAZIONI

- 1) CAPOMACCIO S., VERINI SUPPLIZI A., GALLA G., VITULO N., BARCACCIA G., FELICETTI M., SILVESTRELLI M., CAPPELLI K.: *Transcription of LINE-derived sequences in exercise-induced stress in horses*, «Animal Genetics», Pubblicato, in attesa di edizione nella rivista.
- 2) FELICETTI M., LOPES M., VERINI SUPPLIZI A., DA CÂMARA MACHADO A., SILVESTRELLI M., MENDONÇA D., DISTL O.: *Genetic diversity in the Maremmano horse and its relationship with other European horse breeds*, «Animal Genetics», Pubblicato, in attesa di edizione nella rivista.
- 3) CAPOMACCIO S., CAPPELLI K., BARREY E., FELICETTI M., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A.: *Microarray analysis after strenuous exercise in peripheral blood mononuclear cells of endurance horses*, «Animal Genetics», In revisione.
- 4) CAPOMACCIO S., PIERAMATI C., FELICETTI M., GIONTELLA A., DISTL O., SILVESTRELLI M., CAPPELLI K., CASTRO V., VERINI SUPPLIZI A. (2010): *Evaluation Of Genetic Relationship With Equine SNP50 Chip In Maremmano Breed*, Plant & Animal Genomes XVIII Conference, Abstracts. San Diego, 9-13 gennaio 2010.
- 5) CAPOMACCIO S., VERINI SUPPLIZI A., GALLA G., VITULO N., BARCACCIA G., FELICETTI M., SILVESTRELLI M., CAPPELLI K. (2010): *Transcription Of LINE-Derived Sequences In Exercise-Induced Stress In Horses*, Plant & Animal Genomes XVIII Conference, Abstracts, 9-13 gennaio 2010.
- 6) CAPPELLI K., CAPOMACCIO S., BARREY E., FELICETTI M., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A. (2010): *Microarray Analysis Of Strenuous Exercise In Endurance Horse PBMCs*, Plant & Animal Genomes XVIII Conference, Abstracts. San Diego, CA, 9-13 gennaio 2010.
- 7) CAPPELLI K., FELICETTI M., CAPOMACCIO S., PIERAMATI C., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A. (2009): *Exercise-induced up-regulation of MMP-1 and IL-8 genes in endurance horses*, «Bmc Physiology», vol. 9, 12, ISSN: 1472-6793, doi: 10.1186/1472-6793-9-12.
- 8) CAPPELLI K., CAPOMACCIO S., BARREY E., FELICETTI M., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A. (2009): *Exercise influence on gene-expression profile in endurance horse PBMC*, xviii congresso nazionale A.S.P.A. Palermo, 9-12 giugno 2009.
- 9) FELICETTI M., DISTL O., LAMPE V., EHRHARDT S., CAPPELLI K., CAPOMACCIO S., PIERAMATI C., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A. (2009): *Genetic diversity and relationships among Maremmano horses and European horse breeds*, xviii congresso nazionale A.S.P.A. Palermo, 9-12 giugno 2009.
- 10) CAPOMACCIO S., CAPPELLI K., BARREY E., FELICETTI M., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A. (2009): *Effect of strenuous exercise on gene-expression in endurance horse PBMC*, 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 24-27 agosto, Barcellona, Spain.

- 11) CAPPELLI K., CAPOMACCIO S., GALLA G., BARCACCIA G., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A. (2009): *Gene expression and ontological analyses reveal a key role of LINEs in endurance horse race-induced stress conditions*, 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 24-27 agosto, Barcellona, Spain.
- 12) CAPOMACCIO S., CAPPELLI K., FELICETTI M., SPINSANTI G., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A. (2008): *Selection of the most stable reference genes for quantitative RT-PCR normalization in exercised endurance race horses PBMC's*, x Congresso Nazionale Biotecnologie, Perugia, 17-19 settembre.
- 13) CAPPELLI K., FELICETTI M., CAPOMACCIO S., CHIARADIA E., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A. (2008): *Exercised- induced stress: expression profiling of MMP-1 and IL-8 in endurance race horses PBMC's*, x Congresso Nazionale Biotecnologie, 17-19 Perugia, settembre
- 14) CAPPELLI K., FELICETTI M., CAPOMACCIO S., SILVESTRELLI M., VERINI SUPPLIZI A. (2008): *Strenuous exercise in athlete horses: qRT-PCR optimization and stress related genes expression profiling*, 52<sup>th</sup> Annual Congress Italian Society of Agricultural Genetics, Padova, 14-17 settembre.

CARLO RENIERI\*

## Studio di alcuni meccanismi genetici dello stress da esercizio nel cavallo sportivo\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Lo stress, in particolare da esercizio, induce nell'organismo alcune modificazioni che vanno dalla modulazione della risposta neuro-endocrina fino a quella metabolica e del sistema immunitario (compresa quella infiammatoria) (Pedersen et al., 2000). Sebbene ciò sia noto, altrettanto non si può dire circa i meccanismi molecolari che stanno alla base di queste modificazioni. È noto che le citochine svolgono un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria e, sebbene sia ormai stato dimostrato che anche lo stress da esercizio risulta in grado di indurre incrementi dei livelli di molte citochine (sia pro-infiammatorie che antinfiammatorie) (Ostrowski et al., 1998a; 1998b), le teorie sul meccanismo con il quale l'esercizio riesca a fare ciò non sono univoche. Si è cercato quindi di approfondire le conoscenze sulle relazioni tra adattamento fisiologico allo sforzo e la componente genetica del cavallo, con particolare attenzione alle caratteristiche genotipiche (SNPs) di alcune citochine coinvolte nella risposta infiammatoria e stress ossidativo.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Sono stati effettuati 141 prelievi da 25 Lipizzani, 18 TPR, 20 Trottatori italiani, 21 Purosangue, 21 Maremmani, 20 Arabi e 16 Catria a riposo più 12 cavalli da endurance in gara a vari intervalli: Km 0 (T1), Km 30 (T2) e Km 90 (T3).

Su tutti i soggetti sono stati determinati i seguenti parametri: attività di

\* *Università degli Studi di Camerino, Scuola di Scienze Ambientali*

\*\* *Unità di ricerca Università di Camerino, responsabile scientifico prof. Carlo Renieri*

glutatione perossidasi (kit Ransel e analizzatore automatico Hitachi 704); concentrazione emoglobinica (contaglobuli Haemat 8, SEAC); concentrazione di IL-6 e TNF-alfa (metodica ELISA) e concentrazioni sieriche di Zn, Mn, Se, Fe e Cu determinate con ICP-MS. Dai soggetti è stato estratto DNA per la genotipizzazione dei polimorfismi nei geni IL-6 e TNF-alfa. I soli campioni prelevati da i cavalli in gara, infine, sono stati impiegati per alcuni test di risposta immunitaria e stress ossidativo quali: test di proliferazione linfocitaria (con timidina), apoptosi, potere antiossidante sierico totale (PAO) e metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM's).

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

I campioni di DNA provenienti dalle diverse razze di cavalli, indagati nella regione prossima al gene dell'IL-6, hanno permesso l'individuazione di un nuovo polimorfismo SNP (posizione 54427182 sul cromosoma 4; I.D: BIEC2-911738); mentre per gli altri due SNPs presenti nella zona del promotore del gene del TNF-alfa ai locus 137 e 147 ne è stata confermata la presenza, essendo già stati precedentemente identificati.

Nonostante la numerosità dei cavalli campionati per razza sia un po' esigua, è stata valutata la distribuzione genotipica e allelica di questi SNPs che è risultata significativamente differente all'interno delle varie razze per gli SNP 137 e 147 del gene TNF-alfa, ma non per il polimorfismo della regione vicino al gene dell'IL-6, dove la frequenza dell'allele T è risultata essere molto rara (non si osservano omozigoti TT) e assente nelle razze Catria e Lipizzano.

Per lo SNP 137 nel gene TNF-alfa si è evidenziato che la frequenza dell'allele T è maggiore nelle razze Purosangue e Araba e più bassa nella razza Trotatore italiano (0,45 e 0,55 % vs 0,1%;  $P < 0,0002$ ). Riguardo il secondo SNP, locus 147 del gene TNF-alfa, si è osservato che la frequenza dell'allele T è risultata maggiore nelle razze Lipizzano e TPR; mentre l'allele T non è stato riscontrato nei cavalli da trotto.

Contestualmente alla valutazione dei polimorfismi delle citochine, si è indagata la loro eventuale capacità di modulare la concentrazione di alcuni metalli in traccia a livello plasmatico (Yur et al., 2008), nonché le concentrazioni delle citochine proinfiammatorie stesse (IL-6 e TNF-alfa), sia in funzione del genotipo che dell'allele. Per il polimorfismo presente in prossimità del gene della IL-6 si è osservato un significativo aumento del rapporto Cu/Zn nel genotipo AT, ma nessuna differenza per gli altri parametri. Nell'intero campione analizzato per il polimorfismo 147 del gene TNF-alfa è stato trova-

to, invece, un aumento della concentrazione di rame e ridotti livelli di Se nei portatori dell'allele T rispetto a quelli con l'allele C. Questo risultato suggerisce per i portatori dell'allele T una maggior suscettibilità allo stress ossidativo.

Suddividendo per le varie tipologie di razza, risultati più rilevanti sono stati osservati nei cavalli Lipizzano per il polimorfismo del TNF-alfa locus 137. In particolare il genotipo CT ha mostrato livelli plasmatici più elevati di Fe e ridotti di selenio ( $p < 0.05$ ); mentre lo zinco tendeva a diminuire rispetto agli omozigoti CC. Poiché il ferro ha un'azione pro-ossidante, mentre il Se è un importante cofattore dell'enzima glutatione perossidasi (Gpx), questi dati suggeriscono che il genotipo CT potrebbe essere più a rischio di stress ossidativo. Nessuna modulazione in funzione degli SNPs indagati è stata osservata nella produzione delle citochine TNF-alfa e IL-6 nelle diverse razze di cavalli prelevati a riposo anche se, a nostro avviso, questo dato andrebbe ulteriormente saggiato in un campione più ampio.

In ultimo è stato valutato l'effetto dei polimorfismi sui parametri biochimici nei cavalli da corsa nei diversi tempi di gara. Risultati significativi sono stati riscontrati per il polimorfismo del gene TNF-alfa locus 137.

A tempo zero, i portatori dell'allele C presentavano livelli più alti di rame rispetto ai portatori dell'allele T. Al 60° km di gara, i cavalli portatori dell'allele C mostravano livelli plasmatici di magnesio e zinco più bassi e un più alto rapporto Cu/Zn che, nell'uomo, è indice di maggior rischio di mortalità soprattutto per malattie cardiovascolari, mentre nel cavallo è stato associato a fibrillazione atriale. Al 100° km di gara, i cavalli portatori dell'allele C continuavano ad avere un rapporto Cu/Zn più elevato, nonché livelli di rame e IL-6 plasmatici più elevati rispetto ai cavalli con allele T, mentre non sono state osservate differenze significative per gli altri metalli.

Poiché è già stato osservato che quando il rapporto Cu/Zn aumenta durante l'esercizio fisico intenso questo si associa a un rapporto ossidanti/antiossidanti fortemente sbilanciato, i risultati del nostro studio sembrerebbero poter fornire indicazioni utili per un'individuazione precoce dei soggetti sportivi (cavalli) più suscettibili allo stress ossidativo ancor prima che questi partecipino a una competizione. Nel nostro studio, infatti, i cavalli in gara portatori dell'allele C sono risultati i più predisposti a un innalzamento del rapporto Cu/Zn e dei livelli di IL-6, a fronte di livelli di zinco e magnesio più ridotti già a tempo zero. Se da un lato questi soggetti, rispetto ai portatori dell'allele T, potrebbero trarre indubbio beneficio da un'integrazione con antiossidanti pre-gara; dall'altro, l'aver individuato alcuni SNPs nel gene del TNF-alfa e a valle del gene dell'IL-6 in grado di modulare alcuni microelementi importanti tanto nella risposta infiammatoria che nello stress ossidativo, apre nuove interessanti e promettenti prospettive alla ricerca della genomica funzionale per la selezione del cavallo sportivo (Asano et al., 2006).

Per quanto riguarda le concentrazioni plasmatiche dei metalli indagati in questo studio (Mn, Fe, Se, Cu, Zn e Cu/Zn), inoltre, bisogna sottolineare che non essendo riusciti a trovare in bibliografia intervalli di riferimento per questa specie calcolati con metodiche confrontabili a quella applicata in questo lavoro; gli stessi sono stati ricavati dai dati qui prodotti e, con sorpresa, è stato anche osservato che tra le diverse razze qui indagate, esistono differenze fortemente significative per tutti i metalli saggiati ( $P < 0,001$ ). I risultati relativi alla valutazione delle risposte immunitarie nei soggetti in gara hanno, infine, permesso di osservare un progressivo decremento della risposta al test di proliferazione linfocitaria con il progredire della gara; mentre l'indice di apoptosi mostrava un trend inverso.

#### BIBLIOGRAFIA

- ASANO K. ET AL. (2006): «J Vet Med Sci.», 68 (7), pp. 769-71.  
 OSTROWSKI K. ET AL. (1998a): «J. of Physiol.», 513, pp. 889-894.  
 OSTROWSKI K. ET AL. (1998b): «J. of Physiol.», 508, pp. 287-291.  
 PEDERSEN B.K. ET AL. (2000): «Immun. and Cell Biol.», 78, pp. 532-535.  
 YUR ET AL. (2008): «Biol. Trace Elem. Res.», 125, 3, pp. 223-8.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Daniela Beghelli (Ricercatore)

#### PRODOTTI

- messa a punto di una metodica ELISA per la determinazione di IL-6 nel cavallo.
- validazione di uno SNP vicino alla regione del gene dell'IL-6.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) BEGHELLI D., MALAVOLTA M., PIACENZA F., VERINI SUPPLIZI A., RENIERI C., CAVALLUCCI C., MOCCHEGIANI E. (2010): *Minerals in horses: influence of breed and exercise*, Atti XVI Congresso Sive International Congress, Marina di Carrara, Carrara Fiere, January 29th-31st, pp. 286-287.
- 2) BEGHELLI D., GIACCONI R., MOCCHEGIANI E., CIPRIANO C., MALAVOLTA M., CAPPELLI K., RENIERI C.: *Genetic variant near horse IL-6 gene region is associated with increased copper/zinc ratio*, Inviato a «The Veterinari Journal»: in corso di valutazione.



Unità operativa riproduzione stress e malattie



## Relazione del coordinatore

Sono stati adottati due approcci per identificare i fattori genetici che influenzano i caratteri produttivi. Il primo consiste nello studio di geni candidati identificati in base al loro potenziale ruolo fisiologico sui caratteri, il secondo consiste nello sfruttare le recenti conoscenze del genoma bovino per realizzare analisi di associazione genome-wide. Sono state identificate interessanti associazioni genetiche che possono essere approfondite ed eventualmente usate per migliorare i programmi di selezione per allevare animali più sani, più fertili e più produttivi.

Per quanto riguarda la mastite, è stato identificato un gene candidato, il PTX3 (Pentrassina 3 coinvolta nella variazione delle SCC) da uno studio sperimentale nelle capre e poi testato nei bovini. Un'analisi di associazione genome-wide utilizzando i *breeding value* di SCC ha identificato SNP candidati su BTA14 e BTA6.

L'approccio basato sui geni candidati ha identificato delle mutazioni in IL-27 specificamente associate con l'incidenza della ParaTB nella razza Jersey. Un'analisi di associazione genome-wide ha identificato quattro regioni cromosomiche su BTA8, 9, 11 e 12, fortemente associate con la malattia.

Per quanto riguarda le MTZ negli ovini, studi su razze autoctone e cosmopolite hanno dimostrato che le razze selezionate nelle aree dove c'è l'esposizione a queste malattie sono più resistenti e una parte di tale resistenza può essere controllata dal genotipo dell'emoglobina. Uno studio di shock termico ha evidenziato che *HsP 70.1* è associata a una migliore tolleranza allo stress da calore.

\* Consorzio di Ricerca e Sperimentazione degli Allevatori

Un'analisi di associazione genome-wide usando gli indici di fertilità, ha identificato due regioni cromosomiche, su BTA6 e BTA28 significativamente associate con le variazioni di fertilità.

Questi dati possono essere usati come base per sviluppare le strategie di selezione per migliorare i caratteri relativi a stress, malattie e fertilità nelle specie da allevamento.

NICOLA LACETERA\*

# Individuazione di eventuali associazioni tra SNPs presenti sui geni Toll Like Recepters 9 (TLR9) e TLR4 e alcuni parametri immunologici o di resistenza alle malattie in bovine di razza Frisona\*\*

## STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Studi precedenti hanno indicato l'esistenza di single nucleotide polymorphisms (SNPs) in geni coinvolti nella risposta immunitaria nella specie bovina (White et al., 2003; Cargill and Womack, 2007).

L'obiettivo del progetto è stato rappresentato dall'individuazione di eventuali associazioni tra gli SNPs presenti sui geni Toll Like Recepters 9 (TLR9) e Toll Like Recepters 4 (TLR4) e alcuni parametri immunologici o di resistenza alle malattie in bovine di razza Frisona.

## MATERIALI E METODOLOGIE

La ricerca ha previsto l'esecuzione di due studi.

### *Studio 1*

Animali: 61 vitelle di sei mesi di età.

Trattamento: vaccinazione nei confronti di Bovis Herpes Virus 1 (BHV-1).

Determinazioni analitiche: dosaggio serico IgG anti BHV-1 (-30, 0, +14, +21, +28, e +42 giorni dalla vaccinazione); test di proliferazione linfocitaria (-30 e 0 giorni dalla vaccinazione); estrazione DNA genomico da sangue intero; genotipizzazione (ricerca di 9 SNPs, Kbioscience).

\* Università di Viterbo, Dipartimento di Produzioni Animali

\*\* Unità di ricerca Università di Viterbo, responsabile scientifico prof. Nicola Lacetera

*Studio 2*

Animali: 31 vacche peripartorienti.

Determinazioni analitiche: test di proliferazione linfocitaria (settimanali da -21 a +35 giorni dal parto); estrazione DNA genomico da sangue intero; genotipizzazione (ricerca di due SNPs, Kbioscience).

L'elaborazione dei dati di genotipizzazione è stata effettuata tramite i programmi PHASE 2.1 e GENEPOP 3.4. Il confronto tra i valori dei parametri immunologici è stato effettuato tramite ANOVA.

In entrambi gli studi è stato eseguito il monitoraggio dello stato sanitario degli animali.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

*Studio 1*

La popolazione oggetto di studio è stata caratterizzata dalla presenza di 8 dei 9 SNPs attesi sul TLR9: lo SNP 723 T>C non è stato osservato. La popolazione è risultata essere in equilibrio di Hardy-Weinberg per gli SNPs esaminati.

Lo studio di associazione è stato effettuato considerando solo lo SNP TLR9 -478 A>G presente sul promotore. L'analisi delle frequenze alleliche osservate ha evidenziato una frequenza dell'allele A del 59% e del G del 41%. I tre aplotipi identificati sono risultati così distribuiti: genotipo P1 (n=34, AG), P2 (n=19; AA) e P3 (n=8; GG). Sulla base di quanto riportato da Begley et al. (2009), ciascuna vitella è stata categorizzata sulla base della propria capacità di risposta alla vaccinazione in termini di produzione di titoli anticorpali. In particolare, i soggetti sono stati categorizzati in *high responders* (H, n=8), *medium responders* (M, n=45) e *low responders* (L, n=8). La risposta delle PBMC ai mitogeni è risultata coerente con i valori dei titoli anticorpali nel senso che gli animali con titoli più elevati hanno pure mostrato una migliore risposta ai mitogeni in termini proliferativi. Nessuna associazione significativa è stata rilevata tra gli aplotipi e le categorie H, M o L. Tuttavia, le vitelle con aplotipo P3, l'aplotipo meno rappresentato nella popolazione, non hanno nessun animale appartenente alla categoria H ma hanno la maggior frequenza di soggetti L (25%). Diversamente, l'aplotipo P2 vanta la maggior frequenza di soggetti H (21,05%) e la più bassa di L (5,26%). Inoltre, l'aplotipo P3 ha mostrato valori medi dei parametri immunologici significativamente più bassi rispetto all'aplotipo P2 ( $P < 0.005$ ). L'aplotipo P3 sembra essere svantaggioso in termini di risposta immunitaria, è caratterizzato dalla presenza della variante allelica in omozigosi ed è anche il meno rappresentato

nella popolazione. Queste osservazioni suggeriscono che la diversa capacità di ciascun animale di rispondere alla vaccinazione può dipendere in qualche misura dalla variabilità del gene TLR9 e autorizzano ad auspicare la prosecuzione delle attività allo scopo di aumentare la numerosità del campione.

### *Studio 2*

La popolazione è risultata in equilibrio di Hardy-Weinberg per i due SNPs esaminati. L'analisi delle frequenze alleliche osservate per lo SNP TLR4 -226 C>G (presente sul promotore) ha evidenziato una frequenza dell'allele C del 65% e dell'allele G del 35%. I genotipi identificati sono risultati così distribuiti: P1 (CC, 38.7%), P2 (CG, 51.6%) e P3 (GG, 9.7%). L'analisi delle frequenze alleliche osservate per lo SNP TLR4 2021 C>T (SNP non-sinonimo, presente sull'esone 3) ha evidenziato una frequenza dell'allele C del 87% e dell'allele T del 13%. I genotipi sono risultati così distribuiti: E1 (CC, 74.2%), E2 (CT, 25.8%), E3 (TT, 0%).

L'analisi effettuata considerando i due SNPs insieme ci ha permesso di osservare i seguenti aplotipi: PE1 (CC; 64%); PE1 (GC; 22.5%) e PE3 (GT; 12.3%). È stato osservato anche un altro aplotipo con frequenza molto bassa (CT; 1.2%) che è stato escluso da qualsiasi altra valutazione.

Dal monitoraggio dello stato sanitario è emerso che durante il periodo considerato otto bovine sono state affette da mastite, metrite, o da dermatite interdigitale cliniche.

Limitandosi a riportare i risultati di maggiore interesse, lo studio di associazione ha rivelato che le vacche con variazione allelica per uno o per entrambi gli SNPs, hanno mostrato maggiore resistenza alle infezioni. In dettaglio, considerando lo SNP presente sul promotore, nessuna delle vacche con genotipo P3 (n=3) ha contratto infezioni clinicamente apprezzabili. Prendendo in esame lo SNP presente sull'esone, è interessante notare che le bovine con genotipo E2 (n=8) non hanno contratto nessuna delle infezioni sopra menzionate. Infine, valutando i due SNP insieme, le vacche con aplotipo PE3 (n=6) sono risultate non interessate da nessuna delle suddette infezioni. Pertanto, sebbene nessuna associazione statisticamente significativa sia stata rilevata tra aplotipi e resistenza a malattie, i risultati indicano comunque che gli animali caratterizzati da varianti alleliche sul promotore e/o sull'esone 3 non hanno contratto infezioni.

Relativamente ai risultati dei test di proliferazione linfocitaria in risposta al lipopolisaccaride, le 31 bovine sono state categorizzate in *high* (H, 7), *medium* (M, 19) e *low responders* (L, 5). A tale riguardo, va rilevato che nel periodo di osservazione nessuna delle bovine H ha contratto infezioni clini-

che, mentre la maggior parte (5/8) delle malate è risultata appartenente alla categoria L. Seppure nessuna associazione statisticamente significativa sia stata rilevata tra aplotipi e categorie H, M o L, tuttavia va segnalato che nessuna delle vacche che ha mostrato le variazioni alleliche sopra descritte (genotipi P3 ed E2, e aplotipo PE3) e che non ha contratto infezioni risulta appartenente alla categoria L.

#### BIBLIOGRAFIA

- BEGLEY ET AL. (2009): *Differences in udder health and immune response traits of Holstein-Friesians, Norwegian Reds, and their crosses in second lactation*, «J. Dairy Sci.», 92, pp. 749-57.
- CARGILL AND WOMACK (2007): *Detection of polymorphisms in bovine toll-like receptors 3, 7, 8, and 9*, «Genomics», 89, pp. 745-755.
- WHITE ET AL. (2003): *Comparative fine maps of bovine toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 regions Mamm*, «Genome», 14, pp. 149-55.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Elisabetta Catalani (Assegnista)  
 Kuzminsky Giorgia (Tecnico)  
 Alfieri Lavinia (Collaboratore Sanitario Professionale)  
 Olga Lai (Veterinario)  
 Antonino Barone (Veterinario)  
 Maria Teresa Scicluna (Veterinario)  
 Gianluca Autorino (Veterinario)  
 Andrea Caprioli (Veterinario)

#### PUBBLICAZIONI

- 1) ALFIERI L., CATALANI E., LAI O., BARONE A. AND LACETERA N. (2009): *Concurrent vaccination against bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus does not cause perturbation of immune function in Holstein dairy calves*, 3<sup>rd</sup> European Veterinary Immunology Workshop, 70.
- 2) CATALANI E., BARONE A., SCICLUNA M.T., AUTORINO G., CAPRIOLI A., LACETERA N., NARDONE A. (2010): *Preliminary association analysis of TLR9 gene polymorphisms and immune parameters in an Italian Holstein cows population*, «BioMed Central journals», in press.



JOHN WILLIAMS\*

## Sequenziamento di geni candidati con effetto sulla suscettibilità a paraTB su animali sani e malati\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

La paratubercolosi (paraTB), sostenuta da *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP), è un'infezione cronica dell'intestino dei ruminanti e rappresenta una delle malattie infettive più rilevanti per diffusione (stimata tra il 20% e il 40% degli allevamenti) e per danni economici, nonché una probabile zoonosi. Dati recenti hanno associato polimorfismi in geni quali *tlr*, *SLC11A1*, *card15/nod2*, *IL10R* con l'incidenza della paraTB, ma nel complesso le basi genetiche della suscettibilità e i fattori che influiscono sull'andamento della patologia rimangono poco noti.

Il presente lavoro ha come scopo selezionare e sequenziare geni aventi effetto sulla suscettibilità a paraTB su animali sani e malati. Tali geni sono stati scelti mediante un approccio "geni candidati" sulla base del loro coinvolgimento nei *pathways* di controllo della malattia e nella risposta immunitaria. Regioni selezionate di questi geni sono state sequenziate per definire gli SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

### MATERIALE E METODOLOGIE

In collaborazione con IZSLER Lodi è stato creato un *biorepository* di 4048 campioni, 1509 siero-positivi al test ELISA per paraTB e 2539 negativi.

\* Consorzio di Ricerca e Sperimentazione degli Allevatori

\*\* Unità di ricerca CRSA, responsabile scientifico dott. John Williams

Una lista di circa 250 geni relativi alla funzione immunitaria è stata compilata e utilizzata come base di partenza per selezionare i 100 geni che appaiono maggiormente coinvolti nel controllo dell'infezione da MAP. Per tali geni è stata attuata una *SNP discovery* ri-sequenziandone alcune regioni.

A tal fine sono stati disegnati primers per amplificare la regione non codificante 5' e il primo esone. Tali primers sono stati utilizzati su 10 bovini, 6 Frisone (3 positive e 3 negative) e 4 di altre razze per aumentare la diversità genetica. Gli ampliconi prodotti sono poi stati sequenziati e gli SNP individuati sono stati usati come punto di partenza per disegnare un saggio di genotipizzazione Illumina BeadXpress.

*Forte Gene candidato IL-27.* Questo gene è stato completamente sequenziato in 6 razze e un case/control study è stato effettuato per la Jersey.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

Le sequenze ottenute dai 10 bovini considerati per i 100 geni candidati sono state analizzate e allineate al fine di identificare gli SNP. Agli SNP così individuati è stato associato un "punteggio qualitativo" in base al numero di volte in cui essi comparivano nelle sequenze. In particolare, gli SNP presenti in una sola sequenza sono stati considerati dei possibili artefatti e di conseguenza esclusi dalle successive analisi.

Tali analisi hanno permesso di identificare 95 SNP in 27 geni. A essi ne sono stati aggiunti altri 92, individuati *in silico* in seguito ad analisi bioinformatiche sui geni coinvolti nella risposta immunitaria e analizzando inoltre i dati presenti in letteratura.

I 187 SNP totali così identificati sono stati utilizzati come punto di partenza per disegnare un saggio di genotipizzazione basato sulla piattaforma Illumina BeadXpress. Solo 141 dei 187 SNP hanno superato i controlli di qualità messi in atto dal software di analisi Illumina, estremamente restrittivo al fine di garantire la massima sicurezza nella specificità dell'ibridazione. Su questi 141 SNP è quindi stato possibile proseguire col saggio.

Il saggio BeadXpress è stato utilizzato per genotipizzare 248 bovine sieropositive e 248 negative per paraTB e i risultati sono stati quindi analizzati al fine di valutare l'eventuale associazione degli SNP genotipizzati con la malattia.

I geni per cui è stata individuata una maggiore associazione con lo status di malattia sono il recettore per l'Interferone  $\gamma$  (*IFN $\gamma$ R*), l'integrina  $\beta 5$  (*Itg  $\beta$  5*), il nitric oxide synthase 3 (*Nos3*) e il CD40 (*TNFRF5*). Tuttavia, in segui-

to alla correzione statistica per il *multiple testing*, nessuno di questi SNP ha superato il livello di significatività. Questi geni candidati saranno testati su altri campioni per valutare ulteriormente il loro potenziale effetto sullo status della malattia.

*Gene IL-27.* Questo gene è stato selezionato per analogia al modello della tubercolosi (TB) umana. Esso codifica per una citochina caratterizzata solo di recente e nota per essere implicata nelle primissime fasi dell'infezione da *M. tuberculosis*. In particolare, agendo da antagonista nei confronti dell'attivazione dei macrofagi mediata da IL-12, IL-27 di fatto facilita la colonizzazione di questi ultimi da parte dei micobatteri, e, in ultima analisi, l'infezione. Il ruolo di IL-27 nelle prime fasi della TB umana pare così centrale che sono in fase di valutazione dei *trials* terapeutici basati sulla sua neutralizzazione.

Siccome l'ortologo bovino non è mai stato caratterizzato e siccome i *pathway* cellulari e molecolari (esempio: *subsets* coinvolti e ruolo regolatorio delle citochine) sono in massima parte comuni, abbiamo ritenuto interessante valutare il ruolo di IL-27 nella paraTB.

A tal fine, il gene bovino annotato come IL-27 p28 nei database pubblici è stato sequenziato in diverse razze di bovini: Limousin, Jersey, Bruna Alpina, Piemontese, Frisona (per quest'ultima, sono stati considerati sia individui positivi che negativi alla paraTB).

L'assemblaggio e l'allineamento delle sequenze ha permesso di evidenziare 15 SNP, 3 dei quali esonici. Di questi, 2 risultano sinonimi e 1 (g.5281G>A), identificato nella Jersey, porta alla sostituzione aminoacidica Glu->Lys (p.E168K) in una regione evolutivamente poco conservata della proteina ed esposta verso l'esterno.

La messa a punto di un saggio PCR-RFLP ha permesso di definire rapidamente la frequenza allelica per questo SNP su un pannello di 159 individui non imparentati, appartenenti alle 6 razze considerate. Tali esperimenti hanno messo in evidenza un'alta frequenza (0.41) dell'allele A nelle Jersey (una razza aneddoticamente molto suscettibile a paraTB) e una frequenza un po' minore per le Brune Alpine (0.25). In tutte le altre razze l'allele G è pressoché totalmente fissato. Nessuna differenza è stata notata tra i circa 20 campioni di Frisone siero-positive per paraTB e altrettanti campioni negativi.

L'alta frequenza dell'allele A nelle Jersey, assieme alle evidenze di una loro particolare suscettibilità alla paraTB ha suggerito il disegno, per questa razza, di un esperimento *case/control* (pur con tutte le difficoltà di reperire in Italia un buon numero di campioni di questa razza). Tale esperimento, condotto su 21 animali siero-positivi e 23 siero-negativi, ha messo in evidenza differenze statisticamente significative ( $p=0.007$ ) nella distribuzione delle fre-

quenze alleliche tra gli uni e gli altri. In particolare, l'allele A (codificante per la variante Lys) risulta significativamente associato allo stato di positività per paraTB, con un rischio relativo (*odd ratio*) associato pari a 3.79 (L95=1.37, U95=10.44). Inoltre, è risultato che il 75% degli animali aventi almeno un allele A ricade entro la categoria dei siero-positivi. Attualmente si stanno acquisendo ulteriori campioni di Jersey e di Bruna Alpina al fine di testare ulteriormente questa osservazione.

In conclusione, questa parte del lavoro ha consentito l'identificazione, in analogia col modello umano, di un buon gene candidato per controllare la suscettibilità alla paraTB. È interessante notare come la proteina codificata da questo gene e i circuiti regolatori da essa controllati non sono mai stati messi in relazione alla paraTB né ai meccanismi di risposta messi in atto dai macrofagi. Questo lavoro pone quindi le basi per ampliare l'indagine sui meccanismi immunologici in atto nelle prime fasi dell'interazione ospite-patogeno. Un primo passo, da questo punto di vista, sarà costituito dalla valutazione della sopravvivenza di MAP in macrofagi aventi diverso genotipo, nonché in una valutazione delle loro risposte funzionali.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Caterina Cambuli (Ricercatore)  
 Simona Panelli (Ricercatore)  
 Giulietta Minozzi (Ricercatore)  
 Francesco Strozzi (Ricercatore)

#### PRODOTTI

- Possibile uso dello SNP IL-27 g.5281G>A in screening per paraTB e in strategie riproduttive.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) PANELLI S., STROZZI F., MINOZZI G., WILLIAMS J.: *Characterization of inter-breed variability in the bovine gene encoding Interleukin-27 p28 and the identification of a variant associated with para-tuberculosis risk in Jersey cattle*, Under revision (Animal Genetics).

JOHN WILLIAMS\*

## Studio dell'effetto del genotipo sulla vitalità embrionale mediante analisi high throughput di mRNA e miRNA\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

Un appropriato sviluppo embrionale è un fattore critico per l'impianto e lo stabilirsi della gravidanza e richiede embrioni di buona qualità. Diversi studi hanno dimostrato che la qualità embrionale può dipendere dal profilo di espressione genica e che l'espressione modificata per alcuni geni può influenzarne lo sviluppo durante la fase preimpianto. È in questa fase che possono avvenire alterazioni nella regolazione dell'espressione genica tali da compromettere il successivo sviluppo embrionale.

Sull'ipotesi che gli embrioni bovini *crossbred* abbiano una più alta fertilità, uno studio preliminare ha evidenziato alcuni geni differenzialmente espressi in embrioni *crossbred* rispetto a embrioni *purebred* Frisona (MnSOD, gp130, PED, CX43, FGF4). L'obiettivo è valutare l'effetto del genotipo sulla vitalità embrionale basandosi su profili di espressione genome-wide di embrioni a specifici stadi di sviluppo e con diverso background genetico mediante analisi *high throughput* di mRNA e miRNA.

### MATERIALE E METODOLOGIE

#### *mRNA*

Il *transcriptomic profiling* è stato eseguito con la tecnologia microarray utilizzan-

\* Consorzio di Ricerca e Sperimentazione degli Allevatori

\*\* Unità di ricerca CRSA, responsabile scientifico dott. John Williams

do il chip bovino CombiMatrix CustomArray 90K. Sono state prodotte due popolazioni di embrioni (5 pool purebred *Frisona* e 5 pool crossbred *Frisona* × *Bruna*) per diversi stadi della fase preimpianto (Giorno 2, 4, 5 e 7). L'RNA è stato estratto con il kit RNeasy Micro Plus (Qiagen) e il quality-check eseguito con RNA6000 PicoChip (Agilent Technologies). L'analisi del trascrittoma è stata eseguita mediante ibridazione dell'array con antisense RNA (aRNA). Data l'esigua quantità di RNA presente negli ovociti e negli embrioni, l'aRNA è stato ottenuto con due round di *T7 in vitro transcription* utilizzando il kit ampULSe (Kreatech biotechnology) ottenendo in media 100ug aRNA. La validazione dei geni differenzialmente espressi sarà eseguita con RT-PCR.

### *miRNA*

Sarà analizzato il miRNA di 3 pool di ovociti MII e 3 pool di blastocisti mediante smallRNA sequencing su piattaforma Genome Analyzer II (Illumina).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

È stata eseguita un'analisi di espressione genica globale di ovociti ed embrioni bovini durante la fase preimpianto utilizzando un custom microarray ad alta densità per indagare sull'espressione specifica di ogni stadio e sull'effetto del genotipo sulla vitalità embrionale. Poiché la prima fase dell'embrionogenesi dipende da una successione altamente organizzata di pattern di espressione genica che ne definisce il normale sviluppo, è opportuno utilizzare tecnologie high throughput per uno studio di confronto di *whole expression* di due popolazioni di embrioni purebred *Frisona* e crossbred *Frisona* × *Bruna* in diversi stadi della fase preimpianto (8, 16, 32 cellule e blastocisti) e di ovociti MII allo scopo di verificare la dinamica del profilo di espressione durante lo sviluppo e quindi partendo dalla degradazione dell'RNA materno all'attivazione genica dell'embrione. La fecondazione e la prima divisione dello zigote comporta il cambiamento della cromatina materna e paterna e la traduzione dell'mRNA di origine materna, catturato dall'ovocita durante l'oogenesi. Il punto conosciuto come attivazione dell'RNA embrionale, dove c'è un forte aumento dell'espressione del nuovo genoma diploide, è specie-specifico e nel bovino avviene allo stadio di 8-16 cellule. Fino a questo punto una riserva di mRNA (dell'ovocita) di origine materna governa l'embrionogenesi fino allo stadio di 8-16 cellule, quando si attiva la trascrizione dei geni zigotici che permettono all'embrione di svilupparsi pienamente.

I risultati ottenuti fino a ora sono preliminari. Per quanto riguarda l'espressione genica delle due popolazioni di embrioni *purebred* e *crossbred* relativa a

BLASTOCYST VS MII OOCYTE		
ANNOTATION	LOG FOLD CHANGE	ADJUSTED PVALUE
BTG4	-8.05	2.71E-12
ZARI L	-8.11	2.71E-12
ID-3	-7.37	4.03E-12
RGS2	-7.77	5.17E-12
SLC7A3	-7.06	6.70E-12
CPEB1	-7.64	2.46E-11
KRT18	7.41	2.64E-11
PIIG	-7.12	5.11E-11
PAIP1	-6.41	6.19E-11
TKT	5.98	8.62E-11
RGS16	-6.61	1.56E-10
BPGM	-5.83	2.44E-10
FAM151A	5.98	2.45E-10
GNMT	6.06	2.65E-10
SPG21	-4.16	2.79E-10
BII	4.75	2.91E-10
AP4A	-4.49	2.91E-10
MDHC	6.52	3.34E-10
PRR6	-6.32	3.49E-10
RNF187	4.38	3.51E-10

Tab. 1

8 CELLS VS BLASTOCYST		
ANNOTATION	LOG FOLD CHANGE	ADJUSTED PVALUE
ZARI-LIKE	7,77	2,10E-21
ID-3	7,20	2,10E-21
BTG4	7,75	2,10E-21
RGS2	7,52	6,95E-21
KRT18	-7,55	4,89E-18
SLC7A3	6,56	1,79E-17
BI-1	-5,19	2,14E-17
BPGM	5,94	2,18E-17
SLC25A3	-6,23	2,50E-17
PRR6	6,33	4,86E-17
FAM151A	-5,74	5,37E-17
PROTEIN S100-A14	-7,55	5,62E-17
MASPARDIN	4,17	9,61E-17
START DOMAIN CONTAINING 7	-5,49	1,73E-16
CATHEPSIN L1	-7,12	2,44E-16
TRANSKETOLASE	-5,25	2,60E-16
PANTOTHENATE KINASE 3	-4,63	2,97E-16
RAD17	5,00	2,97E-16
GDF-9	6,86	4,08E-16
CKS-1	3,41	4,83E-16

Tab. 2

8 CELLS VS MII OOCYTE		
ANNOTATION	LOG FOLD CHANGE	ADJUSTED PVALUE
TRIM4	3,96	1,53E-10
JAZF1	3,52	1,70E-10
gamma-taxilin	-2,80	2,61E-10
FANK1	3,70	2,61E-10
USH2A	4,29	3,62E-10
CCDC92	2,04	7,61E-10
CASP14	2,18	1,11E-09
VATE1	3,73	1,35E-09
GLRX3	4,35	1,36E-09
Fructose-bisphosphate aldolase	3,28	1,36E-09
Intraflagellar transport protein 20 homolog	3,01	1,36E-09
RPA2 family	2,74	1,82E-09
Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	2,85	1,82E-09
U11/U12 small nuclear ribonucleoprotein	3,40	1,86E-09
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	2,53	1,86E-09
Zinc finger protein 323	2,96	1,87E-09
Mitoch. import inner membrane translocase sub Tim9	3,41	1,87E-09
RPA2 family	2,69	2,96E-09
Retrotransposed gene	3,16	4,63E-09
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1	2,15	5,20E-09

Tab. 3

ogni stadio analizzato fino a ora (8 cellule, 16 cellule e blastocisti) con il chip CombiMatrix non risultano geni differenzialmente espressi in modo significativo. Anche dall’analisi tra ovociti MII di Frisona e di Bruna non risultano geni differenzialmente espressi in modo significativo.

Analizzando l’espressione a partire dagli ovociti MII e procedendo per lo stadio embrionale di 8 cellule (giorno 2) della fase preimpianto fino allo stadio di blastocisti (giorno 7) si rileva l’attivazione/disattivazione di molti geni coinvolti nell’embriogenesi nel bovino. Nella tab. 1 sono riportati i primi 20 trascritti differenzialmente espressi tra blastocisti e ovociti MII, nelle tab. 2 e 3 sono riportati i primi 20 trascritti differenzialmente espressi rispettivamente tra lo stadio 8 cellule e blastocisti e lo stadio 8 cellule e ovociti MII.

- Tra questi trascritti:
- BTG4 (B-cell translocation 4) è candidato a essere un gene *maternal-effect*, già riscontrato da Vallée et al. (2005) negli ovociti bovini e da Elis et al. (2008) negli ovociti maturi di pollo. Infatti è sovraespresso negli ovociti e negli embrioni allo stadio di 8 cellule rispetto alle blastocisti (*Log Fold Change* 7.76, *Pvalue*<0.001)



- ZAR1L (Zygote arrest 1 like protein) è simile a ZAR1, già conosciuto come gene *maternal-effect* riscontrato negli ovociti di topo (Mager et al., 2006). Infatti nel nostro caso, risulta up regolato negli embrioni 8 cellule *vs* blastocisti (*Log FC* 7.77, *Pvalue*<0.001) e down regolato nelle blastocisti *vs* gli ovociti (*Log FC* -8.11, *Pvalue*<0.001).
- BI-1 (Bax Inhibitor 1), espresso nelle blastocisti (*Log FC* 4.75, *Pvalue*<0.001, Blastocisti *vs* Ovociti), è una nuova proteina anti-apoptosi di regolazione del pathway controllato da Bcl-2 e Bax; Bax è un gene pro-apoptosi già suggerito da Lonergan et al. (2003) come marcatore della qualità delle blastocisti e il livello di espressione è più basso negli embrioni di qualità migliore.

I geni interessanti saranno validati con RT-PCR. Saranno eseguiti studi per confermare se i geni trovati sono candidati per una potenziale associazione con alta/bassa fertilità.

Sono in corso gli studi su miRNA.

I risultati preliminari dimostrano che il protocollo messo a punto può essere utilizzato con successo per l'analisi di espressione genica globale di ovociti ed embrioni bovini, campioni con un'esigua quantità di RNA. La determinazione del trascrittoma durante la fase di sviluppo preimpianto è fondamentale per capire i punti critici dei meccanismi di regolazione e può contribuire alla scoperta di nuove funzioni di regolazione per geni conosciuti in altri contesti.

#### BIBLIOGRAFIA

- VALLÉE M., GRAVEL C., PALIN M.F., REGHENAS H., STOTHARD P., WISHART D.S., SIRARD M.A. (2005): *Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species*, «Biol Reprod.» Jul, 73 (1), pp.63-71.
- ELIS S., BATELLIER F., COUTY I., BALZERGUE S., MARTIN-MAGNIETTE M.L., MONGET P., BLESBOIS E. (2008): *Govoroun MS Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen*, «BMC Genomics.», 9, p. 110.
- LONERGAN P., RIZOS D., KANKA J., NEMCOVA L., MBAYE A.M., KINGSTON M., WADE M., DUFFY P., BOLAND M.P. (2003): *Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality*, «Reproduction», 126 (3), pp. 337-46.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Daniela Iamartino (Ricercatore)  
 Francesco Strozzi (Ricercatore)

Rossana Capoferri (Ricercatore)  
Giovanna Lazzari (Direttore AVANTEA srl)  
Cesare Galli (Professore e Direttore scientifico AVANTEA srl)

#### PRODOTTI

#### TRASFERIMENTO

##### Conoscenze trasferibili

- Individuazione di geni direttamente implicati nello sviluppo embrionale e relativi alla vitalità embrionale;
- Individuazione e annotazione di nuovi miRNA relativi allo sviluppo embrionale.

#### BREVETTI

#### PUBBLICAZIONI

- 1) IAMARTINO D., STROZZI F., CAPOFERRI R., LAZZARI G., GALLI C., WILLIAMS J.L. (2010): *Whole Genome Expression Profiling During Early Bovine Embryo Development Using A Combimatrix Customarray® 90K*, Plant & Animal Genomic XVIII Conference, 9<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> January 2010, San Diego, CA.
- 2) IAMARTINO D., STROZZI F., CAPOFERRI R., LAZZARI G., GALLI C., WILLIAMS J.L. (2010): *Transcriptomic profiling of bovine oocytes and early stage embryos using a high density Combimatrix Customarray® 90K*, 32<sup>nd</sup> Conference for the International Society for Animal Genetics from 26<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> July 2010, Edinburgh.

LUCA FERRETTI\*

## Riproduzione e DNA mitocondriale\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

In passato sono state ipotizzate nell'uomo correlazioni tra anomalie del DNA mitocondriale (mtDNA), la funzionalità della catena respiratoria e l'infertilità maschile. Tali anomalie riguardano il numero di molecole di mtDNA, delezioni e inserzioni del mtDNA (Kao et al., 1995, 1998; May-Panloup et al., 2003). Nella specie bovina non esistono studi di settore: i criteri di valutazione del materiale seminale sono basati su parametri morfo-funzionali degli spermatozoi tralasciando il contributo del mtDNA. In questo modo gli effetti della presenza di specifici aplotipi mitocondriali nella popolazione femminile (i maschi non trasmettono il mtDNA alla progenie) viene a ogni generazione ignorato con il rischio di perdere aplotipi benefici o di fissare aplotipi non desiderabili. L'obiettivo di questa linea di ricerca è utilizzare la variabilità del DNA mitocondriale (mtDNA) come strumento per allargare la componente genetica con cui si valutano le attitudine riproduttivi dei tori.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Il sangue di 127 tori di razza Frisona è stato fornito dal Dr. Morelli del Centro Incremento Zootecnico (CIZ) di San Miniato (PI). Il CIZ ha classificato i bovini in gruppi compilando, per praticità, vari parametri di qualità del

\* *Università degli Studi di Pavia, Dipartimento di Genetica e Microbiologia*

\*\* *Unità di ricerca Università di Pavia, responsabile scientifico prof. Luca Ferretti*

seme in un indice descrittivo unico che identifica i singoli tori come ottimi, buoni, medi e scarsi. I DNA sono stati estratti con il metodo del fenolo-cloroformio, quantificati (NanoDrop) e valutati preliminarmente con una reazione di PCR che amplifica la regione di controllo del mtDNA (1135 bp) (Achilli et al., 2008). Per il sequenziamento completo e la lettura degli aplotipi mitocondriali, il mtDNA di 95 tori CIZ (più un controllo non CIZ) è stato amplificato sotto forma di 11 frammenti di PCR. Questi set di PCR sono stati usati per generare libraries con adattatori e tag molecolari in modo da effettuare un sequenziamento in multiplexing su una piattaforma Genome Analyzer II (Illumina).

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

I campioni sono stati preliminarmente classificati in base al sequenziamento della regione di controllo del mtDNA. Tutti i soggetti sono risultati T3 come atteso essendo gli animali di razza europea, poiché è noto che in Europa l'aplogruppo T3 è prevalente. Tuttavia, due soggetti (CIZ37 e CIZ94) sono risultati appartenere all'aplogruppo raro T5.

Per procedere al sequenziamento completo abbiamo selezionato un sottoinsieme di 96 animali. Ciò è stato deciso: 1) in funzione della tipologia di sequenziamento adottata (vedi più avanti); 2) escludendo dall'analisi soggetti con aplotipo identico, ovvero sia con esattamente le stesse combinazioni di mutazioni della regione di controllo; 3) mantenendo comunque per intero il gruppo di soggetti ai due estremi del parametro di valutazione della qualità del seme (ottimi e scarsi).

Il sequenziamento completo è stato eseguito in multiplexing su un sistema Illumina presso l'Insitute of Applied Genomics di Udine (IGA) dove nostro personale si è trasferito per occuparsi delle fasi di preparazione delle sequencing libraries. Il multiplexing è consistito nell'associare al DNA delle 11 reazioni di PCR che per ogni animale rappresentano il mtDNA da sequenziare, un doppio tag molecolare sotto forma di adattatori saldati ai frammenti di DNA. In questo modo 96 campioni sono stati sequenziati in parallelo in una lane della piattaforma Genome Analyzer II. I 96 campioni erano un controllo interno (non CIZ) e 95 animali CIZ così suddivisi nelle quattro categorie in base all'indice unificato per la qualità del seme fornito dal Dr. Morelli del CIZ: 8 "ottimi", 37 "buoni", 37 "medi" e 13 "scarsi". I due soggetti di aplogruppo T5 erano uno nel gruppo dei "medi" uno nel gruppo degli "scarsi".

Le sequenze ottenute sono state analizzate per la presenza di aplotipi e mutazioni individuali che correlassero con l'appartenenza dei soggetti ai quattro gruppi in cui erano stati classificati in base alla qualità del seme, che per semplicità indicheremo da qui in avanti con O (ottimi), B (Buoni), M (Medi), S (Scarsi). Sono stati rilevati un numero complessivo di 56 aplotipi individuali. Di questo set di aplotipi, 7 erano rappresentati nel gruppo O, 23 nel gruppo B, 29 nel gruppo M e 8 nel gruppo S. La distribuzione di aplotipi non presenta scostamenti significativi dall'atteso, cioè rispetto a una ripartizione casuale in funzione della numerosità dei gruppi. Di maggiore rilievo è il fatto che non nessuno degli aplotipi trovati sia presente specificatamente in uno dei gruppi di classificazione per la qualità del materiale seminale, O, B, M e S.

Sono state anche prese in considerazione mutazioni singole, cioè SNP presenti in specifici soggetti, per quel che riguarda la possibile correlazione con la classificazione nei gruppi O, B, M e S. I risultati non hanno nel loro insieme evidenziato SNP significativi. Ad es. abbiamo trovato lo SNP 363G in due soggetti S, ma non nei restanti 11 soggetti del gruppo; inoltre la 363G è presente anche in 3 soggetti B e 5 soggetti M. Similmente, abbiamo rilevato varie mutazioni presenti solo in singoli animali; queste si configurano evidentemente come mutazioni "private" del tutto neutrali rispetto alla correlazione nei gruppi di qualità del seme.

Complessivamente l'analisi delle sequenze complete di DNA mitocondriale in 95 tori CIZ di razza Frisona suddivisi in gruppi per differente qualità del materiale seminale non ha permesso di evidenziare associazioni significative con gli aplotipi del mtDNA da noi rilevati.

Va precisato che nell'uomo sono descritte molte associazioni tra le complesse caratteristiche fenotipiche maschili e aplotipi mitocondriali; ad esempio, l'aplogruppo J è stato associato alla longevità, l'aplogruppo T all'astenozoospermia. Essendo il mtDNA ereditato unicamente per via materna l'idea che la variabilità mitocondriale possa condizionare il successo riproduttivo maschile da tempo ha fatto pensare a un possibile ulteriore meccanismo di selezione delle cellule germinali (Moore and Reijo-Pera, 2000). Tuttavia non tutti gli studi sono concordi; ad esempio in un recente lavoro (Pereira et al., 2007) hanno sequenziato l'intero genoma mitocondriale di 43 uomini, 20 con problemi di astenozoospermia e 23 con problemi di teratoastenozoospermia appartenenti ad aplogruppi diversi. Dall'analisi della distribuzione delle mutazioni di ciascun individuo, gli autori non hanno rilevato un particolare aplotipo correlabile ai suddetti problemi di fertilità.

In conclusione, la tecnica del sequenziamento completo dell'intero DNA mitocondriale da noi adottata permette un'analisi filogenetica completa dei

dati e teoricamente una loro associazione a problematiche riproduttive, ma probabilmente il numero ancora troppo basso di genomi mitocondriali sequenziati e la mancanza di studi adeguati a livello di popolazioni di specifiche razze, impediscono per ora di arrivare a conclusioni certe.

#### BIBLIOGRAFIA

- ACHILLI A. ET AL. (2008): «Curr Biol.», 18:R157-R158.  
 KAO S.H. ET AL. (1995): «Biol. Reprod.», 52, pp. 729-736.  
 KAO S.H. ET AL. (1998): «Mol. Hum. Reprod.», 4, pp. 657-666.  
 MAY-PANLOUP P. ET AL. (2003): «Hum. Reprod.», 3, pp. 550-556.  
 MOOR F.L., REIJO-PERA R.A. (2000): «Am J Hum Genet.», 67, pp. 543-548.  
 PEREIRA L. ET AL. (2007): «Mol. Biol. Evol.», 24 (3), pp. 868-874.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Arianna Malusà (Assegnista)  
 Silvia Bonfiglio (Dottoranda)

#### PRODOTTI

- Sviluppo di un protocollo per il sequenziamento ultramassivo in multiplexing di genomi mitocondriali bovini con tecnologia Illumina su piattaforma Genome Analyzer. Sono state ottenute 96 sequenze complete di mtDNA bovino.

#### PUBBLICAZIONI

- 1) ACHILLI A., BONFIGLIO S., OLIVIERI A., MALUSÀ A., PALA M., KASHANI B.H., PEREGO U.A., AJMONE-MARSAN P., LIOTTA L., SEMINO O., BANDELT H.J., FERRETTI L., TORRONI A. (2009): *The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome*, PLoS ONE Jun 1; 4(6):e5753.
- 2) BONFIGLIO S., ACHILLI A., MALUSÀ A., OLIVIERI A., PALA M., HOOSHIAR K.B., PEREGO U.A., AJMONE-MARSAN P., NEGRINI R., PELLECCIA M., COLLI L., SEMINO O., TORRONI A., FERRETTI L. (2009): *The novel mtDNA haplogroup R: the contribution of Italian aurochs to modern cattle*, XI Convegno FISV, 23-25 settembre, Riva del Garda, Italy, Atti p. D09.01.

UMBERTO BERNABUCCI\*

## Valutazione della risposta allo stress in base al genotipo ai loci heat shock in razza Frisona\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

Le heat shock proteins (Hsp) sono delle proteine altamente conservate la cui funzione è quella di dirigere, trasportare e riavvolgere le proteine di cellule sottoposte a vari tipi di agenti stressori. Normalmente, le Hsp sono espresse a bassi livelli all'interno delle cellule, tuttavia, in risposta a varie condizioni di stress (radiazioni ultraviolette, metalli pesanti, ipossia, agenti tossici e stress da caldo), la loro sintesi aumenta come reazione protettiva della cellula. Tra le Hsp, la famiglia delle Hsp70 è quella maggiormente correlata con la risposta a condizioni di stress da caldo.

I cambiamenti nucleotidici nelle regioni fiancheggianti del gene dell'Hsp70 [5'- and 3'-untranslated region (UTR)], possono influenzare l'inducibilità, il grado di espressione o la stabilità dell'mRNA dell'Hsp70. Il presente studio ha l'obiettivo di verificare l'associazione tra i polimorfismi (SNPs) dell'Hsp70.1 inducibile e la risposta allo stress da caldo di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di vacche da latte di razza Frisona.

### MATERIALI E METODOLOGIE

Per la valutazione dei polimorfismi nella regione 5'-UTR dell'Hsp70.1 (g115 C/- and g348 G/T) sono stati effettuati prelievi di sangue su 450 bovine di

\* *Università di Viterbo, Dipartimento di Produzioni Animali*

\*\* *Unità di ricerca Università di Viterbo, responsabile scientifico prof. Umberto Bernabucci*

razza Frisona. In tabella 1 sono riportate le frequenze alleliche e genotipiche dei polimorfismi. Delle 450 bovine ne sono state selezionate 31 rappresentative dei genotipi individuati in modo tale che i diversi genotipi fossero bilanciati per numero e giorni di lattazione. Sono stati prelevati campioni di sangue per l'isolamento delle PBMC. Le PBMC sono state immerse in un bagno caldo a 43°C per 1 ora (tempo 0) e successivamente incubate a 39°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 1, 2, 4, 8, 16 e 24 ore. La vitalità cellulare è stata determinata mediante il test XTT. L'espressione genica delle Hsp70.1 è stata determinata mediante real-time RT-PCR su tutti i genotipi ad alta (--, TG), media (C-, TT) e bassa (CC, GG) vitalità. L'espressione dell'mRNA è stata normalizzata usando come gene costitutivo l'RPS9. La concentrazione endocellulare delle Hsp70.1 è stata determinata mediante saggio ELISA indiretto. I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando la procedura MIXED del programma statistico Statistica-7.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

Sono state eseguite le analisi dei dati relativi alla prova sperimentale *in vitro* sulle PBMC. I dati analizzati hanno riguardato: la vitalità cellulare, l'espressione genica e la concentrazione endocellulare delle Hsp70.1.

La vitalità cellulare è stata valutata utilizzando la metodica dell'XTT, che sfrutta la riduzione metabolica da parte delle cellule vitali dell'XTT producendo un formazano colorato che è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali. I risultati del test XTT hanno mostrato che i genotipi --/ e TG dopo 0, 1, 2 e 4 ore dall'esposizione al trattamento termico (43°C) mostrano una maggiore vitalità cellulare ( $P < 0.001$ ) rispetto agli altri genotipi analizzati. Nella figura 1A e 2A sono riportate le curve della vitalità cellulare ottenute dai diversi genotipi analizzati. Si nota che dopo 2 ore dallo stress i genotipi --/ e TG hanno fatto registrare valori di D.O. mediamente più alti (0.69 e 0.67) rispetto ai genotipi C- e TT che hanno dei valori di D.O. intermedi (0.60 e 0.61) e agli omozigoti CC e GG che presentano i valori più bassi (0.56 e 0.55). Tutti i genotipi hanno mostrato un andamento della vitalità cellulare simile, dopo 4 ore e soprattutto dopo 8 ore dallo stress si evidenzia una progressiva riduzione della vitalità cellulare in tutte le cellule. Oltre ai valori assoluti è da evidenziare il fatto che dopo l'induzione dello stress i genotipi --/ e TG hanno mostrato un andamento opposto a quello dei genotipi CC e GG. In particolare, mentre i primi hanno aumentato la D.O., nei secondi la D.O. si è ridotta dopo l'esposizione allo stress da caldo.



Sono stati quantificati i livelli di espressione dell'mRNA dell'Hsp70.1 nei diversi genotipi mediante real time PCR (fig. 2A e 2B). In tutti i genotipi si riscontra un aumento dell'espressione dell'Hsp70.1 nella prima ora di stress che raggiunge il suo apice, con valori diversi fra i genotipi, due ore dopo lo stress. Il livello di espressione dell'Hsp70.1 nella cellula ritorna ai livelli basali dopo circa 8 ore. I risultati hanno mostrato che rispetto al momento iniziale (no stress) in cui non è stata rilevata nessuna differenza di espressione dell'Hsp70.1 fra i diversi genotipi, dopo 1 e 2 ore dall'esposizione allo stress termico i livelli di espressione dell'Hsp70.1 risultano significativamente più elevati ( $P < 0.001$ ) nei genotipi --/ e TG rispetto agli altri genotipi. In questi due genotipi (--/ e TG) si osserva un marcato aumento dei livelli di espressione dell'Hsp70.1 di 2 e 1.5 volte rispetto ai genotipi CC, GG e C-, TT.

I risultati della vitalità cellulare e dell'espressione genica dei diversi genotipi hanno mostrato un andamento sovrapponibile. Di fatto i genotipi con valori di espressione genica dell'Hsp70.1 più elevati sono anche quelli con una vitalità cellulare migliore. Tale osservazione potrebbe di per sé spiegare la migliore sopravvivenza di questo gruppo di cellule, essendo nota la correlazione positiva fra espressione delle Hsp70 e sopravvivenza cellulare.

Mediante saggio ELISA indiretto sono stati analizzati i livelli endocellulari delle proteine Hsp70.1 inducibili (fig. 3A e 3B). Tutti i genotipi hanno mostrato livelli paragonabili di Hsp70.1 prima dell'induzione delle condizioni di stress, quindi si è osservato un progressivo aumento dell'espressione proteica nella prima ora di stress, che raggiunge il suo apice, con valori diversi fra i genotipi, 3 ore dopo lo stress. Il livello delle Hsp70.1 ritorna ai livelli basali circa 8 dopo lo stress.

Le Hsp70.1 sono risultate iper-esprese nelle cellule con i genotipi --/ e TG rispetto agli altri genotipi C-, TT e CC, GG che hanno fatto registrare rispettivamente una concentrazione più bassa del 30% e 13% di proteina prodotta.

Quanto osservato relativamente all'espressione genica delle Hsp70.1 viene sostanzialmente confermato anche dai dati ottenuti mediante saggio ELISA per la sintesi delle Hsp70.1. Infatti, i genotipi --/ e TG che hanno mostrato un maggiore incremento nei livelli di espressione dell' mRNA hanno mostrato anche una maggiore espressione proteica.

Si può dunque concludere che l'esposizione allo stress termico influenza in modo differente la vitalità cellulare e l'espressione delle Hsp70.1 nei diversi genotipi selezionati. Questi risultati indicano che la presenza dei polimorfismi ai loci dell'Hsp70.1 (g115 C/- and g348 G/T) migliorano la risposta cellulare allo stress da caldo e la tolleranza alle elevate tempera-

SNP	Genotipo/n° Animali			Freq. Allelica		Freq. Genotipica		
5'UTR 895C/-	CC	C/0	0	C	0	CC	C/0	0
	298	128	20	81.2	18.8	66.8	28.8	4.4
5'UTR 1128G/T	TT	TG	GG	T	G	TT	TG	GG
	6	187	253	22.2	77.8	1.3	41.9	56.8

Tab. 1 *Distribuzione dei genotipi e degli alleli dei 2 SNPs del gene Hsp70.1 in 446 bovine di razza Frisone*

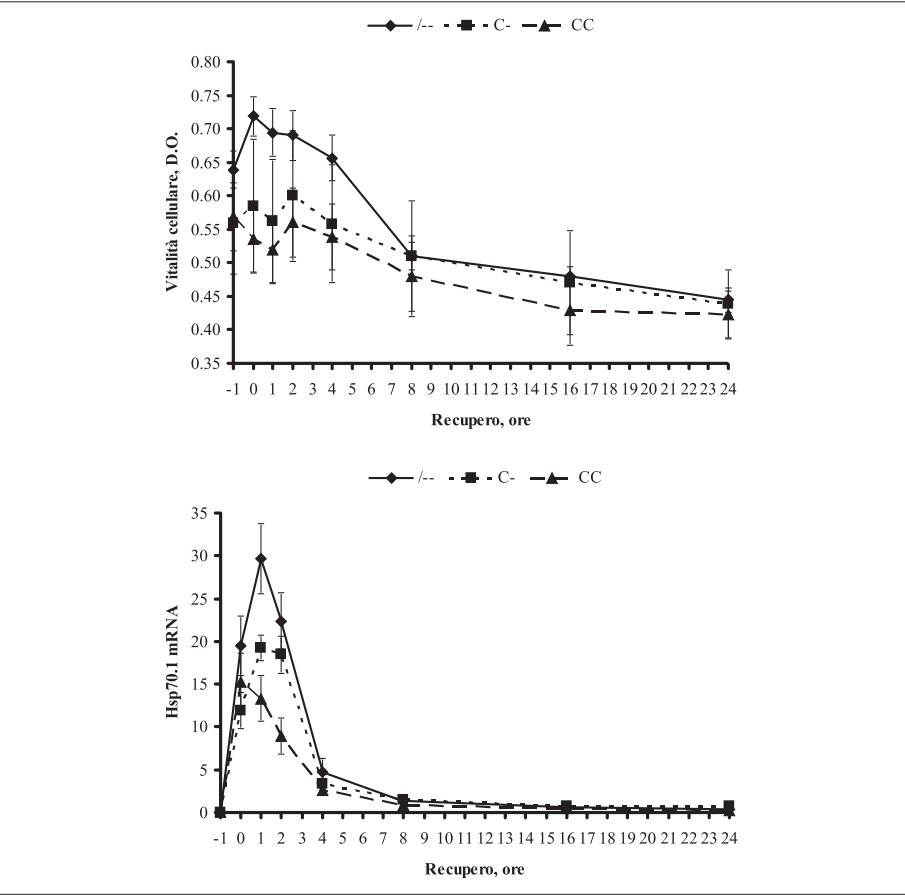


Fig. 1 *Cinetica della vitalità cellulare (A) e dell'mRNA (B) dell' Hsp70.1 in PBMC bovine con genotipo --, C- o CC. Le PBMC sono state stressate a 43°C per 1 ora (tempo 0), la vitalità cellulare e l'espressione genica delle Hsp70.1 sono state studiate dopo 1, 2, 4, 8, 16 e 24 ore di esposizione delle cellule a 39°C. Il tempo -1 rappresenta la fase iniziale in assenza di stress termico. D.O. = Densità Ottica*

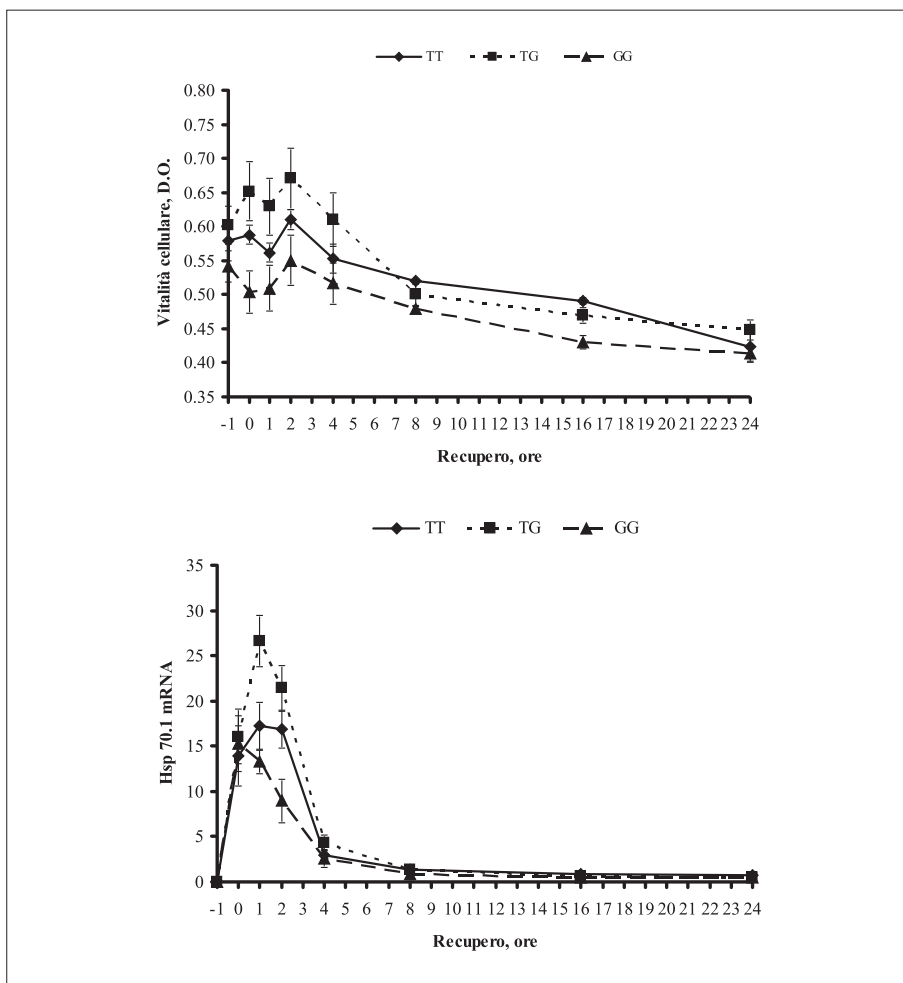


Fig. 2 *Cinetica della vitalità cellulare (A) e dell'mRNA (B) dell' Hsp70.1 in PBMC bovine con genotipo TT, TG o GG. Le PBMC sono state stressate a 43°C per 1 ora (tempo 0), la vitalità cellulare e l'espressione genica delle Hsp70.1 sono state studiate dopo 1, 2, 4, 8, 16 e 24 ore di esposizione delle cellule a 39°C. Il tempo -1 rappresenta la fase iniziale in assenza di stress termico. D.O. = Densità Ottica*

ture delle PBMC bovine. Questi polimorfismi genetici potrebbero essere impiegati nella selezione genetica di bovine da latte in grado di garantire buone performance produttive anche in condizioni di elevate temperature ambientali.

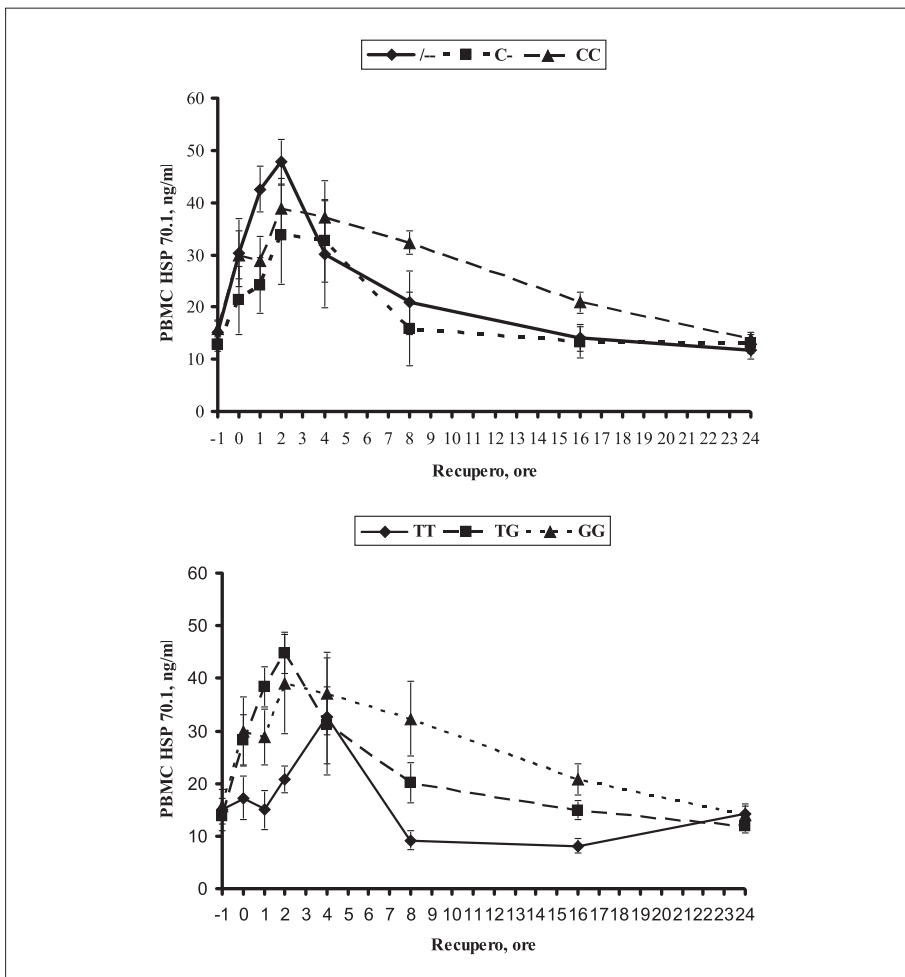


Fig. 3 Concentrazione endocellulare delle Hsp70.1 dei diversi genotipi --, C- o CC (A) e TT, TG o GG (B). Le PBMC sono state stressate a 43°C per 1 ora (tempo 0), la concentrazione endocellulare delle Hsp70.1 è stata studiata dopo 1, 2, 4, 8, 16 e 24 ore di esposizione delle cellule a 39°C. Il tempo -1 rappresenta la fase iniziale in assenza di stress termico

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Patrizia Morera (Ricercatore)  
 Loredana Basiricò (Ricercatore)  
 Valentina Primi (Dottoranda)  
 Costantino Gentile (Studente Master)  
 Alfredo Morales (Nutrizionista Libero Professionista)  
 Sergio Franceschini (Veterinario Libero Professionista)

## TRASFERIMENTI

Conoscenze trasferibili: potenziale utilizzazione degli SNPs individuati per la selezione di genotipi termotolleranti.

## PUBBLICAZIONI

- 1) BERNABUCCI U., LACETERA N., BAUMGARD L.H., RHOADS R.P., RONCHI B., NARDONE A. (2010): *Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants*, «Animal», 4 (7), pp. 1167-1183, doi: 10.1017/s17517-311-1000-090-x.
- 2) CATALANI E., AMADORI M., VITALI A., BERNABUCCI U., NARDONE A., LACETERA N. (2010): *The Hsp72 response in peri-parturient dairy cows: relationships with metabolic and immunological parameters*, «Cell Stress & Chaperones», vol. In press, ISSN: 1355-8145, doi: 10.1007/s12192-010-0186-x.
- 3) BASIRICÒ L., MORERA P., PRIMI V., LACETERA N., NARDONE A., BERNABUCCI U. (2010): *Inducible Hsp70.1 gene polymorphisms affect heat shock response of bovine mononuclear cells*, EAAP, 61° Annual Meeting of the European Association for Animal Production. 23-27 Agosto 2010, Heraklion, Creta, Grecia.



DOMENICO IANNELLI\*

## Identificazione di geni che conferiscono al bufalo protezione contro la *B. abortus*\*\*

### STATO DELL'ARTE

Sono stati identificati due geni di resistenza alla brucellosi: *Nramp1* e *MBL*. Il gene *Nramp1* (natural resistance-associated macrophage protein 1) sintetizza la proteina Nramp1, dotata di una forte azione antibatterica. Il gene si esprime nei macrofagi, la nicchia preferita dalla *B. abortus*. La proteina esercita la sua azione antibatterica sottraendo  $\text{Fe}^{++}$  ai batteri. Il locus comprende due alleli (A e B). Gli animali con due copie dell'allele B (BB) sono resistenti alla infezione.

MBL è una proteina sintetizzata nel fegato e immessa poi in circolo. Il gene corrispondente (*MBL*) contiene due siti polimorfi localizzati nel promotore e un terzo situato nel primo esone. I diversi alleli vengono ereditati in blocco sotto forma di aplotipi. Gli animali con due copie dell'aplotipo HYA/HYA sono resistenti alla *B. abortus*. Viceversa, gli animali con due copie dell'aplotipo LYB/LYB sono suscettibili. Molti batteri esprimono in superficie il mannosio. La proteina MBL (mannose-binding lectin) lega i batteri attraverso il mannosio e ne favorisce la fagocitosi da parte dei macrofagi. La proteina MBL presente nel siero degli animali HYA/HYA esercita *in vitro* un'azione fagocitica molto più intensa rispetto a quella presente negli animali LYB/LYB.

Sul piano applicativo forse è utile ricordare che i geni dell'immunità innata di solito sono fedelmente conservati nel corso dell'evoluzione. Per esempio,

\* Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali

\*\* Unità di ricerca Università di Napoli, responsabile scientifico prof. Domenico Iannelli

i geni Toll-like (importantissimi geni dell'immunità innata dei mammiferi) prendono il nome dal gene *Toll* della *Drosophila* di cui sono la fotocopia). Pertanto, i risultati osservati nel bufalo, molto probabilmente sono estensibili ad altre specie colpite dalla brucellosi (capra e bovino).

## MATERIALE E METODI

### *Gene candidato Nramp1*

La segregazione allelica (al locus *Nramp1* e 8 loci marcatori) è stata studiata su 166 triadi (padre, madre, figlia) di bufalo. Gli animali formanti le triadi non sono stati inclusi nello studio di associazione in quanto appartenenti a un allevamento esente da brucellosi. I casi erano animali risultati positivi a diverse prove sierologiche per la ricerca della *B. abortus* (skin test, agglutinazione, fissazione del complemento). I controlli erano animali negativi alle stesse prove. Casi e controlli (142 e 271, rispettivamente) sono stati scelti a caso da una lista di 1000 animali in lattazione (età: 2-10 anni) distribuiti in tre allevamenti localizzati nella provincia di Caserta. Gli animali erano tutti non vaccinati. I tre allevamenti erano caratterizzati da una elevata incidenza della brucellosi (fino al 40% degli animali erano positivi alle prove sierologiche). Casi e controlli erano dunque omogenei in termini di esposizione alla *B. abortus* e al sesso. Per evitare la stratificazione del campione, i casi e i controlli sono stati scelti in eguale proporzione (47 casi 3 90 controlli) da ciascuno allevamento. L'analisi genotipica è stata fatta senza conoscere in anticipo i risultati delle prove sierologiche. Le procedure usate per la identificazione degli alleli, la sequenza nucleotidica degli alleli, la vitalità dei batteri intracellulari, l'infezione dei monociti con la *B. abortus* marcata con GFP (proteina verde fluorescente) sono state descritte in Borriello et al.

### *Gene candidato MBL*

È stato adottato lo stesso disegno sperimentale già descritto per il gene *Nramp1*. Per escludere interferenze dovute all'età degli animali, il sesso o la vaccinazione, casi e controlli erano tutti animali in lattazione, non vaccinati e di età compresa tra 2-10 anni. Casi e controlli, oltre che al locus *MBL*, sono stati tipizzati anche rispetto al locus *Nramp1*. Per evitare confusione nella interpretazione dei dati, gli animali BB, resistenti alla *B. abortus*, sono stati esclusi dallo studio. La frequenza dell'allele O (che conferisce suscettibilità), misurata su 100 casi e 147 controlli, è risultati pari a 0.46 nei casi e 0.17 nei controlli. Sulla base di



questa informazione, è stata calcolato che uno studio che includeva 254 casi e 254 controlli avrebbe fornito un valore di OR (odds ratio) di almeno 2 con un valore di  $\alpha$  di 0.05. La genotipizzazione e la inibizione dell'azione della MBL sono state condotte come descritto in Capparelli et al.

### *Animali secretori e supersecretori di B. abortus*

La presenza di animali secretori e supersecretori di brucelle nel latte è stata studiata su 500 bufale allevate in quattro allevamenti localizzati nella provincia di Caserta (125 animali/ allevamento). All'interno di ogni allevamento gli animali sono stati scelti in modo da escludere differenze dovute alla resistenza innata alla *B. abortus*, vaccinazione, sesso o età. Pertanto, gli animali inclusi nell'esperimento erano tutti vacche in lattazione di età compresa tra 4-10 anni e geneticamente non resistenti rispetto ai geni di resistenza alla *B. abortus* finora identificati: *Nramp1* e *MBL*. I 500 animali sono stati testati per la presenza di brucelle nel latte tre volte (a intervalli di un mese) mediante il test batteriologico e di PCR.

## RISULTATI

1) *Gene Nramp1*. Nella regione 3' non tradotta del gene sono stati identificati 4 alleli (*Nramp1*-A, -B, -C, -D). Il genotipo BB era presente solo tra i controlli, evidenza che il genotipo conferisce resistenza alla *B. abortus*. I monociti (macrofagi circolanti nel sangue) degli animali BB (resistenti) mostravano un livello basale del mRNA *Nramp1* più alto e un numero di batteri vivi intracellulari inferiore rispetto ai monociti di animali AA (suscettibili). Molto probabilmente il livello basale più alto della proteina antibatterica Nramp1 offre agli animali BB la possibilità di controllare i batteri appena penetrati nell'interno della cellula.

2) *Gene MBL*. Uno studio caso-controllo ha accertato che nel bufalo la coppia di aplotipi HYA/HYA al locus MBL è associata alla resistenza alla *B. abortus* ( $P < 10^{-7}$ ) e l'aplotipo LYD/LYD con la suscettibilità allo stesso patogeno ( $P: > 10^{-7}$ ). Gli animali inclusi nello studio sono stati testati due volte – a distanza di un mese – per la presenza di anticorpi anti *B. abortus* in siero mediante agglutinazione, fissazione del complemento e citometria a flusso. I casi (335 animali) sono risultati positivi a tutte le prove sierologiche; i controlli (335 animali) includevano animali esposti, ma negativi alle stesse prove. Il siero degli animali geneticamente resistenti hanno dimostrato di avere *in vitro* una attività antibatterica significativamente più elevata rispetto a quella

del siero degli animali geneticamente suscettibili. La inibizione dell'attività antibatterica del siero da parte di inibitori della MBL (EDTA, mannosio, N-acetyl-glucosamina) o dalla presenza di anticorpi anti MBL umana rappresentano una prova convincente che l'attività antibatterica del siero risulti dalla interazione tra la MBL e la *B. abortus*. La replicazione dei risultati su un campione di soli 100 casi e altrettanti controlli conferma la validità dello studio di associazione.

3) *Differenze individuali rispetto alla capacità di trasmettere la brucellosi.* La maggior parte delle malattie infettive (trasmesse da un vettore: la malaria; per contatto diretto non sessuale: il morbillo; per contatto sessuale: l'AIDS) hanno in comune una caratteristica: la presenza di due classi di pazienti, definiti secretori e supersecretori. I primi trasmettono la malattia a poche persone o a nessuna. I supersecretori invece trasmettono l'infezione a un gran numero di persone. Numerose ricerche (in gran parte nell'uomo) hanno dimostrato che la diffusione di un patogeno (batterio, virus, parassita) può essere arrestata identificando e isolando i soli soggetti supersecretori. La presenza nella provincia di Caserta di diversi focolai di brucellosi ha consentito di accertare la presenza nel bufalo di animali secretori (che secernono < di  $10^3$  colonie di *B. abortus* per ml di latte) e di animali supersecretori (che secernono > di  $10^4$  colonie di *B. abortus* per ml di latte). Fatto più importante, l'allontanamento dei soli animali supersecretori ha permesso di ridurre drasticamente la trasmissione della malattia.

Dei 500 animali inclusi nello studio, 80% circa sono risultati non secretori, 14% secretori e 6 % supersecretori. I supersecretori sono stati allontanati in tre allevamenti e lasciati invece nel quarto (allevamento di controllo). In assenza degli animali supersecretori, a distanza di tre mesi, 4 su 291 animali negativi sono diventati positivi al test batteriologico; nell'allevamento di controllo invece, 7 animali su 108 sono diventati positivi (P, Fisher exact test: 0.0136). I dati, per quanto preliminari, suggeriscono che la identificazione e l'allontanamento dei soli animali supersecretori promette di semplificare enormemente il controllo della brucellosi negli animali e di ridurne sensibilmente i costi (Capparelli et al.).

4) *Confronto di metodi diversi di diagnosi della brucellosi.* Circa 500 bufale in lattazione appartenenti a 4 allevamenti (125 animali/allevamento) sono state tipizzate per l'infezione da *B. abortus* utilizzando tre diversi metodi sierologici (fissazione del complemento, agglutinazione con il Rosa Bengala, citometria a flusso) e con il metodo batteriologico. Questo ultimo è riconosciuto quale "golden standard" per la diagnosi della brucellosi, nell'uomo e negli animali. I tre metodi sierologici hanno mostrato una

specificità (% di animali effettivamente negativi) del 40% - 45%. Questo dato indica che i metodi sierologici sovrastimano di circa 2 volte il numero degli animali positivi, moltiplicando il costo del piano di controllo della malattia (Capparelli et al.). In più, va ricordato che una diagnosi certa è alla base di qualsiasi studio di associazione, indipendentemente dell'approccio utilizzato (gene candidato o genome wide scan). Anche una percentuale modesta di errori nella diagnosi riduce infatti sostanzialmente la capacità discriminante dello studio.

## CONCLUSIONI

La resistenza ai patogeni è un carattere complesso. La sua soluzione pertanto non può che essere complessa, basata cioè non soltanto sui geni di resistenza. Nel corso del 2008 questa sub-unità ha cercato di dare consistenza a questo concetto. È stato dimostrato (Capparelli et al.) che i bufali si differenziano non soltanto rispetto alla resistenza alla *B. abortus*, ma anche alla capacità di diffondere questo patogeno. Per arrestare la diffusione della *B. abortus* negli allevamenti è sufficiente allontanare i soli pochissimi animali supersecretori. Il risultato dimostra che, oltre alla genetica, anche l'epidemiologia può dare un contributo significativo al controllo dell'infezione (dopo tutto, geni e patogeni si diffondono seguendo strategie molto simili).

Il controllo della *B. abortus* richiede l'impiego di un metodo di diagnosi specifico. La sub-unità ha indagato anche in questa direzione. Ha dimostrato che i metodi di diagnosi sierologica della brucellosi attualmente in uso (più o meno tutti) hanno il forte limite di registrare un numero intollerabilmente alto (30-40%) di falsi risultati positivi. Dunque, anche la revisione critica della ortodossia corrente può contribuire a un efficace controllo della diffusione della *B. abortus*. Non solo geni insomma.

Si insiste sul concetto che il controllo della brucellosi sia visto per quello che è: un problema che trova la sua soluzione in un approccio integrato e multilaterale, il solo capace di minimizzare la necessità per i patogeni di diventare resistenti ai geni dell'immunità innata. La resistenza è strettamente dipendente dalla pressione selettiva. I batteri sono vissuti per milioni di anni in presenza della penicillina e streptomina (prodotte da microrganismi del genere *Penicillium* e *Streptomyces*) senza sviluppare resistenza. Dopo la scoperta degli antibiotici, in un breve arco di tempo, il fenomeno della resistenza agli antibiotici è diventato diffusissimo. La pressione selettiva esercitata sui batteri dall'uso proprio e improprio degli antibiotici è stato tale da non lascia-

re ai batteri altra possibilità che quella di diventare resistenti («Nature», 438, p. 170). Quel che è già accaduto con gli antibiotici, gli erbicidi e pesticidi potrebbe accadere con l'immunità innata se la selezione, esercitata in una sola direzione, diventasse eccessiva. Qualche segnale già si vede. Nella pecora, la selezione in una sola direzione (rispetto a un unico gene di resistenza) ha avuto il risultato che animali prima resistenti diventassero suscettibili («Nature», 423, p. 498).

In conclusione, le conoscenze scaturite dal progetto Selmol suggeriscono che il controllo della diffusione di un patogeno richiede di agire lungo diverse direzioni. Nel caso della *B. abortus*, le direzioni sono:

1) La identificazione, non di uno, ma diversi geni di resistenza. La selezione di animali ognuno positivo per un gene di resistenza diverso rende più arduo per i batteri neutralizzare l'immunità innata. E' infatti molto improbabile che la stessa mutazione conferisca alla *B. abortus* protezione contro due o più geni dell'ospite (geni diversi di norma agiscono con meccanismi diversi).

2) La identificazione degli animali supersecretori. Il controllo della trasmissione del patogeno riduce il numero degli animali infetti, che a sua volta rallenta la evoluzione dei batteri verso la neutralizzazione dell'immunità innata.

3) L'uso di un metodo di diagnosi accurato, che consente di avere una stima corretta della diffusione della malattia stessa.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Amoroso Maria Grazia (Dottoranda)  
 Borriello Giorgia (Dottoranda)  
 Capparelli Rosanna (Professore associato)  
 Capuano Federico (Direttore Dipartimento Sicur Alim, Ist Zooprofilattico, Portici)  
 Iannaccone Marco (Dottorando)  
 Iannelli Domenico (Professore ordinario)  
 Marabelli Romano (Direttore Dipartimento Sicur Alim, Ministero della Salute, Roma)  
 Parlato Marianna (Dottoranda)  
 Roberto Sante (Professore associato)  
 Roberto Franco (Professore ordinario)

#### PRODOTTI

- Conta del numero di brucelle presenti nel latte mediante RT-PCR
- Tipizzazione dei bufali rispetto ai loci *Nramp1* e *MBL* mediante elettroforesi capillare e PCR, rispettivamente.

## TRASFERIMENTO

Tipizzazione dei bufali rispetto ai loci *Nramp1* e *MBL* mediante elettroforesi capillare e PCR, rispettivamente.

Base teorica della selezione per la resistenza (radicalmente diversa da come è intesa attualmente).

## BREVETTI

Nessuno.

## PUBBLICAZIONI

- 1) BORRIELLO G., CAPPARELLI R., FENIZIA D., ALFANO F., CAPUANO F., ERCOLINI D., IANNELLI D.: *Genetic resistance to B. abortus in the water buffalo*, «Infection and Immunity», 74, pp. 2115-2120.
- 2) CAPPARELLI R., ALFANO F., AMOROSO M.G., BORRIELLO G., FENIZIA D., ROPERTO S., ROPERTO F., IANNELLI D.: *Protective effect of the Nramp1 BB genotype against B. abortus in the water buffalo*, «Infection and Immunity», 75, pp. 988-996.
- 3) CAPPARELLI R., PARLATO M., AMOROSO M.G., ROPERTO S., ROPERTO F., MARABELLI R., IANNELLI D.: *Mannose-binding lectin haplotypes influence B. abortus infection in the water buffalo*, «Immunogenetics», 60, pp. 157-165.
- 4) CAPPARELLI R., PARLATO M., IANNACCONE M., ROPERTO S., ROPERTO F., MARABELLI R., IANNELLI D.: *Heterogeneous shedding of B. abortus in milk and its effect on the control of animal brucellosis*, «J Appl Microbiol.», 106, pp. 2041-2047.



GIORGIO POLI\*

## Valutazione della associazione tra la risposta immunitaria e la variabilità genetica per le cellule somatiche\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

La mastite è una delle malattie più costose per l'industria lattiero-casearia a livello mondiale, in quanto l'infezione può persistere per mesi a livello subclinico-cronico senza mostrare segni visibili. Il periparto rappresenta un periodo molto delicato per la bovina, durante il quale si verificano spesso malattie metaboliche e infettive, come le mastiti, che causano ingenti perdite economiche; tra diversi parametri le cellule somatiche del latte sono un indicatore molto sensibile dello stato sanitario della mammella. Di conseguenza lo studio è stato incentrato su vacche primipare nel periodo compreso fra 2-4 mesi prima del parto previsto e un mese dopo il parto, con lo scopo di: 1) studiare animali che, entrando in produzione per la prima volta, non siano andati incontro a precedenti infezioni o stress mammari; 2) tracciare un quadro di base della reattività immunitaria, poiché 2-4 mesi prima del parto le manze si trovano in stato di riposo; 3) studiare l'entità dell'immunodepressione che si verifica durante il periparto, in modo più o meno marcato nei diversi animali e allevamenti.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Sono state valutate aziende con manze figlie di tori plus- e minus-varianti

\* *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria*

\*\* *Unità di ricerca Università di Milano, responsabile scientifico prof. Giorgio Poli*

per il contenuto cellulare del latte, considerando il n° degli animali presenti, la loro omogeneità e la data prevista di parto, ed è stata selezionata un'azienda in provincia di Cremona, dove sono stati eseguiti 3-4 prelievi di sangue e uno di latte. Su tutti i campioni sono stati determinati: rapporto CD4+/CD8+ (che varia in stati patologici) e % di linfociti apoptotici (un n° elevato è patologico), valutati mediante citofluorimetria; espressione delle principali citochine mediante quantificazione relativa in Real-Time PCR; produzione di NAGase e lisozima (enzimi ad attività antibatterica rilasciati da neutrofili e cellule epiteliali) mediante metodica fluorimetrica; potere battericida del siero mediante metodica microbiologica. Sul sangue è stato effettuato l'esame emocitometrico, mentre sul latte di alcune vacche è stato eseguito l'esame citobatterologico per verificare la presenza e il tipo dei microrganismi eventualmente presenti nella mandria e per la conta cellulare dei singoli quarti.

#### RISULTATI E CONCLUSIONI

L'azienda è caratterizzata da una gestione ottimale, con elevato grado di pulizia e di attenzione verso gli animali nelle fasi più delicate. All'entrata in azienda, sono state campionate 5 manze "minus" e 5 "plus" (una delle quali eliminata la settimana successiva).

Nel primo prelievo (situazione di omeostasi) non si sono evidenziate differenze significative fra le due classi di animali, né dal punto di vista cellulare, né dei parametri dell'immunità innata, né dell'espressione citochinica, quest'ultima praticamente assente.

Nel corso dello studio hanno partorito tutti gli animali, in un arco di tempo compreso fra novembre e aprile. I valori dell'emocromo sono risultati sempre nella norma, pur con qualche variazione intorno al parto. Il rapporto neutrofili/linfociti si è mantenuto nei range fisiologici, così come il rapporto CD4+/CD8+, con valori compresi fra 1,3 e 3,3 e quindi all'interno dei range di normalità. Anche i valori relativi all'apoptosi linfocitaria sono rimasti quasi invariati e omogenei fra animali "minus" e "plus".

L'attività battericida del siero è risultata mediamente più stabile nel gruppo "plus" e con valori leggermente più elevati rispetto al "minus". Al contrario, sia il NAGase, sia il lisozima hanno evidenziato risultati diversi fra i 2 gruppi, mediamente più elevati nelle vacche "plus", ma con andamenti molto diversificati fra un animale e l'altro.

L'espressione di citochine si è mostrata generalmente molto bassa: solo



IL-1 ha evidenziato un'aumentata espressione in 2 vacche "plus" e 2 "minus" prima del parto. Inoltre 2 animali "minus" hanno manifestato un innalzamento nel prelievo dopo il parto. Dato che IL-1 è una citochina pro-infiammatoria, questo dato sembra indicare uno stato di maggiore stress nelle vacche "minus".

Infine, l'esame dei valori della conta cellulare negli animali che hanno partorito (2-4 mesi di lattazione) ha evidenziato valori di cellule somatiche sempre molto bassi,  $\leq 100.000$ , sia nelle vacche "minus" che nelle "plus", indicando un'ottima situazione sanitaria della mandria nel suo complesso. Anche i risultati dell'esame batteriologico hanno confermato la totale assenza di patogeni contagiosi e una percentuale estremamente esigua di infezioni da batteri ambientali.

Nella seconda fase dello studio, sono state incluse nel disegno sperimentale ulteriori 9 aziende, scelte per possedere un sufficiente numero di animali plus- e minus-varianti per il carattere oggetto della ricerca. Sono state campionate complessivamente 113 vacche, prelevando il latte dei singoli quarti durante la mungitura serale, oltre al sangue.

Sulla base dei dati raccolti nella fase preliminare dello studio, è stato scelto di effettuare la sola determinazione del NAGase su tutti i campioni, in quanto marker aspecifico di infiammazione. Inoltre si tratta di un'analisi semplice, poco costosa e che non richiede una particolare conservazione del campione. Parallelamente sono stati raccolti i dati relativi alla produzione e alle cellule somatiche degli ultimi 7 mesi di lattazione di tutti gli animali campionati, come indice indiretto della presenza di mastiti subcliniche, in quanto in presenza di un processo infiammatorio diminuisce la produzione di latte e aumenta il contenuto delle cellule somatiche.

I dati sono stati analizzati con la procedura GLM di SAS 9.2 (SAS Institute Cary NC), considerando come fattori l'azienda, l'indice *breeder-wise* (Scs) e la loro interazione. Come variabili risposta sono stati considerati i valori di NAGase nel sangue e nel latte (quarti singoli e media dei quattro quarti); la produzione media; il contenuto cellulare medio, previa trasformazione logaritmica per normalizzare i dati, dei 7 controlli funzionali considerati. Il livello di significatività è stato posto a  $P=0,05$ .

Dall'analisi dei risultati riguardanti l'attività NAGasica nel sangue, sono emerse differenze statisticamente significative legate al fattore azienda e all'indice Scs. Infatti le 9 aziende hanno mostrato valori medi fra loro differenti ( $P<0,0001$ ), confermando ancora una volta l'influenza determinante della gestione sulla risposta immunitaria e infiammatoria degli animali.

Inoltre nelle vacche “minus” è stata riscontrata un’attività NAGasica significativamente superiore rispetto alle vacche “plus”, dimostrando la presenza di un maggiore livello dell’enzima negli animali “minus”, a differenza dei “plus”.

I dati emersi nella valutazione del sangue non hanno però trovato alcuna rispondenza a livello di latte. Infatti non è stato possibile evidenziare alcuna differenza significativa fra vacche con diverso indice *breeder-wise*, né quando è stato considerato il singolo quarto, né esaminando la media dei quattro quarti.

L’analisi dei dati produttivi ha individuato una differenza significativa solamente fra le aziende, ma indipendentemente dall’indice genetico considerato. In questo caso dunque il livello produttivo non è correlato con la presenza di un’infezione mammaria, quanto piuttosto con la gestione e, con ogni probabilità, con la nutrizione.

Infine, il contenuto cellulare medio nel corso della lattazione ha mostrato differenze significative fra vacche “minus” e “plus”: in particolare, le prime hanno evidenziato valori cellulari medi superiori. Nel modello statistico utilizzato, è risultata significativa anche l’interazione fra l’azienda e l’indice Scs. Anche in questo caso, come per il dato produttivo, parte della variabilità del contenuto in cellule somatiche è ascrivibile al management aziendale.

In conclusione, dai dati ottenuti nel corso dello studio, pur essendo presenti variazioni significative nel contenuto medio di cellule somatiche e di NAGase, tali variazioni non sono tali da confermare una correlazione diretta fra variabilità genetica e risposta immunitaria dell’animale, anche alla luce delle significative interazioni con il fattore “azienda” e anche perché l’immunità della mammella è un fenomeno molto complesso, che coinvolge non solo i leucociti, ma anche le cellule epiteliali.

#### COLLABORATORI DELLA RICERCA

Alfonso Zecconi (Professore ordinario)  
 Paola Dall’Ara (Professore associato)  
 Renata Piccinini (Ricercatore)  
 Piera Anna Martino (Ricercatore)  
 Federica Riva (Ricercatore)  
 Beatrice Bignami (Dottorando)  
 Francesco Servida (Collaboratore esterno)

PRODOTTI

TRASFERIMENTO

Conoscenze trasferibili alle associazioni allevatori bovini da latte e ai centri genetici bovini da latte

BREVETTI

PUBBLICAZIONI



ELISA PIERAGOSTINI\*

## Resistenza alle malattie trasmesse da zecche nei piccoli ruminanti\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

Le malattie trasmesse da zecche (*TBD*<sup>1</sup>) costituiscono un complesso di diverse patologie ad eziologia protozoaria, batterica o virale e, nei paesi in cui sono enzootiche, rappresentano il maggiore ostacolo ad una efficiente produzione del bestiame (Stoltz, 1994). L'ipotesi investigativa del progetto è basata sul fatto che gli animali da reddito autoctoni pugliesi, come quelli originari delle regioni del sud Italia, sono meno suscettibili a dette malattie rispetto a razze originarie di regioni settentrionali (Pieragostini and Petazzi, 1999) e che questo fenomeno sembra imputabile alla costante pressione selettiva dei parassiti trasmessi dalle zecche (*TBP*<sup>2</sup>) e di cui uno dei risultati manifesti potrebbe essere l'elevato polimorfismo a carico del sistema genetico dell'emoglobina (HB) osservato in dette razze (Pieragostini et al., 2003; Pieragostini et al., 2006). Questa ricerca si è posta l'obiettivo di colmare la lacuna di assenza di indagini documentate circa la valutazione della differenza di suscettibilità alle *TBD* nelle razze ovine e di un eventuale riscontro del possibile coinvolgimento del sistema HB.

### MATERIALE E METODOLOGIE

Sono state eseguite le seguenti procedure:

\* Università di Bari, Dipartimento di Progettazione e gestione dei sistemi agro-zootecnici e forestali

\*\* Unità di ricerca Università di Bari, responsabile scientifico prof.ssa Elisa Pieragostini

<sup>1</sup> *TBD*= Tick borne diseases

<sup>2</sup> *TBP*= Tick borne parasites

1. Ricerca parassiti mediante metodi di microscopia, sierologia ed analisi molecolari.
2. Scelta di soggetti portatori del parassita più frequente nella popolazione da utilizzare come serbatoio per il recupero di sangue infetto.
3. Splenectomia di 3 soggetti portatori di *Anaplasma (A.) ovis* e conseguente periodico (bisettimanale) monitoraggio clinico e clinico-laboratoristico con controllo della parasitemia.
4. Prelievo di sangue infetto al momento del picco della parasitemia.
5. Infezione sperimentale con *A. ovis* mediante inoculazione di sangue infetto in agnelli di razza Suffolk e Comisana e in quelli di razza Altamurana; monitoraggio clinico e clinico-laboratoristico dei soggetti infettati.
6. Identificazione polimorfismi genetici (loci alfa e beta globinici) negli animali infettati mediante tecniche elettroforetiche e cromatografiche.
7. Analisi dei dati ai fini della valutazione quali-quantitativa della risposta all'infezione sperimentale e per la verifica dell'associazione tra i geni emoglobinici ed il pattern ematologico.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

### *Epidemiologia dei TBP negli ovini in Puglia*

I risultati della nostra ricognizione dei TBP ha portato ad individuare l'*A. ovis* come parassita prevalente, identificato nel 90% dei campioni, seguito da *Theileria (T.) ovis* (45%) e *T. lestoquardi* (8%). Sia *T. ovis* (45%) che *T. lestoquardi* erano presenti in infezioni miste con l'*A. ovis*. È noto però, che tutte le generalizzazioni ottenute da un campionamento non probabilistico devono essere filtrate attraverso la conoscenza del tema oggetto di studio ed in questo caso i risultati ottenuti vanno a dettagliare precedenti osservazioni. In particolare, un precedente lavoro condotto sulla razza ovina Gentile di Puglia aveva consentito di constatare, attraverso l'indagine microscopica sugli strisci ematici, una positività del 93% di parassiti emotropici trasmessi da zecche (TBP) tra i quali l'*Anaplasma spp.* rappresentava una costante (Pieragostini et al., 2006).

### *Valutazione della suscettibilità di razze ovine ai TBP*

Il confronto fra razze riguardo alla diversa suscettibilità e di conseguenza rispetto alla diversità di risposta quali-quantitativa di fronte ad un patogeno

RAZZE	N	DOSE INFETTANTE	SINTOMATOLOGIA	NECESSITÀ DI INTERVENTO TERAPEUTICO	MORBILITÀ	MORTALITÀ PRESUNTA
SUFFOLK	8	36%	Gravissima	7 soggetti su 8	100%	87.5%
COMISANA	8	36%	Media	1 soggetto su 8	100%	12.5%
ALTAMURANA	18	60%	Lieve	nessuno	100%	0%

Tab. 1. *Sintesi della risposta all'anaplasmosi nelle tre razze esaminate*

di comune riscontro quale l'*A. ovis* ci ha consentito di valutare in maniera concreta alcuni aspetti spesso poco considerati nella pratica di allevamento, aspetti che prescindono dalla valenza territoriale di storia ed adattamento dei diversi animali. La nostra sperimentazione ha comportato la infezione di, complessivamente, 34 ovini di età inferiore ai 3 mesi, maschi e femmine, che non avevano avuto precedenti incontri con parassiti ematropici, e di razze diverse (in particolare 8 Suffolk, 8 Comisane, 18 Altamurane) per valutare se fosse possibile mettere in evidenza nelle tre razze citate una differente sensibilità alla infezione, misurata in termini quanti-qualitativi temporali, clinici ed ematologici, nonché di relazioni tra i polimorfismi genetici (loci  $\alpha$  e  $\beta$  globinici) e la risposta alla malattia.

Sono risultate le seguenti evidenze:

- I. tutti gli animali di tutte le razze, in tempi diversi, ma con modesta variabilità entro razza, contraggono e sviluppano la malattia;
- II. i momenti cruciali che consentono di evidenziare le differenze tra le razze sono la comparsa della sintomatologia e la fase del recupero;
- III. l'infezione decorre nelle tre razze con gravità decrescente a partire dalla Suffolk fino alla Altamurana.

In particolare, la suscettibilità conclamata della Suffolk si traduce in una anemia a comparsa improvvisa e violentissima con abbattimento ed inappetenza che, senza supporti terapeutici intensi, avrebbe come conseguenze una mortalità elevatissima (Tab.1). Anche nella Comisana la malattia si manifesta con sintomatologia relativamente grave, ma l'anemia ha però una comparsa lenta senza variazioni apprezzabili delle cenestesi, accompagnata da alcuni giorni di inappetenza, ma seguita da una guarigione spontanea anche senza interventi (Tab.1).

Il maggior livello di tolleranza nei confronti dell'anaplasmosi è indubbiamente quello dimostrato dagli agnelli Altamurani, i quali, nonostante la dose infettante di *A. ovis* fosse quasi doppia rispetto alla sperimentazione precedente, hanno mostrato una insorgenza della malattia torpida, protratta nel tempo con poche variazioni ematologiche, lente ad instaurarsi e relativamente lente a risolversi, con variazioni pressoché nulle nel comportamento e nelle

grandi funzioni organiche (Tab.1). Va inoltre rilevato che, dopo la scomparsa degli episodi acuti iniziale, a distanza di alcune settimane, nei gruppi Suffolk e Comisana sono state osservate ricadute della malattia, non riscontrate nel gruppo delle Altamurane.

Queste osservazioni, in buona sostanza ribadiscono la complessità della infezione-evoluzione delle *TBD*, realizzandosi nei fatti una situazione mista nella quale intervengono certamente elementi *non self* quali la patogenicità del parassita, come pure elementi propri che non sono sicuramente di tipo immunologico, almeno in senso stretto. La difficoltà di valutazione della risposta immunologica è anche legata al fatto che l'evoluzione della parassitemia subisce variazioni indefinibili, condizionate dalla attività fagocitaria della milza che, forse, nelle razze alloctone reagisce in maniera poco modulata, eliminando in maniera drammatica gli eritrociti opsonizzati ed inducendo una anemia mortale. L'anemia tipica delle razze alloctone è quindi violenta ed improvvisa, mentre nelle razze autoctone sembra essere più modulata, consentendo probabilmente l'instaurarsi di meccanismi compensativi estremamente efficienti. La risposta immunologica specifica, in grado di fornire un buon livello di resistenza si realizza solo ad una distanza di tempo maggiore rispetto al momento della comparsa del picco di anemia ed è possibile solo nei soggetti che, nella fase acuta iniziale, esibiscono una tipologia di risposta macrofagica più moderata nei riguardi dei parassiti.

#### *Individuazione di geni interessati alla suscettibilità ai TBP negli ovini*

L'indagine territoriale per la ricognizione dei *TBP*, aveva consentito anche uno screening di popolazione alla ricerca di soggetti caratterizzati da genotipi alfa e beta globinici diversi. In particolare nel corso della prima infezione sperimentale i soggetti Suffolk e Comisana avevano tutti lo stesso arrangiamento alfa globinico, ma diverso genotipo beta globinico. L'analisi delle relazioni tra il genotipo beta globinico e la risposta all'infezione ha permesso di concludere che nei soggetti portatori dell'aplotipo beta A il recupero dalla malattia è più lento rispetto ai portatori dell'aplotipo B, il che consente di arguire che, in condizioni naturali, in caso di sintomatologia grave, questa differenza potrebbe costituire discriminare fra la vita e la morte.

Nella seconda infezione sperimentale sono stati messi a confronto soggetti di razza Altamurana di cui 9 con assetto alfa globinico normale (duplicato) ed altrettanti con assetto soprannumerario (triplicati e quadruplicati). La modesta risposta all'infezione non ha reso possibile evidenziare differenze significative di comportamento associabili al diverso arrangiamento genico.



## BIBLIOGRAFIA

- Stoltz WH. (1994) In: Infectious diseases of livestock, 2nd ed. Coetzer JAW Thomson GR & Tustin RC (eds). Oxford University Press, Oxford, pp.431-438.
- Pieragostini E & Petazzi F. (1999): *Parassitologia* 41(1), 89-94
- Pieragostini E et al. (2003): *Gen.Sel.Evol.* 35(1), 121-133.
- Pieragostini E et al. (2006): *J Anim Breed Genet*, 123, 122-30.

## COLLABORATORI DELLA RICERCA

Petazzi Ferruccio (Professore ordinario)  
 Rubino Giuseppe (Ricercatore)  
 Lacinio Rosanna (Tecnico)  
 Alloggio Ingrid (Assegnista)

## COLLABORAZIONI ESTERNE

Di Benedetto Nicola (Medico veterinario e allevatore)  
 de Ruvo Giuseppe (Medico veterinario)  
 Alessandra Torina (Ricercatore IZS di Palermo, responsabile del Centro Nazionale di Referenza per Anaplasma, Babesia, Rickettsia e Theileria.)

## PRODOTTI

- Definizione del fenotipo malattia: anaplasmosi in ovini di razza Suffolk, Comisana e Altamurana

## TRASFERIMENTO

Indicazioni sulla suscettibilità di alcune razze ovine ai patogeni trasmessi da zecche (*TBP*). Possibile ruolo del genotipo emoglobinico sulla suscettibilità ai *TBP* e conseguenti indicazioni per la scelta dei riproduttori

Per soggetti eterozigoti AB al locus beta globinico (HBB), dal confronto con gli altri Suffolk BB è stato possibile verificare un significativo effetto peggiorativo sia sull'entità dei sintomi al momento della comparsa della malattia che nel tempo di recupero.

Considerando che nella razza Suffolk il gene sfavorito HBBA è molto frequente, ove si voglia allevare questa razza in ambiente mediterraneo si suggerisce di selezionare arieti omozigoti BB.

Considerando il riscaldamento globale e la probabile diffusione dei *TBP* in aree a latitudine progressivamente più alte, questo suggerimento andrebbe considerato anche nella scelta degli arieti delle nostre razze settentrionali.

## PUBBLICAZIONI

- 1) LOIZZO P., TRANI A., PIERAGOSTINI E. (2010): *Primi risultati di proteomica clinica nell'anaplasmosi negli ovini: analisi comparata di mappe bidimensionali delle proteine seriche*, in Atti del XIX Congresso Società Italiana di Patologia e di Allevamento degli Ovini e dei Caprini, Pesaro, 22 al 25 settembre 2010, vol. 19.
- 2) PETAZZI F., ALLOGGIO I., RUBINO G., BRAMANTE G., PIERAGOSTINI E. (2010): *Rilievi clinici in ovini infettati sperimentalmente con Anaplasma ovis*, in Atti del XIX Congresso della Società Italiana di Patologia e di Allevamento degli Ovini e dei Caprini, Pesaro, 22 al 25 settembre 2010.
- 3) PIERAGOSTINI E., DE RUVO G., ALONGI A., SCIMECA S., TORINA A. (2010): *Parassiti degli ovini trasmessi da zecche: osservazioni epidemiologiche in Puglia*, in Atti del XIX Congresso della Società Italiana di Patologia e di Allevamento degli Ovini e dei Caprini), Pesaro, 22 al 25 settembre 2010, vol. 19.
- 4) LOIZZO P., TRANI A., ALLOGGIO I., PETAZZI F., PIERAGOSTINI E. (2010): *Preliminary results from clinical proteomic investigations of anaplasmosis in sheep*, in XVIII FeMeSPRum, Durazzo, May 26-29, vol. 18.
- 5) ALLOGGIO I., DE RUVO G., TORINA A., CAROLI A., PETAZZI F., PIERAGOSTINI E. (2009): *Reversible switch from hemoglobin A to C in sheep and recovery from anemia following experimental infection with Anaplasma ovis*, in Associazione Scientifica di Produzione Animale XVIII Congresso nazionale, Palermo, 9-12 giugno 2009, ISBN/ISSN: 1594-4077.
- 6) PETAZZI F., RUBINO G., DE RUVO G., LACINIO R., TORINA A., PIERAGOSTINI E. (2009): *Anaplasmosis in splenectomized tolerant sheep*, in 17° International Congress FeMeSPRum, Perugia, 27-30 May 2009 .
- 7) PETAZZI F., DE RUVO G., ALLOGGIO I., RUBINO G., ALONGI A., TORINA A., PIERAGOSTINI E. (2009): *Clinical findings in susceptible and tolerant sheep after experimental infection with Anaplasma ovis*, in 17° International Congress FeMeSPRum, Perugia, 27-30 May 2009.
- 8) TORINA A., PIERAGOSTINI E., ALONGI A., SCIMECA S., DAGOSTINO R., CITO A.M., CARACAPPA S. (2009): *Serologic and Biomolecular Survey of Domestic Animals for Zoonotic Tick Borne Pathogens*, in International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2009), Vienna, Austria, February 13-16, 2009, p. 78.
- 9) PETAZZI F., RUBINO G., ALLOGGIO I., BRAMANTE G., PIERAGOSTINI E. (2008): *Sheep welfare related to farm husbandry and management in Murgia hill areas (Central Apulia and Basilicata - Southern Italy)*, in *Strategie delle filiere latte nel bacino del Mediterraneo*, Bari, 16-17 september 2008, vol. 3.
- 10) PIERAGOSTINI E., ALLOGGIO I., DE RUVO G., RUBINO G., PETAZZI F. (2008): *Genetical markers of resilience to tick borne diseases (TBD) - A research project for the improvement of sheep breeding and management strategies*, in *The effect of herd health of cattle, sheep and goat on production efficiency*, Zadar, Croatia, April 22-26, 2008, vol. 16, pp. 157-159.
- 11) PIERAGOSTINI E., ALLOGGIO I., DE RUVO G., RUBINO G., PETAZZI F. (2008): *Understanding the mechanisms of resilience to tick borne diseases (TBD) in sheep*, in *Strategie delle filiere latte nel bacino mediterraneo*, Bari, 16-17 september 2008, vol. 3.

Unità operativa formazione per le strutture  
di miglioramento genetico



## Relazione del coordinatore

### LINEA DI RICERCA

Questa Unità Operativa si differenzia dalle altre del Progetto Selmol per avere come suo obiettivo principale la formazione del personale e dei tecnici delle Associazioni facenti parte dell'Organizzazione degli Allevatori. Inoltre non è un'Unità Operativa articolata in più Unità di Ricerca come le altre UO del Progetto.

L'obiettivo della sua costituzione è stato quello di diffondere nel mondo operativo della selezione, che viene condotta istituzionalmente dalle Associazioni Nazionali Allevatori di Razza o di Specie, le nuove tecnologie e i nuovi approcci che sono oggi disponibili per il miglioramento genetico delle razze domestiche allevate. L'UO ha focalizzato quindi la sua attività verso questo obiettivo attraverso l'organizzazione di incontri col personale dell'Organizzazione degli Allevatori e producendo uno specifico materiale didattico di facile e immediata comprensione che consentisse un accesso informale e scientificamente corretto alle metodologie molecolari oggi in esplosivo sviluppo.

A conclusione del Progetto si può certamente dire che, seppure con gradi diversi di percezione, oggi il personale tecnico delle Associazioni ha una consapevolezza totalmente diversa delle potenzialità che la selezione genomica ha aperto nel miglioramento genetico. Il Progetto ha certamente avuto un effetto importante nello smuovere un comparto anche difficile e questa UO ha dato un contributo

\* *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare*

concreto nel fornire ai tecnici gli strumenti conoscitivi di scienza e dottrina necessari a valutare appieno l'utilità delle più moderne tecnologie selettive.

#### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI

L'attività selettiva ordinaria si sviluppa da anni seguendo i principi generali della cosiddetta genetica quantitativa. Il modello di riferimento è quello infinitesimale che descrive i fenotipi misurati sugli animali domestici come somma di una componente genetica e di una ambientale.

Le tecniche di genetica molecolare per la selezione genomica appaiono a prima vista molto meno accessibili. Gli strumenti e i luoghi di lavoro sono diversi, il vocabolario scientifico cambia, gli esperti di queste tecnologie hanno spesso una formazione strettamente biologica e di fatto due realtà che avrebbero bisogno l'una dell'altra, faticano a incontrarsi.

L'obiettivo di questa unità operativa è stato quello di mettere i tecnici e i responsabili della selezione, nelle condizioni di capire il linguaggio e le logiche della genetica molecolare, cosa questa sia in grado di produrre, e sviluppare un senso critico che permetta di elaborare autonomamente una valutazione precisa della utilità e applicabilità in campo di quanto il genetista molecolare propone.

#### MATERIALI E METODOLOGIE

In un mondo in cui l'apprendimento è sempre più affidato alla forza delle immagini, è stato abbastanza facile per l'UO scegliere lo strumento del filmato didattico per far arrivare direttamente al personale tecnico delle Associazioni un messaggio complesso che richiederebbe una discreta formazione preliminare di base e soprattutto un impegno di studio dedicato non trascurabile.

Sono stati così realizzati tre filmati in video animazione che sono stati presentati in tre incontri annuali destinati proprio alla formazione del personale delle strutture di miglioramento genetico. Gli incontri si sono svolti a Salomaggiore (PR) nelle estati del 2008, 2009 e 2010. Gli argomenti presentati sono stati nei tre anni: *Elementi di genetica di base*, *Tecnologie innovative di genotipizzazione* e *Principi di Selezione Genomica*. A questi tre argomenti, che coprono tutta la materia necessaria a comprendere la teoria e la pratica della selezione su base molecolare, si aggiunge un *Glossario*, sempre in animazione, dei principali concetti presentati. La durata complessiva è di 1 ora e 16 minuti di filmato.

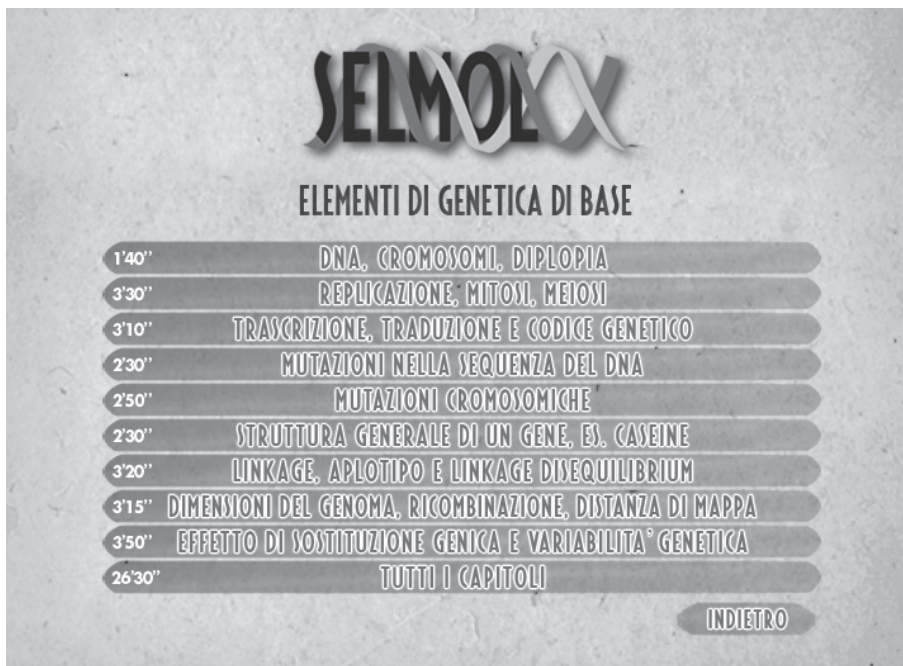


Fig. 1

## RISULTATI E CONCLUSIONI

### *Primo anno, 2008*

L'attività formativa si è svolta a Salsomaggiore (PR) dal 30 giugno al 3 luglio ed è stata caratterizzata da due cicli completi, ciascuno di due giorni, dedicati ai tecnici del comparto latte (il primo) e del comparto carne e cavalli (il secondo). L'attività formativa è stata curata dal Prof. Pagnacco mentre quella di vero e proprio trasferimento ha coinvolto tutti i principali attori operanti nelle diverse UO e SUO del progetto.

La parte di formazione ha sviluppato i seguenti argomenti che sono stati trattati e illustrati con l'aiuto di uno speciale supporto informatico in video animazione appositamente realizzato per il Progetto della durata complessiva di 26' e 30".

Per quanto attiene alla parte trasferimento dei risultati l'organizzazione ha previsto un'intera giornata (1 luglio) dedicata al comparto latte e un'altra intera giornata dedicata al comparto carne e cavalli (3 luglio).

Nel corso del primo anno questa UO ha anche elaborato un logo visibile in tutti i prodotti elaborati dal Progetto Selmol.

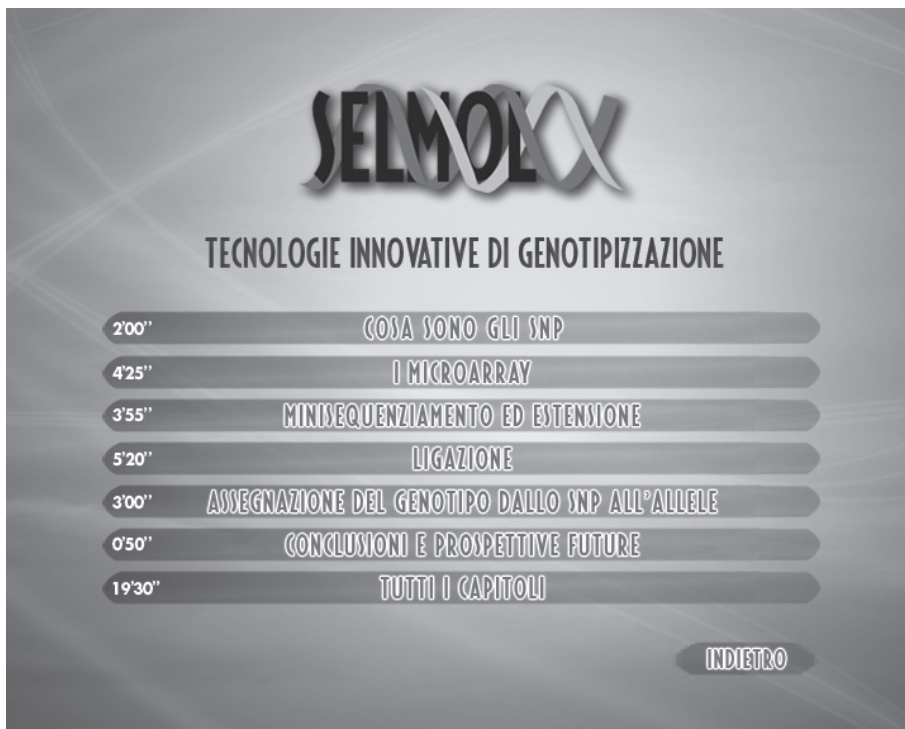


Fig. 2

### *Secondo anno, 2009*

Nel 2009 si è replicata l'iniziativa con un nuovo e avanzato programma di formazione centrato sugli strumenti per realizzare la Genomic Selection. Il modello di trasferimento realizzato nel 2008 è sembrato infatti riproponibile, seppure con alcuni miglioramenti. L'argomento sviluppato è stato quello dei Sistemi Highthroughput per la genotipizzazione animale (durata 19' e 30") che è stato sviluppato sempre a Salsomaggiore (PR) nelle giornate del 25 e 26 giugno con il prezioso contributo didattico della Dr. Stefania Chessa.

Con l'occasione è stato anche distribuito ai partecipanti un secondo CD contenente tutte le presentazioni scientifiche che hanno arricchito l'incontro di formazione

### *Terzo anno, 2010*

Nel 2010, sempre a Salsomaggiore nelle giornate del 1 e 2 luglio, è stata realizzata la terza e ultima sessione di formazione del Progetto con la presen-



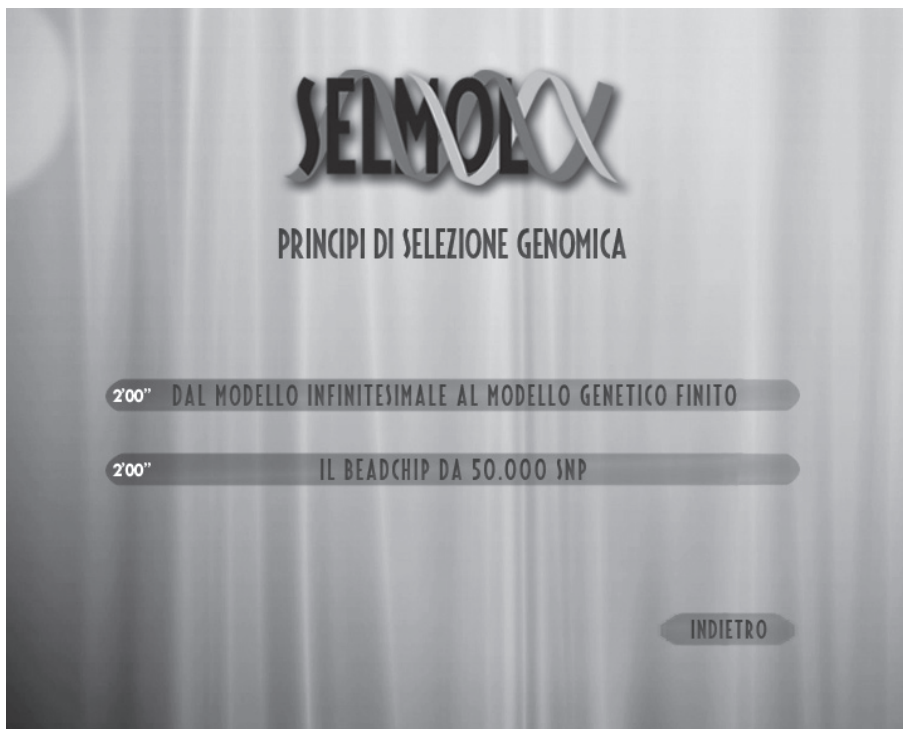


Fig. 3

tazione del terzo DVD articolato in due parti: una specificamente dedicata al significato e alla logica della Selezione Genomica e la seconda articolata in 20 voci di Glossario (17' e 30"). Come ormai tradizione l'incontro si è esteso con un articolato dibattito che ha coinvolto tutte le specie interessate dall'attività del Progetto Selmol con l'intendimento di puntualizzare anche i punti finali e applicativi per il miglioramento genetico delle popolazioni zootecniche.

Il contenuto dei tre capitoli trattati nei tre anni e del glossario sono stati riversati in un unico DVD che insieme al CD contenente il testo scritto del DVD e tutte le presentazioni scientifiche illustrate dai ricercatori del Progetto dei tre incontri di Salsomaggiore, costituiscono il prodotto conclusivo di questa UO che viene allegato al presente volume costituendone parte integrante.

Questa UO ha partecipato inoltre, nel corso dell'ultimo anno di progetto, a tutte le riunioni organizzate dal Coordinatore con le diverse Associazioni di razza e di specie aventi lo scopo di coniugare i più importanti ritrovati scientifici con le aspettative di miglioramento dei piani operativi di selezione in campo.



Fig. 4

## COLLABORATORI DELLA RICERCA

Stefano Moro (Assegnista)

Stefania Chessa (Ricercatore)

Bianca Castiglioni (Ricercatore CNR-IBBA)

## PRODOTTI - TRASFERIMENTO

- Logo del progetto
- Cofanetto contenente un DVD coi filmati realizzati nei tre anni di progetto e un CD contenente tutte le presentazioni scientifiche illustrate dai ricercatori del Progetto Selmol nelle giornate di formazione di Salsomaggiore 2008-2010.
- Tre incontri tecnici stanziali per complessive 8 giornate dedicate alla formazione e alla divulgazione degli obiettivi, metodologie e risultati del progetto.

## Conclusioni

Selmol è stato un progetto articolato in numerose linee di ricerca che hanno impiegato le più moderne tecniche di indagine. Le Unità di Ricerca hanno collaborato con le Associazioni Nazionali Allevatori delle 7 specie animali studiate, raffrontandosi nella scelta degli elementi di prioritario interesse da indagare ai fini del miglioramento genetico di numerose razze allevate. Oggettivamente è stata una realizzazione complessa e impegnativa, che ha avuto il merito di adottare un modello di tipo interdisciplinare in collaborazione diretta con gli operatori; un metodo di lavoro se non originale, certamente innovativo per un progetto così ampio in ambito zootecnico.

Sono stati raggiunti i risultati attesi?

Rispondere a questa domanda da parte di chi è stato coinvolto nella ricerca implica il giusto sospetto di autoreferenza. Comunque, sia pure in attesa di più oggettive valutazioni, l'analisi dei risultati, sintetizzati nelle relazioni delle UR riportate in questo volume, si ritiene possa condurre, senza enfasi, a una risposta positiva. Questa affermazione è supportata sia dalla moltitudine di marcatori genetici utilizzati (e dai modelli originali del loro impiego nella selezione genomica), sia dal gran numero di nuovi geni candidati individuati (complessivamente circa 1500) riferiti ai caratteri di prioritario interesse zootecnico, relativi alla capacità produttiva, alla qualità, proprietà e tracciabilità dei prodotti, alla resistenza degli animali ad alcuni tipi di stress e di patologie, nonché dal numero di protocolli, “pipeline” informatiche, tecnologie, mo-

\* *Coordinatore, Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento di Produzioni Animali*

delli e software messi a punto. Alcuni di questi sono già stati trasmessi alle Associazioni e resi operativi. Selmol ha costituito anche occasione concreta di sviluppo di ricerca interdisciplinare, particolarmente tra le Unità impegnate nella conoscenza delle basi genetiche che regolano i processi fisiologici di risposta allo stress o di resistenza alle patologie.

Ma sono risultato qualificante del progetto anche i 48 lavori già pubblicati su riviste scientifiche con IF e i 50 circa in fase di stesura, nonché le oltre 80 relazioni presentate a importanti Congressi internazionali. L'insieme di questi prodotti ha dato un considerevole contributo all' apprezzamento della ricerca italiana di settore in ambito internazionale.

Infine anche l'esperienza fatta dai tanti giovani ricercatori (circa 90) che hanno collaborato, a vario titolo, è un risultato tangibile del progetto.

Le nuove acquisizioni fanno nascere comunque una fondamentale domanda: come si pongono i risultati ottenuti nei riguardi della selezione in atto?

I nuovi metodi di indagine e i risultati che questi forniscono non sostituiscono gli schemi tradizionali, ma li integrano, velocizzando il miglioramento genetico e ampliando gli obiettivi di selezione. Su questo concorda, oggi, gran parte dei ricercatori, almeno nelle previsioni di medio periodo. Non mancano ricercatori ed enti commerciali che presagiscono, invece, tempi brevissimi per l'abbandono dei metodi "tradizionali", con superamento anche degli attuali sistemi organizzativi. Le conoscenze acquisite, la padronanza delle stesse da parte delle Associazioni e il trasferimento in tempi brevi negli schemi di selezione dei risultati utili, uniti a una corretta formazione dei tecnici e informativa agli allevatori, possono costituire elementi determinanti sia per la difesa da rischiosi "allettamenti" commerciali, sia per guidare la innovazione direttamente e correttamente da parte delle Associazioni responsabili della selezione.

Per queste ragioni la conoscenza delle metodologie della genetica molecolare e la consapevolezza delle potenzialità e dei limiti delle stesse da parte delle Associazioni e delle Amministrazioni interessate al miglioramento genetico animale sono da considerare un ulteriore merito del progetto.

Così come è merito del progetto aver dato un contributo determinante a recuperare il divario che si era formato nella ricerca di settore verso l'Europa e il Nord-America, nonché ad annullare quasi il ritardo nella introduzione della selezione genomica negli schemi selettivi dei bovini, che si era formato rispetto alle zootecnie più avanzate.

I risultati di Selmol aprono interessanti prospettive anche per una più completa conoscenza del genoma delle razze a limitata diffusione e per la caratterizzazione dei loro prodotti, contribuendo così al mantenimento della

biodiversità e alla salvaguardia dei territori a rischio.

Più in generale i risultati del progetto oltre a essere utili per l'allevamento potranno portare benefici al consumatore rispetto a qualità, salubrità e tracciabilità dei prodotti, con effetti positivi sul mercato e l'economia.

Infine il network di ricercatori e associazioni, che di fatto è stato promosso da Selmol, può costituire, se non nella sua interezza sicuramente nelle componenti più attive e collaborative, una struttura qualificata e collaudata per supportare il trasferimento, ampliare le conoscenze, promuovere, in ambito nazionale e soprattutto internazionale, nuovi progetti indirizzati a obiettivi di ricerca finalizzati a una zootecnia sostenibile che ripaghi l'allevatore e soddisfi il consumatore.

Da ultimo un ringraziamento sentito al MIPAAF e al CRSA che hanno dato gli strumenti per la attuazione del progetto, a quanti hanno profuso impegno e capacità nella realizzazione delle ricerche, alle Associazioni allevatori per la disponibilità a collaborare, al personale amministrativo che ha risolto i non sempre semplici aspetti contabile-gestionali, al Caspur per il contributo nella gestione informatica, ai collaboratori del coordinamento per il lavoro svolto nel continuo monitoraggio dei molteplici aspetti de progetto.

*Il Coordinatore  
Alessandro Nardone*



GIUSEPPE BLASI\*

## Postfazione

Compito fondamentale del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali è promuovere lo sviluppo delle attività e delle imprese agricole del Paese. Tale impegno ha il fine di garantire la disponibilità, la sicurezza e la qualità dei prodotti alimentari al consumatore e il reddito al produttore, nel rispetto dell'ambiente e della biodiversità.

Tra gli strumenti dei quali il Ministero si avvale per raggiungere tali obiettivi la ricerca scientifica può rappresentare uno degli elementi più determinanti di innovazione, di progresso e di competitività dell'intero sistema agro-zootecnico del Paese.

È questo il quadro entro il quale il Ministero ha finanziato il progetto Selmol, dedicato alla "Ricerca e innovazione nelle attività di miglioramento genetico animale mediante tecniche di genetica molecolare per la competitività del sistema zootecnico nazionale".

È nota la carenza cronica dell'Italia per molti prodotti zootecnici e la incompletezza strutturale in diversi settori, dovute sostanzialmente a limitazioni di ordine naturale. Così come è riconosciuta la eccellenza raggiunta in diversi settori della zootecnia nazionale, con la quale è possibile sopperire, anche se solo parzialmente, alle limitazioni naturali del Paese.

L'attività di selezione che viene condotta su alcune delle specie animali allevate rappresenta sicuramente una di queste eccellenze. Il valore genetico dei riproduttori di diverse razze italiane è di fondamentale supporto alla

*\* Direttore Generale della Competitività per lo Sviluppo Rurale, MIPAAF*

produzione di prodotti zootecnici italiani, affermati nel mercato nazionale e internazionale, che danno un contributo determinante al marketing del “made in Italy” nel mondo.

È quindi di vitale importanza, per l'intero comparto zootecnico del Paese, sostenere la selezione italiana in un quadro internazionale sempre più competitivo, sotto la spinta di promettenti innovazioni prospettate dalle nuove acquisizioni scientifiche nell'ambito della genetica molecolare.

Molti dei risultati presentati dalle Unità di Ricerca del progetto Selmol sono di alto interesse scientifico e vi sono concrete prospettive di utili applicazioni, come già sta avvenendo per la selezione genomica nei bovini o per la selezione del colore dei mantelli nei cavalli. La collaborazione al progetto da parte delle Associazioni Allevatori, prima, e l'attenzione, ora, delle stesse ai risultati ottenuti sono elementi sicuramente positivi, che lasciano ben sperare per una concreta utilizzazione dei risultati ottenuti dalla ricerca finanziata dal Ministero a beneficio della zootecnia italiana e dell'economia del Paese.

Il Ministero, con le Regioni, doverosamente seguirà per quanto di competenza la interessante, e al tempo stesso impegnativa, fase di trasferimento dei risultati.

Per il miglior successo della realizzazione confido nell'impegno delle Associazioni Allevatori a valorizzare i risultati e nella disponibilità dei ricercatori a non far mancare la loro assistenza in futuro.

Il ringraziamento del Ministero e il mio personale a quanti hanno posto il loro impegno nella realizzazione del progetto.

Dr. Blasi Giuseppe  
*D.G. della Competitività per lo  
Sviluppo Rurale*



Integrazione a  
Unità operativa riproduzione stress e malattie



JOHN WILLIAMS\*

## Studio della risposta cellulare alla mastite, studio di geni candidati antibatterici e analisi genome-wide\*\*

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO

La mastite è una patologia molto grave che colpisce la ghiandola mammaria e presenta notevoli ricadute di tipo economico sugli allevatori, in quanto i costi per gli interventi veterinari, la prevenzione della malattia, la ridotta produzione e qualità del latte e, nei casi più gravi, l'eliminazione degli animali infetti, incidono notevolmente sul bilancio aziendale. Diversi fattori contribuiscono alla predisposizione alla malattia, ma le cause sono rappresentate dalla presenza di batteri che determinano lo stato infiammatorio della mammella. L'ingresso del patogeno nella mammella determina infatti la messa in atto di meccanismi di difesa che consistono principalmente nel richiamare i leucociti (cellule somatiche) dal sangue per combattere l'infezione.

Gli obiettivi di questa linea di ricerca sono i seguenti: studio della risposta cellulare alla mastite, studio di geni candidati antibatterici e analisi genome-wide.

### MATERIALE E METODOLOGIE

#### *Studio della risposta cellulare alla mastite*

Da un progetto Europeo pre-esistente (EADGENE) 10 capre primipare di razza Camosciata delle Alpi selezionate per alto e basso contenuto di cellule somatiche, sono state infettate sperimentalmente con *S. aureus* a circa 40 giorni dal parto. Sono stati effettuati prelievi di sangue prima e dopo l'infezione

\* Parco Tecnologico Padano

\*\* Unità di ricerca Parco Tecnologico Padano, responsabile scientifico Dr. John Williams

ad intervalli di sei ore. L'RNA dei leucociti di tutti i prelievi è stato ibridato su microarray custom 90K (Combimatrix). Sono state valutate le differenze di espressione genica tra gli animali plus e minus.

#### *Studio di geni candidati antibatterici*

Per quanto riguarda la ricerca di geni candidati antibatterici sono stati considerati i seguenti: lattoferrina,  $\beta$ -defensina 4, pentrassina 3, interleuchina-10, interleuchina-10 recettore  $\alpha$ , interleuchina-10 recettore  $\beta$  e catelicidina 6. Sono stati genotipizzati 130 tori con EBV estremi per SCC.

#### *Analisi genome-wide*

1183 tori di razza Frisona Italiana indicizzati per SCC sono stati genotipizzati con il BovineSNP50 BeadChip dell'Illumina.

### RISULTATI E CONCLUSIONI

#### *Studio della risposta cellulare alla mastite nelle capre*

I profili dell'espressione genica nelle cellule mononucleate del sangue di 5 capre plus sono stati confrontati con quelli di 5 capre minus a livello di tutti i time point dopo l'infezione sperimentale:

- T0, pre-infection;
- T1, 6 ore post-infection;
- T2, 12 ore post-infection;
- T3, 18 ore post-infection;
- T4, 24 ore post-infection;
- T5, 30 ore post-infection.

L'analisi non ha evidenziato differenze nell'espressione tra il T0, il T1, il T2, il T3 ed il T4.

I primi cambiamenti nell'espressione genica si hanno solo all'ultimo time point, ovvero a 30 ore dall'infezione. 34 geni risultano differenzialmente espressi tra il T0 e il T5 considerando  $Pvalue < 0.01$ .

Di questi 34 geni, 7 (6 up-regolati e 1 down-regolato) hanno il valore di log fold change  $\geq 1.5$ .

Se consideriamo invece,  $Pvalue < 0.05$ , il numero di geni con log fold change  $\geq 1.5$  sale a 10 (9 up-regolati e 1 down-regolato).

Il gene più interessante risulta essere il PTX 3 (pentrassina 3) che ha log fold change più alto ovvero 4.97. Questo gene è appena stato descritto solo in un lavoro, come associato all'infezione da *S. aureus* nei bovini.

I due gruppi (alto e basso SCC) di animali hanno risposto allo stesso modo all'infezione, non esistono infatti differenze d'espressione nemmeno al T5 dove i geni differenzialmente espressi sono gli stessi sia nei plus che nei minus.

I risultati dell'espressione sono in fase di validazione in real time PCR. A tal proposito, sono stati considerati tutti i geni differenzialmente espressi con  $\log \text{fold change} \geq 1.5$  e  $P\text{value} < 0.01$ . La Pentrassina 3 è stata selezionata come gene candidato nello studio di associazione.

#### *Studio di geni candidati antibatterici*

La lattoferrina è stata ampiamente descritta in letteratura ed un lavoro del 2010 di O'Halloran e collaboratori ha trovato che gli SNP nel promotore sono associati alle performance riproduttive e al conteggio delle cellule somatiche. Per il gene della lattoferrina sono stati considerati tre SNPs nel promotore e più precisamente A/C nella regione TATA (Lf-28), G/A nella regione SP1 (Lf-190), C/T nella regione AP2/StafSP1 (Lf-586) e C/T non sinonimo nell'esone 4 (Lf exon4).

Le defensine sono molecole molto interessanti in quanto si suppone che possano proteggere il tessuto della mammella dalla colonizzazione batterica. Purtroppo contrariamente alle aspettative, è stata considerata come gene candidato solo la  $\beta$ -defensina 4, perchè tutte le altre defensine incluse nel lavoro inizialmente presentavano sequenze molto simili tra loro e la ricerca di nuovi SNP mediante sequenziamento non ha dato i risultati sperati. Lo SNP del gene della  $\beta$ -defensina 4 è intronico A/G.

Essendo risultato il gene più differenzialmente espresso nell'esperimento effettuato sulle capre, la pentrassina 3 è stata considerata come gene candidato. Per l'analisi sono pertanto stati considerati tutti gli SNP noti in banca dati, ovvero uno non sinonimo nell'esone 1 G/T e quattro intronici G/T, A/C, A/C e G/T.

Da un lavoro effettuato in Canada su tori indicizzati per il SCC è risultato che il gene per il recettore dell'IL-10 potrebbero essere associato agli EBV degli animali. Gli SNP interessanti che sono stati utilizzati per la nostra genotipizzazione sono i seguenti: T/C nella regione 5' dell'IL-10; A/C, A/G e C/T sinonimi nella regione codificante dell'IL-10R $\alpha$ ; C/T non sinonimo nella regione codificante del TGF- $\beta$ 1 e C/T sinonimo nella regione codificante dell'IL-10R $\beta$ .

Le catelicidine sono dei peptidi antimicrobici coinvolti nell'immunità bovina innata.

È stato considerato lo SNP A/T non sinonimo presente nel secondo esone

SNP NAME	VARIATION	NO. GENOTYPED	CALL RATE	MINOR ALLELE FREQ.	P.1.1	P.1.2	P.2.2	CHR.
IL-10	T/C	121	0.9307692	0.1363636	89	31	1	16
IL-10R $\alpha$	A/C	128	0.9846154	0.1757812	86	39	3	15
PTX3	G/T	130	1	0.1423077	94	35	1	1
PTX3	G/T	121	0.9307692	0.4214876	42	56	23	1
PTX3	A/C	126	0.9692308	0.1349206	93	32	1	1
PTX3	G/T	123	0.9461538	0.1422764	89	33	1	1
IL-10R $\alpha$	A/G	123	0.9461538	0.4065041	47	52	24	15
PTX3	A/C	124	0.9538462	0.06854839	107	17	0	1
Lf-190	G/A	125	0.9615385	0.316	60	51	14	22
IL-10R $\alpha$	C/T	124	0.9538462	0.2338710	73	44	7	27
B-defensin 4	A/G	116	0.8923077	0.1939655	78	31	7	27
Lf-28	A/C	129	0.9923077	0.2015504	85	36	8	22
Lfexon4	C/T	126	0.9692308	0.2023810	85	31	10	22
IL-10R $\beta$	C/T	125	0.9615385	0.208	79	40	6	18
CATHL6	C/T	130	1	0	130	0	0	22
Lf-586	C/T	126	0.9692308	0	126	0	0	22

Tab. 1

del gene della catelicidina 6, in quanto risultava essere potenzialmente interessante da un lavoro di Gillenwaters e collaboratori del 2009.

Per tutti gli SNPs considerati sono stati genotipizzati 130 tori con EBV estremi per le cellule somatiche. I risultati in termini di frequenze alleliche e genotipiche sono riportate nella tabella 1.

Non vengono riportati i dati di TGF- $\beta$ 1, in quanto la genotipizzazione è fallita.

È in corso l'analisi di associazione dei polimorfismi con il carattere SCC dei tori genotipizzati considerando le informazioni relative al pedigree.

### *Analisi genome-wide*

L'analisi di associazione genome-wide tra gli SNP e gli EBV per SCC è stata effettuata utilizzando il pacchetto GenABEL, software R.

Il controllo di qualità dell'analisi ha escluso 641 marcatori a causa del basso call rate (<95%) e 11404 marcatori a causa della MAF (minor allele frequency) sotto del 5%. Sono stati esclusi successivamente anche i marcatori sui cromosomi sessuali. Per quanto riguarda i campioni, 8 sono stati esclusi perchè avevano basso call rate (<0.95) e 2 altri campioni sono stati esclusi perchè avevano alta eterozigosità autosomica ( $FDR < 1\%$ ).

L'eterozigosità media del campione era  $0.33 \pm 0.01$ , mentre i campioni rimossi avevano l'eterozigosità maggiore di 0.63, probabile indice di contaminazione. Nessun campione è stato escluso a causa dell'IBS (Identity By State). L'IBS medio era di  $0.70 \pm 0.01$ , basato su 2000 marcatori autosomici, mentre la soglia per IBS era settata a  $> 0.95$ . Nessun outlier è stato identificato dalla Classical Multi Dimension Scaling (MDS), quindi il dataset finale che ha passato i controlli di qualità e che è stato usato per lo studio d'associazione conteneva 41209 SNPs e 1173 campioni.

Lo studio d'associazione ha rilevato che due regioni cromosomiche erano associate al SCC, una regione sul cromosoma 14 con alta significatività ( $P < 5 \times 10^{-6}$ ) e una regione sul cromosoma 6 con significatività moderata ( $P < 5 \times 10^{-5}$ ). Lo SNP significativo sul cromosoma 14 è molto vicino al DGAT1 il quale è sotto forte selezione per il quantitativo di grasso e la produzione di latte. Selezionando per DGAT1 associato all'aumentato contenuto di grasso si seleziona anche (non volutamente) per l'allele deleterio per SCC. Le due regioni cromosomiche identificate in questo studio dovrebbero essere meglio investigate per identificare potenzialmente le mutazioni causative.

COLLABORATORI DELLA RICERCA

Rossana Capoferri (Ricercatore)  
Francesco Strozzi (Ricercatore)  
Giulietta Minozzi (Ricercatore)  
Rosanna Marino (Ricercatore)  
Renata Piccini (Ricercatore)

PRODOTTI

È stato disegnato un chip Bovine Microarray custom 90K Combimatrix in collaborazione con l'Università degli Studi di Verona. Il chip è costituito da 43768 sonde bovine in duplicato.

TRASFERIMENTO

L'Università degli Studi di Verona ha trasferito al personale del laboratorio la tecnologia di ibridazione dei chip Combimatrix.





Finito di stampare in Firenze  
presso la tipografia editrice Polistampa  
nel febbraio 2011



