

I GEORGOFILI

Quaderni
2006-I



ACQUISIZIONI DELLA GENETICA E PROSPETTIVE DELLA SELEZIONE ANIMALE

Conferimento del premio di laurea
“Giancarlo Geri”

Firenze, 27 gennaio 2006

SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

Stampato con il contributo di A.I.A. (Associazione Italiana Allevatori)



Copyright © 2007
Accademia dei Georgofili
Firenze
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili»
Anno 2006 - Serie VIII - Vol. 3 (182° dall'inizio)

Responsabile redazionale: dott. Paolo Nanni

Servizi redazionali, grafica e impaginazione
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA
Via G. Benivieni 1 - Firenze
Tel. 055 5532924
Fax: 055 5532085
info@sefeditrice.it
www.sefeditrice.it

INDICE

PIERLORENZO SECCHIARI, GIUSEPPE CONTE, LUCA FONTANESI, NICOLÒ PIETRO PAOLO MACCIOTTA, MARCELLO MELE, ELISA PIERAGOSTINI, BRUNO STEFANON <i>Relazione introduttiva</i>	7
GIULIO PAGNACCO, ALESSANDRO BAGNATO, FABIOLA CANAVESI, ANTONELLO CARTA, MARTINO CASSANDRO, ENRICO SANTUS <i>Latte: selezione tradizionale e assistita da marcatori</i>	49
PAOLO AJMONE-MARSAN, ANNA MARIA CAROLI, PAOLA CREPALDI, LILIANA DI STASIO, MARIA FELIGINI, LUCA FERRETTI, PIERO MASINA, LUIGI RAMUNNO, ANDREA RANDO <i>Geni singoli nella selezione degli animali da latte</i>	79
VINCENZO RUSSO, LUCA BUTTAZZONI, PAOLO CARNIER, LUCA FONTANESI, ORESTE FRANCI <i>Selezione tradizionale e assistita da marcatori nei suini</i>	107
GIOVANNI BITTANTE <i>Selezione tradizionale e assistita da marcatori per la produzione di carne nei bovini</i>	145
ALESSIO VALENTINI, GRAZIELLA BONGIONI, ROBERTA DAVOLI, BIANCA MARIA MOIOLI, FABIO PILLA <i>Carne. Geni singoli nella selezione</i>	181

DONATO MATASSINO, CARMELA MARIA ASSUNTA BARONE, ALDO DI LUCCIA,
CATERINA INCORONATO, FILOMENA INGLESE, DONATA MARLETTA,
MARIACONSIGLIA OCCIDENTE, PAOLA RONCADA

Genomica e proteomica funzionali 201

FRANCESCO SCALA

Selezione degli animali – Identificazione dei prodotti 355

ALESSANDRO NARDONE

Conclusioni 363

Premio “Giancarlo Geri” 369

PIERLORENZO SECCHIARI*, GIUSEPPE CONTE*, LUCA FONTANESI**,
NICOLÒ PIETRO PAOLO MACCIOTTA***, MARCELLO MELE*,
ELISA PIERAGOSTINI****, BRUNO STEFANON*****

Relazione introduttiva

IL SISTEMA ZOOTECNICO ITALIANO

L'agricoltura odierna sta attraversando un'importante fase di transizione che la porterà ad acquisire un nuovo ruolo nel contesto socio-economico nazionale e internazionale. L'aumento della produzione agricola non riveste più il fine ultimo delle pratiche agronomiche, perché si stanno sviluppando nuovi aspetti quali la tutela dell'ambiente, l'agricoltura sostenibile, la difesa idrogeologica, la salvaguardia della biodiversità animale e vegetale, la qualità della vita, che hanno sostituito e diversificato l'univoca finalità originaria. L'avvenire dell'agricoltura, per decisione politica della UE, si indica ormai in termini di sviluppo rurale, che riassume tutti i contenuti in cui si declina l'attività agricola nella sua accezione più moderna.

La zootecnia italiana, dal canto suo, si sta adeguando alle nuove esigenze del settore, grazie anche all'apporto fondamentale della ricerca scientifica. Le conquiste fatte nel campo della genetica, della nutrizione e del management aziendale, hanno permesso di conquistare importanti risultati, con lo scopo di migliorare la produzione non solo da un punto di vista quantitativo ma anche, e soprattutto, qualitativo.

L'elevato interesse della ricerca italiana per il settore zootecnico, deriva dal ruolo fondamentale che lo stesso riveste nell'agricoltura nazionale.

* *DAGA, Sezione Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Pisa*

** *DIPROVAL, Sezione Allevamenti Zootecnici, Università degli Studi di Bologna*

*** *Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Sassari*

**** *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari*

***** *Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Università degli Studi di Udine*

La zootecnia è un settore trainante dell'agricoltura italiana; i dati sulla produzione del 2004 mostrano che il settore copre il 30% della produzione agricola, che, se si considera anche la pesca, sale al 33,7% (tab. 1). Il settore zootecnico, a cui è attribuibile uno specifico indotto di livello rilevante, ha mantenuto un ruolo eminente, pur non avendo incrementato la sua produzione rispetto al 2003, come invece hanno fatto quasi tutti gli altri settori rurali (INEA, 2005).

Le consistenze nelle aziende zootecniche, emerse dai dati di INEA, mostrano una situazione variegata per quanto riguarda le varie specie. L'allevamento bovino è concentrato per quasi il 70% nel Nord Italia; le differenze si fanno ancora più nette per l'allevamento dei suini, in quanto l'80% della produzione deriva dalle regioni settentrionali. Una considerazione va fatta per quanto riguarda l'allevamento bufalino, i cui risultati sono stati accorpati a quelli del settore bovino; in realtà questa specie non è concentrata al Nord come potrebbe emergere dalla tabella 2, ma si concentra in maniera rilevante in due regioni, Campania e Lazio, che più di tutte valorizzano la produzione della "mozzarella". Al contrario, il Sud e le Isole hanno manifestato una maggiore propensione per l'allevamento ovino e caprino; queste specie, infatti, con la loro rusticità riescono a valorizzare terreni marginali poco produttivi e difficilmente utilizzabili con forme di investimento differenti dal pascolo.

L'allevamento di avicoli e conigli si concentra per il 50% circa nella zona nord-orientale dell'Italia, mentre è poco diffusa nelle Isole. La tabella 2 riporta un dato interessante riguardo il confronto della situazione del 2003, rispetto ai risultati emersi dall'ultimo censimento dell'agricoltura del 2000. Il confronto mostra che, in tre anni, il quadro del sistema zootecnico ha subito

INDIRIZZO PRODUTTIVO	ITALIA		VAR. % 2004/03	
	ml. EURO	%	QUANTITÀ	PREZZI
erbacee	15.464	32,0	13,9	-8,3
arboree	11.806	24,4	15,4	-3,1
foraggiere	1.683	3,5	6,9	-13,1
zootecnia	14.566	30,2	0,2	-1,6
servizi annessi*	2.664	5,5	0,6	3,6
silvicoltura	415	0,9	-10,4	-3,1
pesca	1.706	3,5	2,0	2,3
TOTALE	48.304	100,0	7,9	-4,0
* Contoterzismo, confezionamento prodotti agricoli, manutenzione parchi e giardini, servizi annessi all'allevamento, fecondazione artificiale, nuovi impianti produttivi.				

Tab. 1 *Produzione ai prezzi di base 2004 (INEA, 2005)*

	BOVINI E BUFALINI	SUINI	OVINI	CAPRINI	ALLEVAMENTI AVICOLI	EQUINI	STRUZZI	CONIGLI
Nord-Ovest	2.413.407	5.028.576	170.955	113.723	34.360.330	21.858	6.396	111.8353
Nord-Est	1.833.239	2.235.689	187.703	49.303	95.184.074	27.566	55.369	335.3891
Centro	532.425	585.833	1.564.372	41.313	22.094.345	25.065	25.044	123.9426
Sud	875.364	404.408	1.811.027	335.270	17.154.229	23.014	36.946	137.9444
Isole	596.764	323.252	4.425.969	357.476	4.185.752	21.007	3.098	28.5220
Totale	6.251.199	8.577.758	8.160.026	897.085	172.978.730	118.510	126.853	737.6334
Censimento 2000	6.231.203	8.645.659	6.810.389	923.755	171.399.215	184.838		1.088.7544
differenze	19.996	-67.901	1.349.637	-26.670	1.579.515	-66.328	126.853	-351.1210

Tab. 2 *Consistenza delle specie di interesse zootecnico per circoscrizione nel 2004 (Fonte INEA)*

	QUANTITÀ		VALORE	
	000 t	var. % 2004/03	ml. EURO	var. % 2004/03
carni bovine	1.560	-1,5	3.559	-2,3
carni suine	1.959	2,4	2.390	-1,0
carni ovicaprine	74	-2,0	310	-23,0
carni avicole	1.410	2,5	1.994	3,4
carni di coniglio e selvaggina	411	1,3	894	3,0
uova (milioni di pezzi)	12.773	-0,5	914	-7,2
latte vaccino e bufalino (000 hl)	105.070	-0,9	3.925	-1,3
latte ovicaprino (000 hl)	6.483	-0,4	490	1,3
miele	97	38,6	23	40,2

Tab. 3 *Principali produzioni zootecniche italiane 2004 (Fonte INEA)*

un leggero cambiamento; i settori dove si è avuto un incremento delle consistenze sono quello ovino e quello avicolo, mentre si sono avuti netti cali per quanto riguarda gli allevamenti caprini, equini e cunicoli.

La zootecnia è un settore di fondamentale importanza per l'agricoltura italiana, anche se ultimamente ha avvertito più difficoltà per una serie di motivi (crisi economica, problema della BSE, scandalo dei polli alla diossina, influenza aviaria, ecc.). Nonostante questo, le produzioni del settore sono elevate e sono riassunte nella tabella 3.

Il raggiungimento di questi livelli produttivi è il risultato di un lungo e accurato lavoro di selezione che negli anni ha accompagnato lo sviluppo delle conoscenze nel campo della nutrizione animale e dei sistemi di allevamento e di alimentazione, consentendo così di realizzare un trend crescente nel miglioramento di tutte le produzioni zootecniche. Come esempio più illuminante, riportiamo la figura 1, che rappresenta l'andamento fenotipico della produzione di latte nella Frisone Italiana nell'ultimo ventennio. Pur nella consapevolezza del ruolo che a questo proposito si deve attribuire all'alimentazione e al management, l'apporto di questi fattori è conseguenza del miglioramento dell'attitudine alla produzione di latte, che si è verificato a seguito del lavoro di selezione.

Tale lavoro di selezione si è fondato e tuttora si fonda, sulle metodologie proprie della genetica quantitativa, il cui fondamento è il modello infinitesimale. La teoria della selezione è stata utilizzata in molti settori della zootecnia

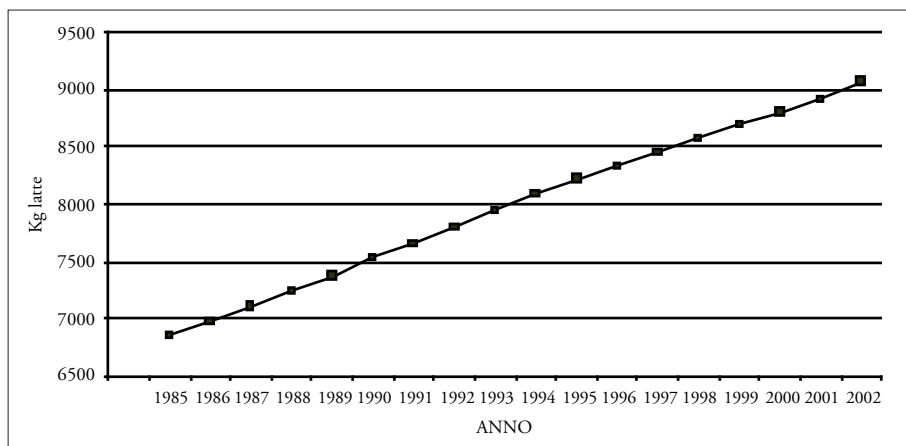


Fig. 1 *Andamento fenotipico della produzione di latte nella Frisone Italiana (fonte ANAFI modificata)*

italiana e ha riguardato numerose razze domestiche. Il maggior numero di risultati è stato ottenuto nelle razze bovine da latte, grazie alla moltitudine di dati sulla produzione e all'utilizzo dell'inseminazione artificiale. L'applicazione del miglioramento genetico si basa, prima di tutto, sulla corretta acquisizione dei dati produttivi e genealogici degli animali. La raccolta di tutte le informazioni è affidata, in Italia, alle associazioni degli allevatori, sotto il controllo del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. L'organo principale che gestisce i controlli è l'*Associazione Italiana Allevatori* (AIA) con sede a Roma, che opera su tutto il territorio nazionale grazie alle varie *Associazioni Provinciali Allevatori* (APA). Le informazioni raccolte a livello provinciale sono riunite dall'AIA che esegue una serie di elaborazioni, tra le quali il calcolo della quantità di latte, grasso e proteina (%), prodotto da ogni singolo animale nella lattazione convenzionale (305 giorni). L'attività svolta da AIA e APA è affiancata dal minuzioso lavoro delle *Associazioni Nazionali Allevatori* (ANA) di razza, tra le quali vanno citate le due principali, ANAFI (Associazione Nazionale Allevatori di Frisone Italiana) e ANARB (Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna). Il compito delle ANA è quello di tenere e aggiornare il Libro Genealogico di Razza e di sviluppare programmi di miglioramento genetico, basato sulla definizione di obiettivi di selezione, l'organizzazione delle prove di progenie, il calcolo degli indici genetici, ecc. Le ANA hanno il compito di effettuare le valutazioni morfologiche degli animali, grazie a un gruppo di esperti di razza che attribuisce un punteggio lineare a tutte le bovine primipare della popolazione iscritte al Libro Genealogico.

QUADRO STORICO DELL'EVOLUZIONE DEI MODELLI DI VALUTAZIONE DEL MERITO GENETICO DEGLI ANIMALI IN PRODUZIONE ZOOTECNICA: RICERCA DI UN EQUILIBRIO TRA SCOPERTE SCIENTIFICHE E PROBLEMI TEORICI E TECNICI

Il modello infinitesimale ha rappresentato e continua a rappresentare il fondamento teorico della genetica quantitativa. Esso tuttavia è oggetto di critiche per la sua relativa "semplicità" concettuale, che stride al confronto con il notevole sviluppo teorico e tecnico dei modelli matematici applicati al miglioramento genetico degli animali di interesse zootecnico che si è registrato negli ultimi 70 anni (Cappio-Borlino et al., 1995). Caratteristica costante di tale sviluppo è stata la ricerca di un equilibrio fra richieste del settore produttivo, nuove scoperte scientifiche e i limiti rappresentati dalla capacità di calcolo delle macchine (tab. 4).

Con l'introduzione dell'indice di selezione (Hazel, 1943) vennero trasferite al miglioramento animale conoscenze sviluppate in altri campi della biologia applicata, particolarmente nel miglioramento genetico vegetale (Ronningen e Van Vleck, 1985; Lush, 1937). La stima dei valori riproduttivi dei caratteri quantitativi veniva ottenuta mediante l'uso di fenotipi (P_i), misurati sia sull'animale da valutare che su individui parenti, aggiustati preventivamente per alcuni effetti fissi. Il peso relativo di ciascun fenotipo veniva stimato attraverso la massimizzazione delle relazioni tra l'indice (I) e il valore genetico reale (A) (Falconer e McKay, 1996) secondo la (1):

METODI	CARATTERISTICHE PRINCIPALI	AUTORE
Indice di selezione	Valutazione del merito genetico di un animale sulla base del fenotipo proprio e dei parenti. Pre-aggiustamento dei fenotipi per gli effetti fissi.	Hazel, 1943
BLUP (Best Linear unbiased Prediction)	Stima simultanea degli effetti ambientali e dei valori riproduttivi. Uso della matrice di parentela.	Henderson C.R., 1975
Test Day (TD) model	Modellizzazione diretta della produzione giornaliera. Stima di effetti specifici nelle differenti fasi di lattazione	Stanton, 1992; Ptak e Schaeffer, 1993
Random regression Test day models	Variabilità genetica nella forma della curva di lattazione. Stima delle funzioni di covarianza.	Kirkpatrick et al., 1990

Tab. 4 *Principali tappe dell'evoluzione delle metodologie per la stima degli indici genetici per i caratteri della produzione del latte*

$$(1) I = b_1 P_1 + b_2 P_2 + .. + b_n P_n$$

dove:

I = indice di selezione;

P_n = fenotipo;

b_n = coefficiente di regressione.

I limiti dell'indice di selezione sono noti: a) il confronto fra gli indici genetici stimati può essere realizzato in maniera attendibile solo per animali allevati in condizioni di management e alimentazione simili; b) il pre-aggiustamento dei fenotipi per gli effetti fissi rischia di rimuovere alcune differenze genetiche reali (Simm, 1998). In generale, l'indice di selezione non permette di considerare le differenze dei livelli genetici nel corso degli anni o tra allevamenti. Anche il confronto fra contemporanee, sviluppato per assicurare un reale raffronto entro allevamento e reso possibile dalla diffusione dell'inseminazione artificiale, assumeva implicitamente che tutti gli allevamenti fossero dello stesso merito genetico.

Una soluzione al problema fu data da C.R. Henderson (1975), il quale sviluppò il metodo BLUP (Best Linear Unbiased Prediction), basato sulla teoria del modello lineare misto. Il modello era in grado di stimare simultaneamente gli effetti dei fattori fissi (**b**) e gli effetti genetici additivi casuali del toro (**u**) secondo la (2):

$$(2) y = Xb + Zu + e$$

dove:

y = variabile dipendente;

X = matrice d'identità dei fattori fissi;

Z = matrice d'identità dei fattori genetici additivi casuali;

b = effetti dei fattori fissi;

u = effetti genetici additivi casuali.

A parte lo sforzo teorico profuso da Henderson e collaboratori, lo sviluppo di questo approccio, da un punto di vista matematico molto più complesso dell'indice di selezione, è stato reso possibile dal grande sviluppo della tecnologia dei computer verificatosi tra gli anni '70 e '80. Il metodo BLUP in tutte le sue varianti (*Sire Model*, *Sire and Maternal grandsire*, *Animal model*) rappresenta tuttora il sistema di riferimento per la stima dei valori genetici e delle componenti di varianza di diversi caratteri per le principali specie zootecniche in numerosi paesi.

La successiva evoluzione dei modelli genetici è stata, ancora una volta, frutto dell'interazione fra esigenze del settore produttivo e degli avanzamenti della ricerca. Nel modello BLUP veniva analizzata la produzione totale per lattazione, ottenuta aggregando i dati dei singoli controlli funzionali (test days, TD), oppure proiettando le lattazioni in corso. L'aggregazione di misure tra loro eterogenee (rilevate secondo schemi differenti: A4, A6, AC, AT, ecc.) è causa di errori nella stima della produzione totale (Swalve, 2000). Inoltre, con l'aggregazione dei dati si assume implicitamente che l'effetto dei fattori ambientali sia costante lungo tutta la lattazione, mentre ci sono fattori (clima, alimentazione) che possono agire in maniera peculiare nelle diverse fasi della lattazione (Jamrozik e Schaeffer, 1997). Al fine di superare questi inconvenienti, è stato proposto il Test Day model, che analizza direttamente i dati dei controlli funzionali della produzione giornaliera (Stanton et al., 1992). Il principale vantaggio del Test Day model è la diretta correzione degli effetti fissi, soprattutto per quelli il cui effetto è variabile nel tempo. Altri vantaggi sono legati alla possibilità di evitare la proiezione dei dati per le lattazioni in corso; inoltre il modello permette di fare una valutazione genetica della persistenza della lattazione.

Sono state proposte molte versioni del modello Test Day. La più recente è rappresentata dal Modello Random Regression (RRM). Il concetto generale sull'uso del modello RR è stato suggerito da Henderson Jr. (1982) e applicato al miglioramento genetico animale da Schaeffer e Dekkers (1994). Il RR model assume che gli animali possano differire dal punto di vista genetico non solo nella produzione totale di latte per lattazione, ma anche nella forma della curva di lattazione.

Da un punto di vista matematico, un modello RR può essere rappresentato come segue (3):

$$(3) \mathbf{y} = \mathbf{F} + \sum \mathbf{bz} + \sum \mathbf{az} + \sum \mathbf{pz} + \mathbf{e}$$

dove:

y = variabile dipendente;

F = effetti fissi inclusi nel modello;

b = coefficienti di regressione fissi (es. identica regione, età, stagione di parto);

a = coefficienti di regressione casuali specifici per ogni animale (effetto genetico additivo);

p = coefficienti di regressione casuale per l'effetto ambientale permanente di ogni vacca ;

e = effetto residuale.

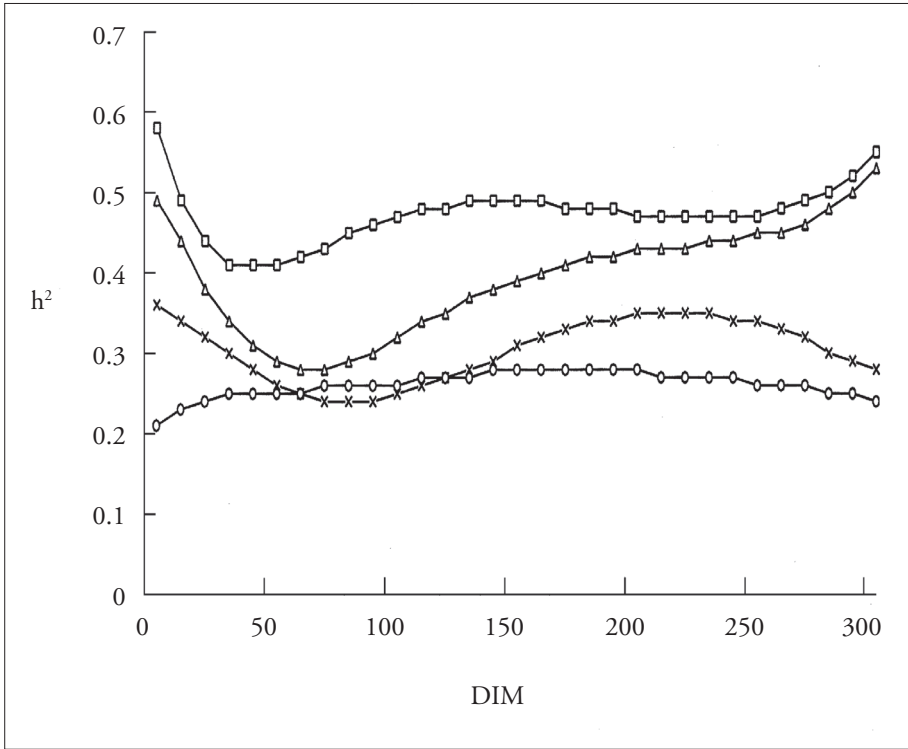


Fig. 2 Funzioni di varianza e covarianza dell'ereditabilità della produzione di latte, stimate con differenti modelli RR su primipare di razza Ayrshire (Kettunen et al., 2000)

Un interessante risultato del modello è la stima delle funzioni di (co)varianza riguardanti gli effetti casuali inclusi nel modello (effetto genetico additivo, effetto ambientale permanente tra le lattazioni e tra i TD all'interno delle lattazioni, Meyer, 1998).

Il modello RR viene utilizzato correntemente nelle nazioni più avanzate nell'allevamento dei bovini da latte, dove viene utilizzato anche per altri caratteri quali la morfologia, il punteggio di condizione corporea (BCS), l'ingestione alimentare, le misure somatiche. Per i bovini da carne e per i suini i RRM trovano applicazione nell'analisi del peso e dello spessore del grasso di copertura; per le trote, la lunghezza della biforcazione e, infine, ancora per i suini, alla numerosità della nidiata (Schaeffer, 2004; Albuquerque e Meyer, 2001; Bohmanova et al., 2005; Hassen et al., 2003).

Esistono tuttavia alcuni problemi da risolvere nell'applicazione dei RRM alla routine del miglioramento genetico animale. Il primo è rappresentato

dalle grandi esigenze in termini di capacità di calcolo. Schaeffer et al. (2000) riportano che in una delle prime versioni del Test Day model canadese, un RR Animal Model a 12 caratteri, il calcolo degli indici genetici richiedeva 25 minuti per iterazione e un minimo di 300 iterazioni per elaborazione. Con circa 2.000.000 di animali e 36 coefficienti di regressione per animale, la memoria necessaria per la soluzione e l'applicazione del modello è prossima a 13 Gb di RAM.

Un altro problema di rilevante importanza è la grande variabilità delle stime dei parametri. Ad esempio, nella figura 2 sono riportate le funzioni di (co)varianza dell'ereditabilità della produzione di latte, stimate con differenti modelli RR su primipare di razza Ayrshire (Kettunen et al., 2000). Si può chiaramente notare come i pattern di ereditabilità varino a seconda del modello usato, con differenze rilevanti nella fase iniziale e finale della lattazione. Questo è un fattore di grande attualità, dato che esistono diversi modelli RR con vari gradi di complicazione (Strabel et al., 2005). Attualmente, non esiste una opinione unanime su quale sia il modello RR più affidabile e quale il metodo più adatto per confrontare la bontà dei modelli. Come sottolineato da Jensen (2001), l'ottenimento di stime accurate dei parametri con i modelli RR è una sfida ancora aperta.

GENETICA MOLECOLARE NEGLI ANIMALI DI INTERESSE ZOOTECNICO

Nell'ultimo ventennio, lo sviluppo delle tecnologie di genetica molecolare ha permesso di ottenere un'enorme quantità di informazioni sul genoma delle specie animali di interesse zootecnico. L'utilizzo di queste informazioni riveste una particolare importanza per quanto riguarda il miglioramento genetico che, in generale, ha come obiettivi finali il miglioramento della quantità e della qualità dei prodotti zootecnici. Ai fini del miglioramento genetico, lo sfruttamento delle nuove conoscenze, che derivano dalla genetica molecolare, si attua attraverso la selezione degli animali basata sulle informazioni di marcatori del DNA, la così detta selezione assistita da marcatori o Marker Assisted Selection (MAS), che sarà sempre più utilizzata a fianco degli schemi tradizionali di selezione. Attualmente, sebbene l'impiego della MAS nei programmi di selezione sia ancora nella sua fase iniziale, gli studi compiuti per sviluppare risorse genetiche e strumenti che permettano l'identificazione di geni o regioni del genoma in grado di influenzare i caratteri di interesse economico rappresentano il punto di partenza per l'identificazione delle strategie future di ricerca e per le applicazioni in campo zootecnico.

Studio del genoma degli animali di interesse zootecnico

Il genoma degli animali di interesse zootecnico è costituito da un numero di cromosomi diverso per ogni specie (tab. 5), con un contenuto totale in DNA di circa 3 miliardi di paia di basi (bp) per i mammiferi e approssimativamente 1,2 miliardi di bp per le specie aviarie (si rimanda ai siti Database Genome Sizes e DBA Mammalian Genome Size DataBase disponibili in rete).

Per analizzare il genoma degli animali di interesse zootecnico fu ben presto evidente che era necessario sviluppare mappe genetiche delle diverse specie. La prima generazione di mappe genetiche nei bovini (Barendse et al., 1994), suini (Ellegren et al., 1994; Rohrer et al., 1994; Archibald et al., 1995), ovini (Crawford et al., 1995), caprini (Vaiman et al., 1996), equini (Lindgren et al., 1998) e avicoli (Bumstead e Palyga, 1992; Levin et al., 1994), basati principalmente su marcatori microsatellitari, furono disponibili verso la metà degli anni '90 o poco più tardi per alcune specie. La seconda generazione di mappe genetiche a media densità, che includevano un più alto numero di marcatori di DNA, furono prodotte a partire dalle prime mappe pubblicate (Rohrer et al., 1996; Marklund et al., 1996; Barendse et al., 1997; Kappes et al., 1997; de Gotardi et al., 1998; Groenen et al., 1998, 2000; Swinburne et al., 2000; Maddox et al., 2001). Con il passare del tempo, il numero dei marcatori individuati sulle mappe genetiche è aumentato a tal punto da poter parlare di mappe di terza generazione o mappe genetiche ad alta densità. Attualmente, si possono contare più di 1000-1500 marcatori disponibili per le principali specie e le informazioni relative a queste mappe sono disponibili sul web in molti URL (tab. 6).

SPECIE	NUMERO DI CROMOSOMI (2N)	NUMERO DI SEQUENZE PRESENTI IN BANCA DATI (DDBJ/EMBL/GENBANK)*
<i>Bos taurus</i> (Bovino)	60	1.830.566
<i>Sus scrofa domestica</i> (Suino)	38	1.147.398
<i>Ovis aries</i> (Pecora)	54	392.074
<i>Capra hircus</i> (Capra)	60	3.556
<i>Equus caballus</i> (Cavallo)	64	52.247
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coniglio)	44	738.636
<i>Gallus gallus</i> (Pollo)	78	958.984
<i>Meleagris gallopavo</i> (Tacchino)	80	3.776
* Dati aggiornati al 15/01/2006.		

Tab. 5 Numero di cromosomi e numero di sequenze (entry) presenti in banca dati per le principali specie di interesse zootecnico

CONTENUTO DATABASE	URL
Linkage genome maps: bovini, suini, ovini	http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html
Ark genomics: marcatori del DNA nelle principali specie di interesse zootecnico	http://www.ark-genomics.org/index.php
Animal genome databases: banche dati del genoma delle principali specie di interesse zootecnico	http://ws4.niai.affrc.go.jp/jgbase.html

Tab. 6 *Alcune banche dati che contengono informazioni sulle mappe genetiche delle principali specie di interesse zootecnico*

Il secondo passo nell'analisi del genoma è stato quello di agganciare le mappe genetiche ai vari cromosomi; a tal fine furono create le mappe fisiche usando diverse tecniche e strumenti, ad esempio l'ibridazione *in situ* o gli ibridi di cellule somatiche (Yerle et al., 1996). I pannelli di ibridi di radiazione sviluppati per i bovini (Womack et al., 1997; Rexoad et al., 2000), i suini (Yerle et al., 1998; Yerle et al., 2002), i cavalli (Chowdhary et al., 2002) e i polli (Morisson et al., 2002) hanno reso possibile la costruzione di mappe (radiation hybrid map) ad alta o altissima risoluzione e usate per unire mappe genetiche, fisiche e mappe basate su contig di cloni BAC (Cromosomi Artificiali Batterici). In seguito, diverse banche dati sono state prodotte includendo informazioni sui differenti tipi di marcatori e sui geni inseriti in queste mappe (tab. 6). Inoltre, librerie BAC sono state costruite per diverse specie di interesse zootecnico, con lo scopo di sequenziare particolari regioni cromosomiche e per la costruzione di mappe fisiche complete, al fine di permettere il sequenziamento e l'assemblaggio dei genomi animali (Meyers et al., 2005).

A tutte queste attività di costruzione o miglioramento delle mappe, in particolar modo per quanto riguarda la specie bovina e la specie suina, hanno contribuito e/o stanno attualmente ancora contribuendo diversi gruppi di ricerca italiani, svolgendo le loro attività nell'ambito di alcuni progetti di ricerca europei o nazionali.

Le attività di sequenziamento sono iniziate prevalentemente con la caratterizzazione delle sequenze codificanti e la produzione di migliaia di EST (Expressed Sequence Tags) isolate da tessuti specifici che hanno una relazione diretta o indiretta con caratteri di interesse economico (esempi: Tosser-Klopp et al., 1997; Davoli et al., 2002). Il numero di sequenze di DNA, depositate nelle banche dati (EMBL, GenBank and DDBJ) per le diverse specie, può essere considerato una misura dello stato di avanzamento per quanto riguarda il sequenziamento del genoma delle varie specie (tab. 5).

Diverse iniziative di sequenziamento, coordinate a livello internazionale, che purtroppo non vedono l'apporto diretto dell'Italia, sono iniziate per le principali specie di interesse zootecnico. In particolare, una prima "bozza" della sequenza del genoma di pollo è stata pubblicata recentemente (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004). Inoltre, in seguito all'annuncio del sequenziamento (copertura 1x) del genoma bovino da parte di MetaMorphix, un'azienda privata (Adam, 2000), un consorzio internazionale coordinato dal National Institute of Health americano, ha annunciato nel 2004 di aver ottenuto il sequenziamento del genoma bovino (3,3x di copertura) e di aver depositato le sequenze, ottenute principalmente dal Human Genome Sequencing Center al Baylor College of Medicine di Houston, in banche dati a libero accesso (http://www.ensembl.org/Bos_taurus/index.html). La comunità scientifica è ora coinvolta nel lavoro di assemblaggio, di annotazione e di completamento del sequenziamento al livello 6x. Per quanto riguarda il genoma suino, il lavoro di sequenziamento del genoma iniziato dal consorzio Cino-Danese (Wernersson et al., 2005) sarà completato da un altro consorzio nato a livello internazionale (<http://www.animalgenome.org/pigs/newsletter/nl72.html>). Per quanto riguarda altre specie, è da segnalare che è stato completato il sequenziamento a livello 2x del genoma di coniglio, ottenuto principalmente allo scopo di ricavare informazioni con l'allineamento e confronto dei genomi di diversi altri mammiferi (<http://www.broad.mit.edu/mammals/>). Infine, il sequenziamento di particolari regioni genomiche è in corso in diverse specie, incluse alcune di interesse zootecnico (Thomas et al., 2003), al fine di ottenere informazioni comparative sui diversi segnali regolativi.

I QTL e la loro individuazione: Selezione Assistita da Marcatori (MAS)

I QTL sono *loci* aventi effetto sui caratteri quantitativi. La presenza di geni, posti sui cromosomi in prossimità di determinati QTL, fa sì che, in virtù di tale vicinanza, si crei fra essi uno stretto legame che li porta a essere ereditati insieme (salvo l'eventualità di "crossing-over" e quindi ricombinazioni), divenendo così marcatori dei rispettivi QTL.

Questa condizione ha portato a un aumento delle conoscenze sulle regioni genomiche che controllano QTL e ha permesso di avviare programmi di miglioramento genetico, utilizzando la Selezione Assistita da Marcatori (MAS) e l'Introgressione di geni Assistita da Marcatori (MAI) (Cappio-Borlino et al., 1995; Russo e Fontanesi, 2001).

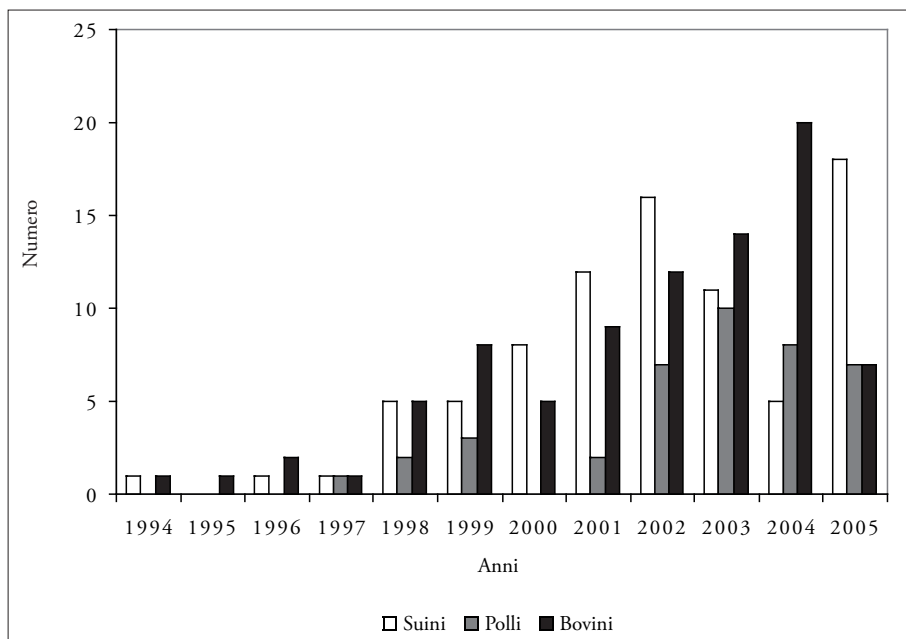


Fig. 3 *Numero di studi pubblicati su riviste referizzate, suddivisi per anno, relativamente all'identificazione di QTL nel bovino, suino e pollo*

Queste prospettive sono particolarmente idonee per quei caratteri che mostrano difficoltà di miglioramento con i sistemi di selezione convenzionale, a causa della bassa ereditabilità, delle difficoltà a valutare i fenotipi e alla elevata lunghezza del ciclo vitale degli animali (Dekker et Hospital, 2002).

Il principio di base del mappaggio dei QTL con la metodologia MAS si basa sulla presenza di un disequilibrio di Linkage (LD) tra i marcatori del DNA e i QTL. Il livello di LD dipende dalla distanza tra i marcatori e i QTL e, in parte dall'entità della popolazione utilizzata nello studio. Le mappe genetiche disponibili sin dalla metà degli anni '90, grazie alla buona densità di marcatori, hanno permesso di poter programmare esperimenti per identificare i QTL nelle principali specie d'interesse zootecnico, usando popolazioni in selezione (daughter e grand-daughter designs) o popolazioni sperimentali (F2 e reincroci). I daughter e grand-daughter designs sono stati usati principalmente nei bovini da latte, per le quali sono disponibili estese famiglie di mezze sorelle (daughter design) o di mezzi fratelli (grand-daughter design) (Weller et al., 1990) che derivano dal largo uso della inseminazione strumentale per il progeny-test. Lo scopo che ci si proponeva era di favorire nuove

GENE	CARATTERE	SPECIE	TIPO DI MARCATORE
Proteina Prionica	Resistenza Scrapie	Pecore	Diretto
Gene recettore di estrogeni (ESR)	Taglia piccolo	Maiali	LD
K-caseina	Qualità del latte	Bovini	Diretto
Callipige	Sviluppo	Pecore	Diretto
BLAD	Difetti congenitali	Bovini	Diretto

Tab. 7 *Esempi di applicazione della MAS*

conoscenze sulla genotipizzazione selettiva (SG) (Bovenhius and Spelman, 2000) e la fenotipizzazione selettiva (SP). L'individuazione della posizione dei QTL e la costituzione di popolazioni di riferimento ad hoc è comunque costosa, richiede lunghi tempi di lavoro ed è spesso poco chiara, perché in una tipica scansione del genoma, i QTL sono mappati con un intervallo di 20 cM.

L'uso di incroci tra razze o linee è stato usato principalmente nei suini e nei polli, perché hanno un breve intervallo di generazione e un alto livello di prolificità.

Da quando sono stati riportati i primi studi di identificazione di QTL nei bovini da latte (Georges et al., 1995), bovini da carne (Stone et al., 1999), suini (Andersson et al., 1994) e polli (Lamont et al., 1996; Van Koam et al., 1999) il numero degli studi di mappaggio dei QTL è incrementato di anno in anno (fig. 4).

Per quanto riguarda i bovini e i suini, alcune banche dati, di recente costituzione, riportano le informazioni sui QTL identificati (Khatkar et al., 2004; Polineni, 2004; Hu et al., 2005).

Nonostante la notevole quantità di informazioni molecolari disponibili nelle suddette banche dati, gli esempi di applicazione della MAS sono poche. Nella tabella 7 sono riportati gli esempi più rappresentativi di applicazione della MAS di specie zootecniche. I marcatori sono classificati secondo la definizione di Dekkers (2004):

1. marcatori diretti: *loci* che codificano per mutazioni funzionali;
2. marcatori LD: *loci* che sono in LD di vaste popolazioni con mutazioni funzionali;
3. marcatori LE: *loci* che sono in equilibrio di linkage di vaste popolazioni non consanguinee con mutazioni funzionali.

Dalla tabella 8 emerge che molte delle applicazioni della MAS sono legate a marcatori diretti, difficili da individuare, mentre molti dei QTL sono ge-

neralmente determinati in popolazioni sperimentali (marcatori LE) e i loro risultati sono difficili da utilizzare direttamente per la selezione di razze.

I programmi MAI sono stati usati per il gene della fecondità della pecora di razza Booroola (Gootwine et al., 2001) e per il gene del collo nudo nei polli (Yancovich et al., 1996).

In Italia, studi sul mappaggio di QTL che analizzano l'intero genoma sono stati condotti solo nella Frisone Italiana e nella Bruna Alpina per quanto riguarda la specie bovina e in una popolazione ottenuta dall'incrocio Sarda x Lacune per quanto riguarda la specie ovina. Lo studio sulle due razze bovine è stato condotto, utilizzando il daughter design con la strategia del *selective DNA pooling*, rispettivamente dalla Sezione di Allevamenti Zootecnici (DI-PROVAL) dell'Università di Bologna (Russo et al., 2005) e dal Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare dell'Università di Milano (Bagnato et al., 2005). I due gruppi di ricerca sono coinvolti nel progetto europeo "BovMAS" che include anche la Hebrew University di Gerusalemme (Israele), la LMU di Monaco di Baviera (Germania) e la BOKU University di Vienna (Austria). Lo studio sugli ovini è stato condotto dall'Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna (IZCS), in collaborazione con l'INRA nell'ambito del progetto europeo "Genesheepsafety" (Carta et al., 2003).

I geni candidati : metodi di analisi

Un approccio alternativo ai classici schemi di identificazione dei QTL è rappresentato dallo studio dei geni candidati per identificare direttamente marcatori associati con caratteri produttivi. La scelta dei geni candidati è stata fatta sulla base del loro ruolo biologico che direttamente o indirettamente è collegato con il carattere produttivo preso in considerazione. Dato che il numero di potenziali geni candidati è spesso molto elevato, l'integrazione dell'approccio del gene candidato con le informazioni ottenute dal mappaggio di QTL permette di ridurre notevolmente il numero dei possibili geni da studiare aumentando le probabilità di identificare marcatori effettivamente associati con i caratteri oggetto di studio.

Qui di seguito vengono riportati alcuni esempi di applicazione dell'approccio del gene candidato.

Per quanto riguarda le lattoproteine, il loro polimorfismo genetico è noto fin dal 1955, quando Aschaffenburg e Drewry individuarono due bande a diversa mobilità in campo elettroforetico, nella zona della β -lattoglobulina,

analizzando il latte di singole bovine (Aschaffenburg e Drewry, 1955). Successivamente, è stato scoperto un polimorfismo anche per la α -lattoalbumina (ALA) e sono stati definiti i quattro gruppi di caseina (α s1-, α s2-, β e κ) polimorfici, con due o più varianti genetiche (tab. 7). Studi recenti hanno portato alla mappatura dettagliata dei *loci* caseinici bovini dimostrando la loro localizzazione sul braccio lungo del cromosoma 6 con i *loci* ordinati nel modo seguente : 5' - α s1- β - α s2- κ 3' per una lunghezza totale stimata attorno a 250 kb (Rijnkels et al., 1997).

A livello proteico, le differenze tra le varianti genetiche sono in genere dovute alla sostituzione di uno o più aminoacidi nella molecola, conseguenza di mutazioni puntiformi o ricombinazioni a livello del DNA (inserzioni, delezioni e inversioni di segmenti di DNA). In particolare, è stato dimostrato che il cambio anche di un solo aminoacido nella catena proteica può comportare profonde alterazioni nelle caratteristiche della molecola proteica, che si ripercuotono sulle proprietà chimico-fisiche del latte, e quindi sulle sue caratteristiche tecnologiche (Amigo et al., 2000). La qualità tecnologica del latte è rappresentata eminentemente dalla frazione proteica caseinica: alfa s1, beta

CASEINA	VARIANTE	VARIAZIONE RISPETTO ALLA FORMA A SPECIFICO PER OGNI CLASSE	RIFERIMENTI
Alfa s1 caseina	A		Thompson et al., 1962
	B	Inserzione Aa 14-26	Thompson et al., 1962
	C	Glu(192) \rightarrow Gly	Thompson et al., 1962; Kiddy et al., 1963
	D	Ala(53) \rightarrow Thr P	Grosclaude et al., 1966
	Eyak	Glu(192) \rightarrow Gly Gln(59) \rightarrow Lys	Grosclaude et al., 1974, 1976
	F	Ser(66) \rightarrow Leu	Erhardt et al., 1992; Erhardt, 1993
	G	Variazioni a livello nucleotidico, inserzione di 371 bp nell'esone 19	Rando et al., 1993, 1995; Ramunno et al., 1994
	H	Delezione Aminoacidi (Aa) 51-58	Mahè et al., 1999
Alfa s2 caseina	A		Grosclaude et al., 1976
	B	Variante non ancora caratterizzata	Grosclaude et al., 1976
	C	Glu (33) \rightarrow Gly Ala (47) \rightarrow Thr Thr (130) \rightarrow Ile	Grosclaude et al., 1976
	D	Delezione Aa 51-59	Grosclaude et al., 1976, 1978

Tab. 8 Varianti genetiche delle componenti della frazione caseinica del latte

Beta caseina	A ¹	Pro(67) → His	Peterson e Kopfler, 1966; Kiddy et al., 1966
	A ²		Peterson e Kopfler, 1966; Kiddy et al., 1966
	A ³	His(106) → Gln	Kiddy et al., 1966
	B	Pro(67) → His; Ser(122) → Arg	Aschaffenburg, 1961-1963
	C	Pro(67) → His; Glu(37) → Lys; Ser P(35) → Ser	Aschaffenburg, 1961-1963
	D	Ser P(18) → Lys	Aschaffenburg, 1961-1963
	E	Variante non ancora caratterizzata	Voglino, 1972
	A'	Variante non ancora caratterizzata	Abe et al., 1975
	A ³ m	Variante non ancora caratterizzata	Grosclaude, 1975
	B ²	Variante non ancora caratterizzata	Creamer e Richardson, 1975
	A ⁴ (H)	[Pro(67) → His]; Arg(25) → Cys	Han et al., 1983; Chung et al., 1995; Han e Shin, 1996
	F	Pro(67) → His; Pro(152) → Leu	Visser et al., 1991-1995
K caseina	A ⁵ variante genetica, non proteica	Mutazione silente CøT nella 3a posizione del codone codificante per Pro (110)	Lien e Rogne, 1993
	A		Neelin, 1964
	B	Thr(136) → Ile; Asp(148) → Ala	Gorodetsij e Kaledin, 1987
	C	Thr(136) → Ile; Asp(148) → Ala; Arg(97) → His	Di Stasio e Merlin, 1978; Mariani, 1983
	E	Ser(155) → Gly	Erhardt et al., 1989; Erhardt, 1989
	F	Arg(10) → His	Sulimova et al., 1992
	G	Asp(148) → Ala	Sulimova et al., 1996
	G	Arg(97) → Cys	Erhardt, 1996
	H	Ile(135) → Thr	Grosclaude et al., 1974; Prinzerberg e Erhardt, 1998; Prinzenberg et al., 1999
	I	Ser(104) → Ala	Prinzerberg e Erhardt, 1998; Prinzenberg et al., 1999
	J	Ser(155) → Arg	Mahè et al., 1999

Tab. 8

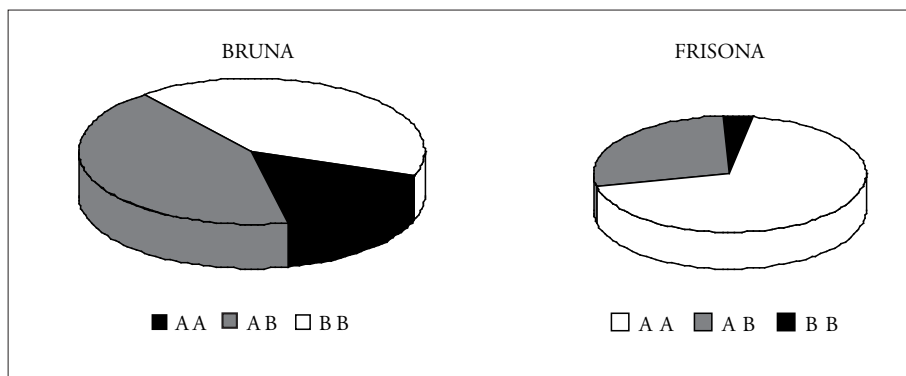


Fig. 4 Distribuzione del polimorfismo della k-caseina nelle razze Frisone Italiana e Bruna Italiana. Frequenza allelica A in Frisone = 82,70%; Frequenza allelica A in Bruna = 38,64%. (Fonti ANAFI 2005 e ANARB, 2005)

e k-caseina. I tre *loci*, che presentano un ampio polimorfismo genetico (tab. 8), sono stati mappati sul cromosoma 6 nella specie bovina e sono in stretto linkage fra loro occupando uno spazio di circa 0,25 cM (Ferretti et al., 1990); l'effetto dei diversi alleli è stato ampiamente studiato (Pagnacco e Caroli, 1987; Ruottinen et al., 1996) ed è stata sottolineata una migliore attitudine alla coagulazione del latte associata alla k-caseina B, rispetto alla A (Sharr et al., 1985, Pagnacco e Caroli, 1987), mentre la variante E, la cui frequenza nella Frisone Italiana non è irrilevante, sembrerebbe presentare effetti ancor più negativi (Leone et al., 1998). Questo approccio, basato sull'associazione tra le forme geniche di un singolo *locus* e le caratteristiche produttive degli animali portatori dei diversi alleli, ha condotto all'applicazione della selezione dei riproduttori genotipizzati per il *locus* della k-caseina, come avviene nelle razze bovine Frisone Italiana e Bruna Italiana. Gli alleli di k-caseina più diffusi sono quello A e il B, presenti, con frequenza variabile, in tutte le razze. La variante A prevale nelle razze Frisone Italiana, Ayrshire, Rossa Danese, Irish Kerry (dove la frequenza è vicina al 93%, Murphy e Downey, 1969) e in zebù Indiano. La variante B, invece, è prevalente nelle razze Bruna Italiana, Jersey, Normande e in zebù Africano. Le razze da carne hanno una marcata prevalenza della variante B (Russo e Mariani, 1978, fig. 3).

La CASK C è meno comune, ma è stata trovata in molte razze. Oltre che in Grigia Alpina e Bruna Italiana, è stata individuata in Simmental Tedesca (Seibert et al., 1987), Fleckvieh Tedesca (Erhardt, 1989), Murnau-Werdenfelser (Krause et al., 1988) e Holstein Rossa (Bovenhuis e Harendonk, 1991). Anche la CASK E è considerata una variante non molto comune, anche se nella razza Finnish Ayrshire è stata trovata anche con alta frequenza (~30%,

Ikonen et al., 1996); recentemente questa variante è stata identificata anche in Bruna Italiana e Frisona Italiana (Leone et al., 1998; Caroli et al., 2000).

Alcuni autori, tuttavia, hanno recentemente posto l'attenzione sul fatto che i risultati relativi agli effetti dei polimorfismi dei singoli *loci* sulle caratteristiche produttive degli animali sono spesso contrastanti tra loro e, pertanto, gli effetti positivi sulla produzione osservati in alcuni studi potrebbero essere dovuti all'associazione tra il *locus* caseinico e altri *loci* presenti sul cromosoma 6 piuttosto che all'esclusivo effetto allelico del *locus* stesso (Braunschweig et al., 2000; Pagnacco et al., 2004). Attualmente, pertanto, si ritiene che una miglior stima degli effetti dei vari alleli del *locus* caseinico si ottenga indirizzando la stima medesima al cluster caseinico, partendo non dai semplici genotipi, ma dai diversi aplotipi osservabili in ogni singola razza. Gli aplotipi sono polimorfismi a due o più *loci* strettamente associati su un cromosoma, generalmente ereditati come una unità.

Recentemente, infatti, è stato dimostrato che medesimi aplotipi tendono ad avere effetti simili in razze differenti e questo sembra confermare l'importanza del cluster caseinico rispetto ai singoli polimorfismi ivi contenuti, per spiegare gli effetti ad esso associati (Pagnacco et al., 2004).

Anche per quanto riguarda la quantità e la qualità del grasso del latte e della carne è stato sperimentato l'approccio del gene candidato, tuttavia, a differenza di quanto evidenziato per la frazione proteica, mancano ancora delle esperienze applicative nell'ambito della selezione.

Il controllo del metabolismo lipidico è regolato dall'espressione e dall'attivazione di numerosi geni che danno origine a molteplici enzimi di cui alcuni svolgono un ruolo chiave come il complesso Acetil-CoA-Carbossilasi (ACC) e Sintasi degli acidi grassi (FAS), le Lipoproteinlipasi (LPL), le Aciltransferasi (GPAT, LPAT, DGAT), le desaturasi degli acidi grassi ($\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$ e $\Delta 9$ o Stearoil Co-A desaturasi, SCD). La loro regolazione è sicuramente di origine multifattoriale in quanto comprende fattori endogeni ed esogeni. I primi sono costituiti essenzialmente da molecole prodotte dall'organismo (come gli ormoni insulina e leptina), che hanno la capacità di attivare fattori che, a loro volta, sono in grado di attivare o reprimere l'espressione dei geni lipogenici. I fattori esogeni, al contrario, sono legati a stimoli esterni come le condizioni ambientali (clima, management e salute dell'animale) e la composizione della dieta. Dal punto di vista delle relazioni fra polimorfismi genetici e caratteristiche produttive degli animali i geni più investigati risultano essere quelli relativi agli enzimi ACC, DGAT e SCD.

Tra le desaturasi degli acidi grassi la $\Delta 9$ (SCD) svolge sicuramente un ruolo centrale, in quanto è responsabile della produzione di circa la metà del

contenuto di uno degli acidi grassi maggiormente rappresentato nei lipidi animali: l'acido oleico. La SCD è una proteina localizzata sulla membrana del reticolo endoplasmatico dei microsomi e ha la funzione di catalizzare la desaturazione in posizione $\text{cis-}\Delta^9$ di alcuni acidi grassi, tra cui l'acido stearico e l'acido vaccenico, originando così rispettivamente l'acido oleico (C18:1 cis-9) e l'acido rumenico (CLA cis-9 , trans-11) (Ntambi et al., 2001). La sequenza aminoacidica è caratterizzata dalla presenza di 3 regioni ricche di istidina, che si ripetono in tutte le specie con un elevato tasso di similarità, che si estende anche al regno vegetale. Questo fa supporre che le tre regioni intervengano attivamente nella catalisi della reazione (Ntambi 1995; Behrouzian et al., 2003; Heinemann et al., 2003).

Il gene della SCD è costituito da sei esoni e cinque introni. Questa organizzazione è stata ritrovata nel gene murino, umano, caprino, ovino e bovino (Bernard et al., 2001). Le sequenze presenti in banca dati rilevano una notevole similarità tra il cDNA della SCD dei caprini e quello di ovini e bovini; mentre è più bassa con quello di topo e uomo (Bernard et al., 2001).

Il gene della SCD bovina è lungo 17088 bp ed è localizzato a livello del cromosoma 26. Lo studio della struttura del gene ha rilevato la presenza di un polimorfismo, esteso a molte razze (Holstein, Jersey e Brown Suisse) (Medrano et al., 2003), costituito da tre mutazioni puntiformi (SNP) a carico del quinto esone, le prime due sono mutazioni silenti, mentre la terza comporta la sostituzione di un amminoacido, precisamente una valina con un'alanina, nella terza regione istidinica (Medrano et al., 2003; Taniguchi et al., 2004). Questo comporta la presenza di due aplotipi SCD, codificanti per due forme proteiche che differiscono per la sostituzione aminoacidica sopra riportata (aplotipo A e V).

A partire da questa evidenza sperimentale sono state ipotizzate modifiche nell'attività enzimatica delle due proteine. Recentemente, infatti, uno studio compiuto su razze bovine da carne ha messo in luce l'effetto del polimorfismo del gene SCD sulla composizione degli acidi grassi nella carne. In particolare è stato rilevato che la presenza dell'aplotipo con alanina comporta un maggiore accumulo di MUFA rispetto all'aplotipo con valina (Taniguchi et al., 2004).

Un risultato simile è stato evidenziato anche nell'ambito del progetto PRIN 2003 (finanziamento MIUR, coordinatore prof. P. Secchiari) con uno studio condotto su 360 bovine da latte di razza Frisone Italiana: gli individui portatori dell'aplotipo A mostravano un contenuto significativamente più elevato di MUFA e di CLA nel latte e un'attività desaturasica, misurata come rapporto C14:1/C14:0, più elevata, rispetto agli individui omozigoti per l'aplotipo V.

Il gene SCD di capra è stato mappato a livello del cromosoma 26, non è stato ancora sequenziato e poco si conosce riguardo la sua struttura. La lunghezza del cDNA è molto simile a quello bovino e ovino con una similarità del 95% e 98% rispettivamente (Bernard et al., 2001). È stato comunque individuato un polimorfismo all'interno del gene, non dovuto a mutazioni puntiformi, come nel caso dei bovini, ma a una delezione di tre paia di basi (TGT), a livello della regione 3'UTR; precisamente nella zona compresa tra 3178-3180 del cDNA (Bernard et al., 2001). In questo caso la presenza del polimorfismo non è stata ancora associata ad alcun effetto sulla produzione quantitativa o qualitativa di latte,

Negli ovini il gene SCD è localizzato a livello del ventiduesimo cromosoma e, come per la capra, la sua struttura non è ancora nota completamente. Attualmente è conosciuta la sequenza del cDNA che è lungo 1986 bp. La sequenza aminoacidica del SCD ovino mostra una similarità del 93% con la SCD1 di ratto, uomo e bovino (Ward et al., 1998). Uno studio condotto su una popolazione di reincrocio Sarda x Lacaune ha evidenziato la presenza di un QTL sul cromosoma 22 che influenza in maniera significativa il rapporto acido rumenico/acido vaccenico. Dato che il gene SCD nella pecora è localizzato sul cromosoma 22 e che l'acido vaccenico rappresenta uno dei substrati dell'enzima SCD, è stato ipotizzato che il QTL sia associato allo stesso gene SCD (Daniel et al., 2003).

Il gene SCD è uno dei pochi, insieme con quello DGAT1 per il quale è stato dimostrato un polimorfismo genetico associato con variazioni significative nella produzione di grasso nel latte e nella carne. Questo fatto induce a considerare questi due geni come candidati per l'individuazione di marcatori molecolari da utilizzare ai fini della selezione.

Per quanto riguarda la produzione di carne bovina, diversi studi hanno utilizzato l'approccio del gene candidato per l'identificazione di marcatori associati a diverse caratteristiche produttive. In particolare, per il gene miostatina, scelto sulla base del fatto che l'inibizione del gene determina un aumento delle masse muscolari nel topo, sono state identificate diverse mutazioni associate all'ipertrofia muscolare caratteristica di alcune razze da carne tra cui la razza Piemontese e la razza Marchigiana (Kambadur et al., 1997; McPherron e Lee, 1997; Marchitelli et al., 2003). Diversi altri studi hanno analizzato i geni dell'asse dell'ormone della crescita per identificare associazioni tra marcatori e quantità e qualità della carne (es: Di Stasio et al., 2005). Per quanto riguarda il suino l'approccio del gene candidato è stato utilizzato, ad esempio, per identificare marcatori associati con caratteristiche qualitative della carne. In particolare, per il potenziale glicolitico e l'attività catepsinica, che rappre-

sentano parametri qualitativi importanti per la trasformazione delle cosce in prosciutti, sono stati studiati una serie di geni coinvolti rispettivamente nel metabolismo energetico (Fontanesi et al., 2003) e nella proteolisi enzimatica del muscolo (Russo et al., 2002).

Genomica funzionale

Il grande numero di sequenze di DNA, ottenute attraverso la produzione di EST (Expressed Sequence Tag) e mediante il sequenziamento sistematico dei genomi, ha messo a disposizione della comunità scientifica una enorme quantità di informazioni che attendono, in molti casi, una più precisa caratterizzazione, per avere una maggiore comprensione sul possibile ruolo dei geni o dei segmenti cromosomici nei processi fisiologici che influenzano i caratteri di interesse produttivo. Per questi motivi, molti progetti di ricerca sono nati con l'obiettivo di analizzare il trascrittoma di diversi tessuti mediante l'analisi dell'espressione di singoli geni, famiglie geniche o del completo insieme dei geni di un particolare tessuto. Gli approcci disponibili per l'analisi dell'espressione genica sono vari e si differenziano per le tecniche su cui si basano e per il numero di geni che possono analizzare. Alcuni, come la Real-time PCR, analizzano un gene alla volta, altri analizzano il completo trascrittoma di un tessuto senza una conoscenza preventiva dei geni espressi (Differential display, DD-RT-PCR; Serial Analysis of Gene Expression, SAGE; Suppression Subtractive Hybridization, SSH) oppure partono dalla conoscenza preventiva di una parte o di tutti i geni espressi nel tessuto da analizzare (macroarray e microarray). Tuttavia, i microarray che hanno la caratteristica di poter analizzare migliaia di geni simultaneamente e, in virtù del fatto che diverse tecnologie microarray iniziano a essere disponibili per le varie specie di interesse zootecnico (Bendixen et al., 2005), saranno con molta probabilità il mezzo più utilizzato nei prossimi anni per lo studio dell'espressione genica. Già ora alcuni studi effettuati con microarray a cDNA nel suino, ad esempio, hanno permesso di evidenziare differenze di espressione di alcuni geni tra razze (Cagnazzo et al., 2006) o tra linee sottoposte a diverse strategie selettive (Caetano et al., 2004) aprendo nuove strade per lo studio di geni candidati per alcune caratteristiche produttive. Inoltre, con l'ausilio di queste tecnologie è possibile studiare l'effetto dei nutrienti sull'espressione dei geni e delle proteine o di investigare i meccanismi fisiologici e biochimici di adattamento che gli animali hanno sviluppato in risposta all'esposizione a differenti nutrienti, mettendo così in luce le varianti genetiche più favorevoli. Questa

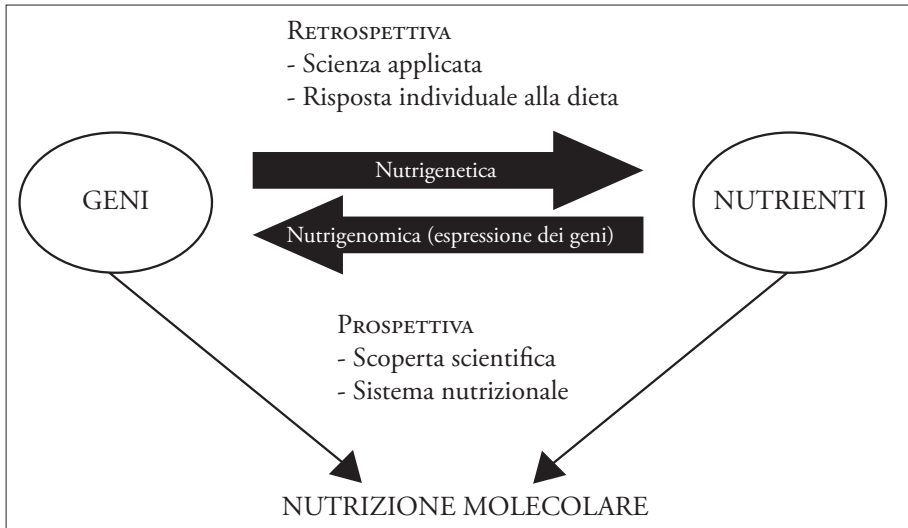


Fig. 5 *Nutrigenomica e nutrigenetica secondo Gillies (2003)*

nuova area di ricerca è spesso indicata come nutrigenomica, ovvero sia quella integrazione fra genomica funzionale, nutrizione, biochimica e fisiologia anche definita come nutrigenetica. In realtà con nutrigenomica si intende il ruolo assunto dai nutrienti rispetto alla regolazione dell'espressione dei geni, mentre per nutrigenetica si intende l'analisi delle variazioni genetiche tra individui in riferimento alla loro risposta clinica all'azione di nutrienti specifici (Gillies, 2003).

Lo studio della nutrigenomica in medicina umana è stato mutuato dalla farmacogenomica ed è stato finalizzato alla comprensione delle relazioni tra nutrizione e malattie. Nel campo delle scienze animali l'applicazione della nutrigenomica può essere rivolta alla riduzione e al controllo delle malattie infettive e metaboliche, attraverso l'uso di appropriati interventi nutrizionali in grado di mantenere l'omeostasi e di incrementare la risposta biologica degli organismi agli stimoli ambientali. Inoltre, la possibilità di arrivare a una migliore comprensione delle interazioni tra nutrienti e genoma può consentire di espandere le applicazioni della nutrigenomica al miglioramento delle performance produttive degli animali di interesse zootecnico. Infatti, anche se i nutrienti sono in gran parte metabolizzati a composti energetici o sono coinvolti nelle reazioni chiave del metabolismo (ad esempio le vitamine), alcuni composti naturalmente presenti negli alimenti possono agire direttamente sul genoma alterando l'espressione dei geni, oppure agire come leganti di

fattori di trascrizione o, ancora, influenzare indirettamente l'espressione genica, agendo come segnali del processo di traduzione proteica. Molti di questi composti, presenti nella dieta anche degli animali di interesse zootecnico, vengono definiti con il nome di nutraceutici e la loro azione è basata proprio sull'interazione con l'espressione dei geni (Jaiswal, 1999).

Lo sviluppo delle conoscenze sul genoma animale ha determinato anche un aumento degli studi riguardanti le basi genetiche delle principali malattie e dismetabolie degli animali da allevamento. I programmi di selezione dei paesi del Nord America e dell'Europa, infatti, per molti anni hanno dato particolare enfasi all'incremento delle capacità produttive degli animali, provocando una riduzione della variabilità genetica delle popolazioni e il peggioramento della capacità di adattamento delle stesse a condizioni ambientali non ottimali. Negli ultimi anni, invece, a causa del mutamento degli scenari politici ed economici, che hanno indirizzato la politica agricola comunitaria verso obiettivi legati alla sicurezza e alla qualità degli alimenti, ottenuti mediante sistemi di allevamento in grado di garantire il benessere degli animali, è stato dato un grande rilievo all'inserimento dei cosiddetti caratteri funzionali nell'ambito degli schemi di miglioramento genetico. Con questo termine si indica l'insieme di quei caratteri che agiscono sull'efficienza economica degli animali attraverso una riduzione dei costi di allevamento piuttosto che tramite un aumento delle loro capacità produttive (Groenen et al., 1997). Si tratta in pratica di caratteri fenotipici legati alle performance riproduttive, alla salute dell'animale e alla resistenza alle malattie, al consumo di alimenti e alla durata della carriera produttiva (Boettcher, 2005). Il numero e il tipo di fenotipi considerati varia considerevolmente da paese a paese in funzione sia delle razze allevate sia della metodologia con la quale viene definito il carattere (Mark, 2004). Alcuni esempi di caratteri funzionali per i bovini da latte sono riportati nella tabella 9.

Come evidenziato nella tabella 6, uno dei limiti della selezione per i caratteri funzionali è dato dal livello generalmente basso di ereditabilità, spesso accompagnato da una correlazione genetica negativa con i caratteri di produzione del latte (Kadarmideen, 2004). Inoltre, la misurazione con cadenza regolare di questi fenotipi, a volte basata su punteggi soggettivi derivanti anche da semplice osservazione diretta, risulta essere spesso difficile e costosa.

Malgrado questi limiti, l'importanza dei caratteri funzionali è generalmente riconosciuta da parte sia dei genetisti sia dell'intero settore lattiero caseario. Ne è una riprova quanto evidenziato in una recente rassegna riguardante 15 differenti paesi, in cui è stato messo in evidenza che l'enfasi relativa

GRUPPO	CARATTERE	EREDITABILITÀ	RIF. BIBLIOGRAFICO
Conformazione	Altezza	0,37	Dechow et al., 2003
	Heart girth	0,33	Gallo et al., 2001
Salute	Mastiti	0,03-0,11	Chang et al., 2004
	Punteggio cellule somatiche	0,14	Tsuruta et al., 2005
	Stato immunitario	0,20	Abdel-Azim et al., 2005
Longevità	Piedi e arti	0,15-0,17	Fatehi et al., 2003
	Lunghezza del periodo tra il primo parto e la riforma	0,04-0,10	Boettcher, 2005
	Vita produttiva	0,11	Tsuruta et al., 2005
Performance riproduttive	Facilità di parto	0,07	Luo et al., 1999
	Numero nati morti	0,09	Luo et al., 1999
	Lunghezza periodo parto-primo servizio	0,12	Kadarmideen, 2004
	Intervallo interparto	0,07	Muir et al., 2004
Efficienza produttiva	Tempo di mungitura	0,17	Zwald et al., 2005
	Punteggio di condizione corporea	0,22	Dechow et al., 2003
	Ingestione alimentare	0,35-0,51	Schenkel et al., 2004
	Persistenza	0,18	Muir et al., 2004
	Suscettibilità alla sindrome da depressione del grasso	0,5-0,4	Calus et al., 2005

Tab. 9 *Alcuni caratteri funzionali dei bovini da latte*

dei caratteri funzionali negli indici genetici aggregati ricopre mediamente un valore prossimo al 40% (Miglior et al., 2005).

Oltre alla selezione in purezza, possono essere prese in considerazione anche altre strategie per il miglioramento dei caratteri funzionali; ne è un esempio la scelta di molti allevatori di Holstein che, negli Stati Uniti, hanno iniziato a sperimentare l'incrocio per migliorare i caratteri di fertilità della mandria (Boettcher, 2005).

Per quanto riguarda i caratteri funzionali con bassa ereditabilità e per quelli difficili o costosi da rilevare, un aiuto potrà venire dall'applicazione della selezione assistita da marcatori (MAS). Negli ultimi anni, infatti, alcune ricerche hanno messo in evidenza l'esistenza di QTL che influenzano alcuni caratteri funzionali nei bovini da latte (Schrooten et al., 2000; Schnabel et al., 2005).

La selezione per i caratteri funzionali, infine, sembra essere un valido strumento anche in funzione dei nuovi obiettivi posti dalla politica agricola comu-

nitaria, quali il controllo dell'impatto ambientale degli allevamenti, il miglioramento del benessere animale e la salvaguardia della biodiversità (Nardone et al., 2004). Le strategie di selezione, inoltre, devono tenere in considerazione il numero crescente di aziende zootecniche che adottano sistemi di produzione biologici, che, nell'ultimo anno, è incrementato del 32%. È evidente, infatti, che vacche di elevato merito genetico hanno esigenze tali da far presupporre che si adattino meno facilmente ai sistemi di allevamento biologici (Boelling et al., 2003; Nauta et al., 2006). Al di là, pertanto, della necessità di ottimizzare l'ambiente di allevamento da parte degli allevatori, aumentare l'enfasi negli indici genetici di alcuni caratteri funzionali come la resistenza alle malattie, l'efficienza riproduttiva e l'efficienza di conversione degli alimenti, può rappresentare un valido strumento per adattare i programmi di selezione a queste nuove esigenze. In alcuni paesi del Centro-Nord Europa come l'Austria e la Svizzera, si è cominciato a sviluppare degli indici specifici per l'allevamento biologico che includono oltre a caratteri con un valore economico diretto anche altri che si riflettono su aspetti legati al benessere animale (Boelling et al., 2003; Nielsen et al., 2005).

Parallelamente a queste esigenze, sorte nei paesi più sviluppati, in altre parti del mondo, come in Africa, a causa dell'incremento della popolazione, che ha accresciuto il problema dell'alimentazione, si cercano nuove superfici per creare nuovi allevamenti. Esistono zone umide e sub-umide, infatti, che offrono opportunità per l'espansione dell'allevamento zootecnico, ma, purtroppo, i tipi genetici utilizzati per la produzione di carne e latte, ottenuti con le moderne tecniche di selezione, non sono resistenti alle malattie endemiche di queste zone e un loro allevamento diviene, pertanto, proibitivo (d'Ieteren and Kimani, 2001).

I paesi sviluppati e quelli in via di sviluppo sono chiamati, quindi, all'attuazione di una nuova rivoluzione genetica. I programmi di selezione devono essere orientati verso un uso sostenibile della variabilità genetica, cercando di perseguire i seguenti obiettivi: a) migliorare la salute, il benessere e la capacità di sopravvivenza delle specie domestiche; b) migliorare la qualità e la sicurezza dei prodotti zootecnici; c) favorire la salvaguardia di risorse genetiche che manifestano resistenza alle malattie.

Resistenza alle malattie

Quest'ultimo punto rappresenta uno dei più importanti obiettivi da rispettare, al fine di potere rendere disponibile per le future generazioni il patrimonio genetico delle razze autoctone e sfruttare così le loro caratteristiche di resi-

stenza e tolleranza alle malattie.

La resistenza è definita come la capacità di un individuo di ridurre lo sviluppo del patogeno, mentre la tolleranza rappresenta l'abilità nel tollerare l'infezione di un patogeno e resistere agli effetti della malattia. Gli animali d'allevamento presentano una suscettibilità alle malattie che differisce in maniera evidente sia a livello inter- che intra-specifico. La resistenza alle malattie può essere innata oppure indotta dopo la prima esposizione, in entrambi i casi, il fenomeno è sotto il controllo genetico. I caratteri della resistenza alle malattie, inoltre, possono essere il risultato di una differente espressione di varianti geniche o di fattori regolatori (Glass e Coussens, 2005).

Alcune razze bovine africane, presenti in regioni tropicali, esibiscono un grado di resistenza ad alcune malattie endemiche presenti in tali areali. Un esempio è il fenomeno della tripano-tolleranza. Le razze bovine N'Dama e West African Shorton sono capaci di sopravvivere a infezioni da tripanosomi, che sono fatali per altre razze. Questa tolleranza ereditaria permette ad alcune popolazioni di sopravvivere in regioni equatoriali dell'Africa orientale, infestate dalla mosca tse-tse, dove la recente introduzione di *Bos indicus* (zebù) e altro bestiame (ad esempio Boran) comporta notevoli costi per la difesa dai parassiti (Murray et al., 1982, 1991).

Anche nei nostri ambienti di allevamento esistono degli esempi del ruolo che le razze autoctone possono rivestire nell'ambito della resistenza alle malattie. È il caso della Puglia, dove sono state individuate otto razze autoctone, nell'ambito delle specie animali di interesse zootecnico, e sulle quali le difficili condizioni pedoclimatiche insieme ai parassiti ematofici, hanno esercitato una costante pressione selettiva che ha contribuito alla costituzione di pool genetici rustici e tolleranti nei confronti delle malattie veicolate da questi parassiti. A questo riguardo, è interessante sottolineare, come attraverso lo studio dei polimorfismi dell'emoglobina (Pieragostini et al., 1994; Scaloni et al., 1998; Pieragostini et al., 2000, 2002, 2003, 2005) sia stato possibile dimostrare che gli animali autoctoni pugliesi presentano un elevato polimorfismo quali-quantitativo a livello dei geni alfa e beta globinici e, in particolare, che la presenza di aplotipi con geni alfa globinici sovrannumerari è associata a un pattern ematologico simile a quello presente nella β talassemia umana e, come tale, possibile fonte di protezione contro i parassiti endoeritrocitari, agenti eziologici delle Tick Born Diseases (TBD). A ciò si deve aggiungere che la risposta di queste razze all'anemia, principale sintomo delle TBD, è mediamente più efficiente di quella di razze alloctone, come hanno dimostrato studi specifici condotti in parallelo

su gruppi di pecore di razza Altamurana e Romanov, nei quali l'anemia era stata artificialmente indotta (Pieragostini et al., 1999). Alla luce di queste considerazioni, si può comprendere come questi tipi genetici, "tolleranti", pur pagando un prezzo in termini economici alla patologia in parola, possano essere proficuamente utilizzati in territori particolarmente colpiti da queste malattie, capaci di causare epizootie devastanti a elevata mortalità nelle razze non tolleranti.

Biodiversità e produzioni tipiche

Un altro aspetto relativo alle razze autoctone è quello riguardante la conservazione della biodiversità animale la cui importanza è stata riconosciuta dalla convenzione di Rio de Janeiro del 1992 e in cui è impegnata anche l'UE e, di conseguenza, l'Italia e le regioni italiane.

A questi ecotipi sono spesso riferibili produzioni tipicamente legate alle loro caratteristiche fisioprodottrici; in questo modo se ne giustifica la conservazione in quanto, oltre a costituire esempi di armonico adattamento all'ambiente di allevamento, vedono rinnovato il loro ruolo quali fonti di prodotti tipici, che tanto spazio hanno presso l'opinione pubblica, insieme con quelli tradizionali.

CONCLUSIONI

In questa ampia sintesi introduttiva è stato riportato il quadro delle attività di miglioramento genetico che in dettaglio verranno approfondite nelle relazioni successive.

L'obiettivo che ci siamo proposti in questa giornata è, infatti, di far giungere un messaggio forte e oggettivamente motivato al mondo tecnico e imprenditoriale e a quello degli allevatori, che sono stati protagonisti, insieme con il mondo della ricerca, di quella che si può ormai considerare la storia del miglioramento genetico in Italia. Tale messaggio è esteso specialmente ai giovani ricercatori, che sono invitati a continuare le loro attività di studio e di ricerca, in collegamento con il settore degli allevatori, per affrontare i problemi aperti dai nuovi scenari delle "genetiche" in cui si articolerà il miglioramento genetico degli anni a venire.

RIASSUNTO

Negli ultimi vent'anni la zootecnia italiana è risultata uno dei settori più importanti nello sviluppo dell'agricoltura nazionale (oltre il 30% della PLV dell'agricoltura). Questi risultati sono la conseguenza di un intenso lavoro di selezione che ha accompagnato lo sviluppo delle conoscenze nei vari settori delle scienze zootecniche. La selezione animale si è sempre basata sulle metodologie della genetica quantitativa, che ha come fondamento il modello infinitesimale. Attualmente, l'applicazione di nuovi modelli matematici e le nuove scoperte scientifiche hanno portato all'adozione di modelli di stima sempre più raffinati e precisi (BLUP, Test Day model, Random Regression Test Day model). Inoltre, lo sviluppo delle tecnologie di genetica molecolare ha permesso di ottenere informazioni sul genoma della specie animali, con particolare riguardo all'individuazione di marcatori del DNA. Grazie a questi strumenti è stato possibile avviare un sistema di selezione basato su marcatori (MAS), che si fonda sull'individuazione di *loci* aventi effetto sui caratteri quantitativi, i QTL. La selezione in zootecnia non può prescindere da quelle che sono le esigenze odierne, salute degli animali e qualità e sicurezza degli alimenti; ecco perché si sono aggiunti gli studi sulla nutrigenomica e la selezione per la resistenza alle malattie.

ABSTRACT

Economic data showed productive increase in national and international agriculture. Livestock-breeding has given an important effect for this positive trend; today it represents over the 30% of agriculture PLV). These effects were obtained thanks to genetic selection, which was based on quantitative genetic methodologies, especially infinitesimal mathematical model. At present, new mathematical models and scientific discoveries have favoured the development of more precisely estimated models (BLUP, Test Day model, Random Regression Test Day model). Moreover, molecular genetic knowledge permits to increase the information on the genome of the farm animal species. In practise the selection of animal was based on DNA markers information, known as marker assisted selection (MAS). MAS was applied thanks to the knowledge about quantitative traits, named QTL. Modern livestock selection needs of other factors to improve quality products, such as animal health, safety and quality of food; these purposes can be obtained, adding new sectors of the research, nutrigenomics and resistance diseases.

BIBLIOGRAFIA

- ABDEL-AZIM G.A., FREEMAN A.E., KEHRLI J.R. M.E., KELM S.C., BURTON J.L. (2005): *Genetic basis and risk factors for infectious and non infectious diseases in US Holsteins. I. Estimation of genetic parameters for single diseases and general health*, «Journal of Dairy Science», 88, pp. 1199-1207.
- ABE T., KOMATSU M., OISHI T., KAGEYAMA A. (1975): *Genetic polymorphism of milk proteins in Japanese Cattle and European Cattle breeds in Japan*, «Japanese Journal of Zootechnical Science», 46, pp. 591-599.

- ABU-ELHEIGA L., ALMARZA-ORTEGA D.B., BALDINI A., WAKIL S.J. (1997): *Human acetyl-CoA carboxylase 2 Molecular cloning, characterization, chromosomal-mapping and evidence for two isoform*, «J. Biol. Chem.», 272, pp. 10669-10677.
- ADAM D. (2002): *Draft cow genome heads the field*, «Nature», 417, p. 778.
- ALBUQUERQUE L.G., MEYER K. (2001): *Estimates of covariance functions for growth from birth to 630 days of age in Nelore cattle*, «J. Anim. Sci.», 79, pp. 2776-2789.
- AMIGO L., RECIO I., RAMOS M. (2000): *Genetic polymorphism of milk proteins: its influence on technological properties of milk a review*, «International Dairy Journal», 10, pp. 135-149.
- ANDERSSON L., HALEY C.S., ELLEGREN H., KNOTT S.A., JOHANSSON M., ANDERSSON K., ANDERSSON-EKLUND L., EDFORS-LILJA I., FREDHOLM M., HANSSON I. (1994): *Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs*, «Science», 263, pp. 1771-1774.
- ARCHIBALD A.L., HALEY C.S., BROWN J.F., COUPERWHITE S., MCQUEEN H.A., NICHOLSON D., COPPIETERS W., VAN DE WEGHE A., STRATIL A., WINTERO A.K., ET AL. (1995): *The PiGMAP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa)*, «Mamm. Genome», 6, pp. 157-175.
- ASCHAFFENBURG R. (1961): *Inherited casein variants in cow's milk*, «Nature», 192, pp. 431-432.
- ASCHAFFENBURG R. (1963): *Inherited casein variants in cow's milk. II. Breed differences in the occurrence of β -casein variants*, «Journal of Dairy Research», 30, pp. 251-258.
- ASCHAFFENBURG R., DREWRY J. (1955): *Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk*, «Nature», 176, pp. 218-219.
- BAGNATO A., SCHIAVINI F., DUBINI S., ROSSONI A., MALTECCA C., SANTUS E., DOLEZAL M., MEDUGORAC I., SÖLKNER J., RUSSO V., FRIEDMAN A., LIPKIN E., SOLLER, M. (2005): *The BovMAS Consortium: a complete genome scan for identification of QTL for milk yield and protein percent in the Brown Swiss breed*, «It. J. Anim. Sci.», 4, Suppl. 2, p. 118.
- BARENDSE W., VAIMAN D., KEMP S.J., SUGIMOTO Y., ARMITAGE S.M., WILLIAMS J. L., SUN H.S., EGGEN A., AGABA M., ALEYASIN S.A., BAND M., BISHOP M.D., BUTTKAMP J., BYRNE K., COLLINS F., COOPER L., COPPETTIERS W., ET AL. (1997): *A medium-density genetic linkage map of the bovine genome*, «Mamm. Genome», 8, pp. 21-28.
- BEHROUZIAN B., BUIST P.H. (2003): *Mechanism of fatty acid desaturation: a bioorganic perspective*, «Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids», 68, pp.107-112.
- BENDIXEN C., HEDEGAARD J., HORN P. (2005): *Functional genomics in farm animals – Microarray analysis*, «Meat Science», 71, pp.128-137.
- BERNARD L., LEROUX C., HAYES H., GAUTIER M., CHILLIARD Y., MARTIN P. (2001): *Characterization of the caprine stearoyl-CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon*, «Gene», 281, pp. 53-61.
- BOELLING D., GROEN A.F., SORENSSEN P., MADSEN P., JENSEN J. (2003): *Genetic improvement of livestock for organic farming systems*, «Livest. Prod. Sci.», 80 pp. 79-88.
- BOETTCHER P. (2005): *Breeding for improvement of functional traits in dairy cattle*, «Italian Journal of Animal Science», 4 Suppl. 3, pp. 7-16.
- BOHMANOVA J., MISZTAL I., BERTRAND J.K. (2005): *Studies on multiple trait and random regression models for genetic evaluation of beef cattle for growth*, «J. Anim. Sci.», 83, pp. 62-67.

- BOVENHUIS H., VAN HARENDONK J.A.M. (1991): *Estimation of milk protein gene frequencies in crossbred cattle by maximum likelihood*, «Journal of Dairy Science», 74, pp. 2728-2736.
- BOVENHUIS H., SPELMAN R.J. (2000): *Selective genotyping to detect quantitative trait loci for multiple traits in outbred populations*, «Journal of Dairy Science», 83, pp. 173-180.
- BUMSTEAD N., PALYGA J. (1992): *A preliminary linkage map of the chicken genome*, «Genomics», 13, pp. 690-697.
- CAETANO A.R., JOHNSON R.K., FORD J.J., POMP D. (2004): *Microarray profiling for differential gene expression in ovaries and ovarian follicles of pigs selected for increased ovulation rate*, «Genetics», 168, pp. 1529-1537.
- CAGNAZZO M., TE PAS M. F., PRIEM J., DE WIT A.A., POOL M.H., DAVOLI R., RUSSO V. (2006): *Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of two pig breeds differing in muscle characteristics*, «J. Anim. Sci.», 84, pp.1-10.
- CALUS M.P.L., CARRICK M.J., VEERKAMP R.F., GOODARD M.E. (2005): *Estimation of genetic parameters for milk fat depression in dairy cattle*, «Journal of Dairy Science», 88, pp. 1166-1178.
- CAPPIO-BORLINO A., PULINA G., ROSSI G. (1995): *A non-linear modification of Wood's equation fitted to lactation curves of Sardinian dairy ewes*, «Small Ruminant Research», 18, pp. 75-79.
- CARTA A., BARILLET F., CASU S., CRIBIU E.P., ELSER J.M., FRAGHI A., MURA L., SCHIBLER L. (2003): *A genome scan to detect QTL affecting dairy traits in a dairy sheep backcross Sarda x Lacune population*, «It. J. Ani. Sci.» 2, Suppl. 1, pp. 31-33.
- CASES S., STONE S.J., ZHOU P., YEN E., TOW B., LARDIZABAL K.D., VOELKER T., FARESE R.V. (2001): *Cloning of DGAT2, a Second Mammalian Diacylglycerol Acyltransferase, and Related Family Members*, «The Journal of Biological Chemistry», 276, pp. 38870-38876.
- CHANG Y.M., GIANOLA D., HERINGSTAD B., KLEMETSDAL G. (2004): *Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle*, «Livestock Production Science», 88, pp. 251-261.
- CHOWDHARY B.P., RAUDSEPP T., HONEYCUTT D., OWENS E.K., PIUMI F., GUERIN G., MATISE T.C., KATA S.R., WOMACK J.E., SKOW L.C. (2002): *Construction of a 5000 (rad) whole-genome radiation hybrid panel in the horse and generation of a comprehensive and comparative map for ECA11*, «Mamm. Genome», 13, pp. 89-94.
- CHUNG E.R., HAN S.K., RHIM T.J. (1995): *Milk protein polymorphisms as genetic marker in Korean native cattle*, «Asian-Australasian Journal Animal Sciences», 8, pp. 187-194.
- CRAWFORD A.M., DODDS K.G., EDE A.J., PIERSON C.A., MONTGOMERY G.W., GARMONSWAY H.G., BEATTIE A.E., DAVIES K., MADDOX J.F., KAPPES S.M., STONE R.T., NGUYEN T.C., PENTY J.M., LORD E.A., BROOM J.E., BUITKAMP J., SHWAIGER W., EPLEN J.T., MATTHEW P., MATTHEWS M.E., HULME D.J., BEH K.J., MCGRAW R.A., BEATTIE C.W. (1995): *An autosomal genetic linkage map of the sheep genome*, «Genetics», 140, pp. 703-724.
- CREAMER L.K., RICHARDSON B.C. (1975): *A new genetic variant of β -casein*, «New Zealand Journal of Dairy Science and Technology», 10, pp. 170-171.
- DANIEL Z.T.C.R., WYNN R.J., SALTER A.M., BUTTERY P.J. (2004): *Differing effects of forage and concentrate diets on the oleic acid and conjugated linoleic acid content of sheep tissues: The role of stearoyl-CoA desaturase*, «Journal of Animal Science», 82, pp. 747-758.
- DAVOLI R., FONTANESI L., ZAMBONELLI P., BIGI D., GELLIN J., YERLE J., MILC J., BRAGLIA S., CENCI V., CAGNAZZO M., RUSSO V. (2002): *Isolation of porcine expressed sequence tags for the construction of a first genomic transcript map of the skeletal muscle in*

- pig, «Anim. Genet.», 33, pp. 3-18.
- DECHOW C.D., ROGERS G.W., KLEI L., LAWLOR T.J. (2003): *Heritabilities and Correlations Among Body Condition Score, Dairy Form and Selected Linear Type Traits*, «Journal of Dairy Science», 86, pp. 2236-2242.
- DE GORTARDI M.J., FREKING B.A., CUTHBERTSON R.P., KAPPES S.M., KEELE J.W., STONE R.T., LEYMASTER K.A., DODDS K.G., CRAWFORD A.M., BEATTIE C.W. (1998): *A second-generation linkage map of the sheep genome*, «Mamm. Genome», 9, pp. 204-209.
- DEKKERS J.C.M. (2004): *Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons*, «Journal of Animal Science», 82, E. Suppl., pp. E313-E328.
- DEKKERS J.C.M., HOSPITAL F. (2002): *The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations*, «Nature Review Genetics», 3, pp.22-32.
- D'ETEREN G., KIMANI.K. (2001): *Indigenous genetic resources: a sustainable and environmentally friendly option for livestock production in areas at risk from trypanosomes*, «Science in Africa», 1: http://www.sciencein africa.co.za/ndama_full.htm.
- DI STASIO L., MERLIN P. (1978): *A new k-casein variant in cattle*, Proceedings XVIth Intern. Conf. Animal Blood Grps and Biochem. Polimorph., Leningrad, USSR, p. 97.
- DI STASIO L., DESTEFANIS G., BRUGIAPAGLIA A., ALBERA A., ROLANDO A. (2005): *Poly-morphism of the GHR gene in cattle and relationships with meat production and qualità*, «Anim. Genet.», 36, pp. 138-140.
- ELLEGREN H., CHOWDHARY B., JOHANSSON M., ANDERSSON L. (1994): *A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of recombination*, «Genetics», 137, pp. 1089-1100.
- ERHARDT G. (1993): *A new α 1-casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds*, «Animal Genetics», 24, pp. 65-66.
- ERHARDT G. (1996): *Detection of a new k-casein variant in milk of Pinzgauer cattle*, «Animal Genetics», 27, pp. 105-107.
- ERHARDT G. (1989): *k-Kaseine in Rindermilch – Nachweis eines weiteren Allels (CASKE) in verschiedenen Rassen*, «Journal of Animal Breeding and Genetics», 106, pp. 225-231.
- ERHARDT G., DÖRING C., SENFT B., GRANDKE R. (1992): *A new α 1-casein variant in cow's milk*. Intern. Soc. Anim. Gen. (I.S.A.G.) Conference, Interlaken (Switzerland) 3-7 August 1992.
- ERHARDT G., SENFT B. (1989): *Integration of milk protein variants in bovine breeding programmes using an economical screening method*, «Animal Genetics» 20, Suppl. 1, p. 61.
- FALCONER D.S., MACKAY T.F. (1996): *Introduction to quantitative genetics*, Longman, Essex, England.
- FATEHI J., STELLA A., SHANNON J.J., BOETTCHER P.J. (2003): *Genetic Parameters for Feet and Leg Traits Evaluated in Different Environments*, «Journal of Dairy Science», 86, pp. 661-666.
- FERRETTI L., LEONE P., SGARAMELLA V. (1990): *Long range restriction analysis of the bovine casein genes*, «Nucleic Acids Research», 18, pp. 6829-6833.
- FONTANESI L., DAVOLI R., NANNI COSTA L., SCOTTI E., RUSSO V. (2003): *Study of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: identification and analysis of mutations, linkage and physical mapping and association with meat quality traits in pigs*, «Cytogenet. Genome Res.», 102, pp. 145-151.
- GALLO L., CARNIER P., CASSANDRO M., DAL ZOTTO R., BITTANTE G. (2001): *Test day genetic analysis of condition score and heart girth in Holstein friesian cows*, «Journal of Dairy Science», 84, pp. 2321-2326.

- GEORGES M., NIELSEN D., MACKINNON M., MISHRA A., OKIMOTO R., PASQUINO A.T., SARGEANT L.S., SORENSSEN A., STEELE M.R., ZHAO X., WOMACK J.E., HOESCHELE I. (1995): *Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing*, «Genetics», 139, pp. 907-920.
- GILLIES P.J. (2003): *Nutrigenomics: The rubicon of molecular nutrition*, «J. American Dietetic Assoc.», suppl., 103, pp. S50-S55.
- GLASS E.J.; COUSSENS P.M. (2005): *Functional genomics of host-pathogen interactions in species of veterinary importance*, «Vet. Immunol. Immunopathol.», 105, pp. 173-174.
- GOOTWINE E., ZENU A., BOR A., YOSSAFI S., ROSOV A., POLLOTT G.E. (2001): *Genetic and economic analysis of introgression of the B allele of the FecB (Booroola) gene into the Awassi and Assaf dairy breeds*, «Livestock Production Science», 71, pp. 49-58.
- GORODETSKIY S.I., KALEDIN A.S. (1987): *Analysis of nucleotide sequence of bovine k-casein*. «Genetika», USSR, 23, 4, pp. 596-604.
- GRISART B., COPPIETERS W., FARNIR F., KARIM L., FORD C., BERZI P., CAMBISANO N., MNI M., REID S., SIMON P., SPELMAN R., GEORGES M., SNELL R. (2000): *Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine DGAT1 Gene with Major Effect on Milk Yield and Composition*, «Genome Research», 12 pp.
- GRISART B., FARNIR F., KARIM L., CAMBISANO N., KIM J.J., KVASZ A., MNI M., SIMON P., FRÈRE J.M., COPPIETERS W., GEORGES M. (2004): *Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition*, «PNAS», 101, pp. 2398-2403.
- GROENEN M.A., CHENG H.H., BUMSTEAD N., BENKEL B.F., BRILES W.E., BURKE T., BURT D.W., CRITTENDEN L.B., DODGSON J., HILLEL J., LAMONT S., DE LEON A.P., SOLLER M., TAKAHASHI H., VIGNAL A. (2000): *A consensus linkage map of the chicken genome*, «Genome Res.», 10, pp. 137-147.
- GROENEN M.A., CROOIJMANS R.P., VEENENDAAL A., CHENG H.H., SIWEK M., VAN DER POEL J.J. (1998): *A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome*, «Genomics», 49, pp. 265-274.
- GROSCLAUDE F. (1975): *Variants génétiques des protéines du lait de vaches mongoles*, «Études Mongoles, Cahier du Centre d'études mongoles, Laboratoire d'Éthnologie, Université de Paris X – Nanterre», 6, pp. 81-83.
- GROSCLAUDE F., JOUDRIER P., MAHÉ M.F. (1978): *Polymorphisme de la caséine α_2 bovine: étroite liaison du locus α_2 -Cn avec les loci α_1 -Cn, β -Cn et CASK; mise en évidence d'une délétion dans le variant α_2 -CnD*, «Annales de Génétique et de Sélection Animale», 10, pp. 313-327.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., MERCIER J.C. (1974): *Comparaison du polymorphisme génétique des lactoprotéines du zébu et des bovins*, «Annales de Génétique et de Sélection Animale», 6, pp. 305-329.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., MERCIER J.C., BONNEMAIRE J., TEISSIER J.H. (1976): *Polymorphisme des lactoprotéines de Bovinés Népalais. I. Mise en évidence, chez le yak, et caractérisation biochimique de deux nouveaux variants: β -Lactoglobuline Dyak et caséine α_1 -E*, «Annales de Génétique et de Sélection Animale», 8, pp. 461-479.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., MERCIER J.C., BONNEMAIRE J., TEISSIER J.H. (1976): *Polymorphisme des lactoprotéines de Bovinés Népalais. II. Polymorphisme des caséines " α -mineures"; le locus α_2 -Cn est-il lié aux loci α_1 -Cn, β -Cn et CASK?*, «Annales de Génétique et de Sélection Animale», 8, pp. 481-491.
- GROSCLAUDE F., PUJOLLE J., GARNIER J., RIBADEAU-DUMAS B. (1966): *Mise en évidence*

- de deux variants supplémentaires des protéines du lait de vache: α 1-CnD et IgD*, «Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique», 6, pp. 215-222.
- HAN S.K., CHUNG E.Y., LEE K.M. (1983): *Studies on the genetic polymorphism of milk proteins in Korean Cattle*, Proceedings 5th World Conference of Animal Production, Tokyo, Japan, August 14-19, 2, pp. 51-52.
- HAN S.K., SHIN Y.C. (1996): *Biochemical characterization of the new β -casein variant in Korean Cattle*, Proceedings XXVth International Conference on Animal Genetics, Tours, France, 21-25 July p. 144.
- HANSEN L.B. (2000): *Consequences of selection for milk yield from a geneticists viewpoint*, «Journal of Dairy Science», 83, pp. 1145-1150.
- HASSEN A., WILSON D.E., ROUSE G.H. (2003): *Estimation of genetic parameters for ultrasound-predicted percentage of intramuscular fat in Angus cattle using random regression models*, «J. Anim Sci.», 81, pp. 35-45.
- HAZEL L.N. (1943): *The genetic basis or constructing selection indices*, «Genetics», 28, pp. 476-490.
- HEINEMANN F.S., OZOLS J. (2003): *Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms*, «Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids», 68, pp. 123-133.
- HENDERSON C.R. (1975): *Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model*, «Biometrics», 9, pp. 226-252.
- HENDERSON C.R. JR. (1982): *Analysis of covariance in the mixed model: higher level, non-homogeneous, and random regression*, «Biometrics», 38, pp. 623-640.
- HU Z.L., DRACHEVA S., JANG W., MAGLOTT D., BASTIAANSEN J., ROTHSCHILD M.F., REECY J.M. (2005): *A QTL resource and comparative tool for pigs: PigQTLDB*, «Mamm. Genome», 16, pp. 792-800.
- INEA (2005): *L'Italia Conta*.
- IKONEN T., RUOTTINEN O., ERHARDT G., OJALA M. (1996): *Allele frequencies of the major milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new k-casein variant*, «Animal Genetics», 27 pp. 179-181.
- INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2004): *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution*, «Nature», 432, pp. 695-717.
- JAMROZIK J., SCHAEFFER L.R. (1997): *Estimates of genetic parameters for a test day model with random regressions for yield traits of first lactation holsteins*, «J. Dairy Sci.», 80, pp. 762-770.
- JAISWAL A.K. (1998): *Antioxidant Response Element (ARE) and the regulation of gene expression*, «Pro. Nutrition Soc.», 57, pp.301-305.
- JENSEN J. (2001): *Genetic evaluation of dairy cattle using test-day models*, «Journal of dairy Science», 84, pp. 2803-2812.
- JEON J.T., AMARGER V., ROGEL-GAILLARD C., ROBIC A., BONGCAM-RUDLOFT E., PAUL S., LOOFT C., MILAN D., CHARDON P., ANDERSSON L. (2001): *Comparative analysis of a BAC contig of the porcine RN region and the human transcript map: Implications for the cloning of trait loci*, «Genomics», 72, pp. 297-303.
- KADARMIDEEN H.N. (2004): *Genetic correlations among body condition score, somatic cell score, milk production, fertility and conformation traits in dairy cows*, «Animal Science», 79, pp. 191-201.
- KAPPE S.M., KEELE J.W., STONE R.T., MCGRAW R.A., SONSTEGARD T.S., SMITH T.P., LOPEZ-CORRALES N.L., BEATTIE C.W. (1997): *A second-generation linkage map of the bovine genome*, «Genome Research», 7, pp. 235-249.

- KETTUNEN A., MANTYSAARI E., POSO J. (2000): *Estimation of genetic parameters for daily milk yield of primiparous Ayrshire cows by random regression test day models*, «Livest. Prod. Sci.», 66, pp. 251-261.
- KHATKAR M.S., THOMSON P.C., TAMMEN I., RAADSMA H. (2004): *Quantitative trait loci in dairy cattle: review and meta-analysis*, «Genetic Selection Evolution», 36, pp. 163-190.
- KHATKAR M.S., THOMSON P.C., TAMMEN I., RAADSMA H.W. (2004): *Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis*, «Genet. Sel. Evol.», 36, pp. 163-190.
- KIDDY C.A., PETERSON R.F., KOPFLER F.C. (1966): *Genetic control of the variants of β -casein A*, «Journal of Dairy Science», 49, p. 742 (abstr.).
- KIDDY C.A., THOMPSON M.P., JOHNSTON J.O., PEPPER L. (1963): *Genetic control of α s and β -casein*, «Journal of Dairy Science», 46, pp. 626-627.
- KIM K.H., LOPEZ-CASILLAS F., BAI D.H., LUO X., PAPE M.E. (1989): *Role of reversible phosphorylation of acetyl CoA carboxylase in long chain fatty acids synthesis*, «FASEB J.», 3, pp.2250-2256.
- KIM K.H., TAE H.J. (1994): *Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression*, «J. Nutrition», 124, pp. 1273S-1283S.
- KIRKPATRICK M., LOFSVOLD D., BULMER M. (1990): *Analysis of the inheritance, selection and evolution of growth trajectories*, «Genetics», 124, pp. 979-993.
- KRAUSE I., BUCHBERGER J., WEISS G., KLOSTERMEYER H. (1988): *Screening methods for genetic variants of milk proteins*, in *Milk Proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects*, C.A. Barth and E. Schlimme (Eds.), Steinkopff Verlag, Darmstadt, Germany, pp. 171-173.
- LAMONT S. J., LAKSHMANAN N., PLOTSKY Y., KAISER M. G., KUHN M., ARTHUR J. A., BECK N. J., O'SULLIVAN N.P. (1996): *Genetic markers linked to quantitative traits in poultry*, «Anim. Genet.», 27, pp. 1-8.
- LEONE P., SCALTRITI V., SANGALLI S., CAROLI A., PAGNACCO G. (1998): *Polimorfismo della k-caseina nei bovini: identificazione dell'allele E in torrelli di razza Bruna e Frisone Italiana*, Proceedings IVth National Congress Biodiversity, Alghero, Italy, 8-11 September.
- LEVIN I., SANTANGELO L., CHENG H., CRITTENDEN L.B., DODGSON J.B. (1994): *An autosomal genetic linkage map of the chicken*, «Journal of Heredity», 85, pp. 79-85.
- LIEN S., ROGNE S. (1993): *Bovine casein haplotypes: number, frequencies and applicability as genetic markers*, «Animal Genetics», 24, pp. 373-376.
- LINDGREN G., SANDBERG K., PERSSON H., MARKLUND S., BREEN M., SANDGREN B., CARLSTEN J., ELLEGREN H. (1998): *A primary male autosomal linkage map of the horse genome*, «Genome Research», 8, pp. 951-966.
- LUO M.F., BOETTCHER P.J., DEKKERS J.C.M., SCHAEFFER L.R. (1999): *Bayesian Analysis for Estimation of Genetic Parameters of Calving Ease and Stillbirth for Canadian Holsteins*, «Journal of Dairy Science», p. 1848.
- LUSH J.L. (1937): *Animal Breeding Plans*, Iowa State University Press, Ames, USA.
- MACCIOTTA N.P.P., VICARIO D., CAPPIO-BORLINO A. (2005): *Detection of different shapes of lactation curve for milk yield in dairy cattle by empirical mathematical models*, «Journal of Dairy Science», 88, pp. 1178-1191.
- MADDOX J.F., DAVIES K.P., CRAWFORD A.M., HULME D.J., VAIMAN D., CRIBIU E.P., FREKING B.A., BEH K.J., COCKETT N.E., KANG N., RIFFKIN C.D., DRINKWATER R., MOORE S.S., DODDS K.G., LUMSDEN J.M., VAN STIJN T.C., PHUA S.H., ADELSON D.L., BURKIN H.R.,

- BROOM J.E., BUTTKAMP J., CAMBRIDGE L., CUSHWA W.T., GERARD E., GALLOWAY S.M., HARRISON B., HAWKEN R.J., HIENDLEDER S., HENRY H.M., MEDRANO J.F., PATERSON K.A., SCHIBLER L., STONE R.T., VAN HEST B. (2001): *An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci*, «Genome Res.», 11, pp. 1275-1289.
- MAHÉ M.F., MIRANDA G., QUEVAL R., BADO A., ZAFINDRAJONA P.S., GROSCLAUDE F. (1999): *Genetic polymorphism of milk proteins in African Bos taurus and Bos indicus populations. Characterization of variants as1-Cn H and CASK*, «J. Genetics Selection Evolution», 31, pp. 239-253.
- MARCHITELLI C., BAVARESE M. C., CRISÀ A., NARDONE A., AJMONE-MARSAN P., VALENTINI A. (2003): *Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene*, «Mamm. Genome», 14, pp. 392-395.
- MARIANI P. (1983): *Sulla presenza di una terza k-caseina nel latte di vacche di razza Bruna*, «Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia», 34, pp. 174-181.
- MARK T. (2004): *Applied genetic evaluation for production and functional traits in dairy cattle*, «Journal of Dairy Science», 87, pp. 2641-2652.
- MARKLUND L., JOHANSSON MOLLER M., HØYHEIM B., DAVIES W., FREDHOLM M., JUNEJA R.K., MARIANI P., COPPIETERS W., ELLEGREN H., ANDERSSON L. (1996): *A comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig – Large White intercross*, «Anim. Genet.», 27, pp. 255-269.
- MEYER K. (1998): *Estimating covariance functions for longitudinal data using a random regression test day model*, «Genetic Selection Evolution», 30, pp. 221-240.
- MEYERS S.N., ROGATCHEVA M.B., LARKIN D.M., YERLE M., MILAN D., HAWKEN R.J., SCHOOK L.B., BEEVER J.E. (2005): *Piggy-BACing the human genome II. A high-resolution, physically anchored, comparative map of the porcine autosomes*, «Genomics», 86, pp. 739-752, in corso di stampa.
- MIGLIOR F., MUIR B.L., VAN DOORMAL B.J. (2005): *Selection indices in Holstein cattle of various countries*, «Journal of Dairy Science», 88, pp. 1255-1263.
- MIZSTAL I., STRABEL T., JAMROZIK J., MANTYSAARI E.A., MEUWISSEN T.H.E. (2000): *Strategies for estimating parameters needed for different test day models*, «Journal of Dairy Science», 83, pp. 1125-1134.
- MOIOLI B., NAPOLITANO F., ORRÙ L., CATILLO G. (2005): *Single nucleotide polymorphism detection in promoter I of the acetyl-CoA carboxylase- α gene in sheep*, «Small Ruminant Research», 59, pp. 49-53.
- MORISSON M., LEMIERE A., BOSC S., GALAN M., PLISSON-PETIT F., PINTON P., DELCROS C., FÈVE K., PITEL F., FILLON V., YERLE M., VIGNAL A. (2002): *ChickRH6: a chicken whole-genome radiation hybrid panel*, «Genet. Sel. Evol.», 34, pp. 521-533.
- MUIR L., FATEHI J., SCHAEFFER L.R. (2004): *Genetic Relationships Between Persistency and Reproductive Performance in First-Lactation Canadian Holsteins*, «Journal of Dairy Science», 87, pp. 3029-3037.
- MURPHY R.F., DOWNEY W.K. (1969): *Milk protein polymorphism in the Kerry breed of cattle*, «Journal of Dairy Science», 52, pp. 1113-1115.
- MURRAY M., MORRISON W.I., WHITELAW D.D. (1982): *Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance*, «Adv. Parasitol.», 21, pp. 1-68.
- MURRAY M., STEAR M.J., TRAIL J.C.M., D'ETEREN G.D.M., AGYEMANG K., DWINGER R.H. (1991): *Trypanosomiasis in cattle: prospects for control*, in *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*, Owen J.B., Axford R.F.E., (Eds.), CAB International, Oxon, pp. 203-234.
- NARDONE A., ZERVAS G., RONCHI B. (2004): *Sustainability of small ruminant organic*

- systems of production*. «Livestock Production Science», 90, pp. 27-39.
- NAUTA W.J., BAARS T., BOVENHUIS H. (2006): *Converting to organic dairy farming: consequences for production, somatic cell scores and calving interval of first parity Holstein cows*, «Livestock production Science», in corso di stampa.
- NEELIN J.M. (1964): *Variants of k-casein revealed by improved starch gel electrophoresis*, «Journal of Dairy Science», 47, pp. 506-509.
- NIELSEN H.M., CHRISTIENSEN L.G., GROEN A.F. (2005): *Derivation of sustainable breeding goals for dairy cattle using selection index theory*, «Journal of Dairy Science», 88, pp. 1882-1890.
- NTAMBI J.M., BENÉ H. (2001): *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression*, «Journal of Molecular Neuroscience», 16, pp. 273-278.
- PETERSON R.F., KOPFLER F.C. (1966): *Detection of new types of β -casein by polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH: a proposed nomenclature*, «Biochemical and Biophysical Research Communications», 22, pp. 388-392.
- PIERAGOSTINI E., DARIO C., BUFANO G. (1994): *Hemoglobin phenotypes and hematological factors in Lecce sheep*, «Small Rum. Res.», 13, pp. 177-185.
- PIERAGOSTINI E., PETAZZI F. (1999): *Genetics and tolerance to tick-borne diseases in South Italy: experience in studying native Apulian and exotic sheep breed*, «Parassitologia», 41, Suppl. 1, pp. 89-94.
- PIERAGOSTINI E., SCALONI A., RULLO R., DI LUCCIA A. (2000): *Identical marker alleles in Podolic cattle (Bos taurus) and zebu (Bos indicus)*, «Comp.Biochem. Physiol.», B, 127, pp. 1-9.
- PIERAGOSTINI E., DI LUCCIA A., RULLO R., BOTTIGLIERI C. (2002): *Hemoglobin phenotypes in Murghese horse*, «Italian Journal of Animal Science», 1, pp. 159-163.
- PIERAGOSTINI E., PETAZZI F., DI LUCCIA A. (2003): *The relationship between the presence of extra alpha-globin genes and blood cell traits in Altamurana sheep*, «Genet. Sel. Evol.», 35, Suppl. 1, pp. S121-S133.
- PIERAGOSTINI E., RULLO R., SCALONI A., BRAMANTE G., DI LUCCIA A. (2005): *The alpha chains of goat hemoglobin: old and new variants*, «Comp.Biochem. Physiol.», B, 142/1, pp. 18-27.
- POLINENI P. (2004): *Developing a Web accessible integrated database and visualization tool for bovine quantitative trait loci*, Thesis of Master of Science, Texas A&M University.
- PONCE-CASTAÑEDA M.V., LÓPEZ-CASILLAS F., KIM K-H (1991): *SYMPOSIUM: Regulation of gene expression. Acetyl-CoA Carboxylase messenger ribonucleic acid metabolism in liver, adipose tissue and mammary glands during pregnancy and lactation*, «J. of Dairy Science», 74, pp. 4013-4021.
- POOL M.H., MEUWISSEN T.H.E. (1999): *Prediction of daily milk yields from a limited number of Test Days using Test Day models*, «J. Dairy Sci.», 82, pp. 1555-1564.
- POWELL P.L., VANRADEN P.M. (2003): *International dairy bull evaluation expressed on national, subglobal and global scales*, «Journal of Dairy Science», 85, pp. 1863-1868.
- PRINZENBERG E.M., ERHARDT G. (1999): *A new CSN3 allele in Bos indicus cattle is characterised by MspI PCR-RFLP*, «Animal Genetics», 30, p. 164 (abstr.).
- PRINZENBERG E.M., ERHARDT G. (1998): *High-resolution SSCP analysis reveals new alleles at the k-casein (CSN3) locus in Bos taurus and Bos indicus cattle*, Proceedings XXVIth International Conference Animal Genetics, 9-14 August, Auckland, New Zealand, p. 17.
- PTAK E., SCHAEFFER L.R. (1993): *Use of test day yields for genetic evaluations of dairy sires*

- and cows*, «Livest. Prod. Sci.», 34, pp. 23-34.
- RAMUNNO L., RANDO A., PAPPALARDO M., FIORELLA A., DI GREGORIO P., CAPUANO M., MASINA P. (1994): *Molecular analyses on quantitative alleles at goat β -Cn and cow α s1-Cn loci*, «Proceedings Società Italiana per il Progresso della Zootecnica», Milano, Italy, 29, pp. 233-240.
- RANDO A., MARIANI P., FIORELLA A., DI GREGORIO P., RAMUNNO L., MASINA P. (1995): *Un allele quantitativo della caseina α s1 di bovino*, «Proceedings Associazione Scientifica di Produzione Animale», Grado, Italy, 11, pp. 175-176.
- RANDO A., RAMUNNO L., DI GREGORIO P., FIORELLA A., DAVOLI R., MASINA P. (1993): *Localizzazione di siti polimorfi nella regione di DNA che contiene il gene della caseina α s1 di bovino*, «Proceedings Associazione Scientifica di Produzione Animale», Bologna, Italy, 10, pp. 617-620.
- REXOD C.E. 3RD, OWENS E.K., JOHNSON J.S., WOMACK J.E. (2000): *A 12,000 rad whole genome radiation hybrid panel for high resolution mapping in cattle: characterization of the centromeric end of chromosome 1*, «Anim. Genet.», 31, pp. 262-265.
- RIJNKELS M., KOOIMAN P.M., DE BOER H.A., PIEPER F.R. (1997): *Organization of the bovine casein gene locus*, «Mammalian Genome», 8, pp. 148-152.
- ROHRER G.A., ALEXANDER L.J., HU Z., SMITH T.P.L., KEELE J.W., BEATTIE C.W. (1996): *A comprehensive map of the porcine genome*, «Genome Res.», 6, pp. 371-391.
- RONNINGEN K., VAN VLECK L.D. (1985): *Selection index theory with practical applications. Ch. 10 in General and Quantitative Genetics*, A. B. Chapman Ed., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- RUSSO V., MARIANI P. (1978): *Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico, tecnologico e caseario*, «Rivista di Zootecnica e Veterinaria», 6, 5-6, pp. 289-304, pp. 365-379.
- RUSSO V., FONTANESI L. (2001): *Il miglioramento genetico animale: potenzialità dei metodi tradizionali e prospettive della genetica molecolare*, «Zootecnica e Nutrizione Animale», 27, pp. 253-284.
- RUSSO V., FONTANESI L., DAVOLI R., NANNI COSTA L., CAGNAZZO M., BUTTAZZONI L., VIRGILI R., YERLE M. (2002): *Investigation of candidate genes for meat quality in dry-cured ham production: the porcine cathepsin B (CTSB) and cystatin B (CSTB) genes*, «Anim. Genet.», 33, pp. 123-131.
- RUSSO V., FONTANESI L., ZAMBONELLI P., DALL'OLIO S., BIGI D., SCOTTI E., PECORARI D., BLASI M., MOTOVALIAN M., LANZA A., CANAVESI F., MEDUGORAC I., FÖRSTER M., LIPKIN E., SOLLER M., FRIEDMANN A., DOLEZAL M., SÖLKNER J., BAGNATO A., DAVOLI R. (2005): *The BovMAS Consortium : a whole genome scan for quantitative trait loci affecting milk yield and protein percentage in the Italian Holstein Friesian cattle breed by selective milk DNA pooling*, «It. J. Anim. Sci.», 4, Suppl. 2, p. 117.
- SCHAEFFER L.R., JAMROZIK J., KISTEMAKER G.J., VAN DOORMAL B.J. (2000): *Experience with a test day model*, «Journal of Dairy Science», 83, pp. 1135-1144.
- SCHAEFFER L.R. (2004): *Applications of random regression models in animal breeding*, «Livest. Prod. Sci.», 86, pp. 35-45.
- SCHENKEL F.S., DEVITT C.J.B., WILTON J.W., MILLER S. P., JAMROZIK J. (2004): *Random regression analyses of feed intake of individually tested beef steers*, «Livestock Production Science», 88, pp. 129-142.
- SCHNABEL R.D., SONSTEGARD T.S., TAYLOR J.F., ASHWELL M.S. (2005): *Whole genome scan to detect QTL for milk production, conformation, fertility and functional traits in two US Holstein families*, «Animal Genetics», 36, pp. 408-416.

- SCHROOTEN C., BOVENHIUS H., COPPIETERS W., VAN ARENDONK J. (2000): *Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle*, «Journal of Dairy Science», 83, pp. 795-806.
- SEIBERT B., ERHARDT G., SENFT B. (1987): *Detection of a new k-casein variant in cow's milk*, «Animal Genetics», 18, pp. 269-272.
- SIMM G. (1998): *Genetic improvement of dairy cattle and sheep*, Farming Press, Tonbridge, UK.
- SPELMAN R.J., FORD C.A., MCELHINNEY P., GREGORY G.C., SNELL R.G. (2002): *Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population*, «J. Dairy Sci.», 85, pp. 3514-3517.
- STANTON T.L., JONES L.R., EVERETT R.W., KACHMAN S. (1992): *Estimating milk, fat and protein lactation curves with a test day model*, «Journal of Dairy Science», 75, pp. 1691-1700.
- STONE R.T., KEELE J.W., SHACKELFORD S.D., KAPPES S.M., KOOHMARAIE M. (1999): *A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits*, «J. Anim. Sci.», 77, pp. 1379-1384.
- STRABEL T., SZYDA J., PTAK E., JAMROZIK J. (2005): *Comparison of random regression test day models for polish black and white cattle*, «Journal of Dairy Science», 88, pp. 3688-3699.
- SULIMOVA G.E., BADAGUEVA YU.N., UDINA I.G. (1996): *Polymorphism of the k-casein gene in populations of the subfamily Bovinae*, «Genetika», Moscow, 32, (11), pp. 1576-1582.
- SULIMOVA G.E., SOKOLOVA S.S., SEMIKOZOVA O.P., NGUET L.M., BERBEROV E.M. (1992): *Analysis of DNA polymorphism of clustered gene in cattle: casein genes and genes of the BoLA major histocompatibility complex*, «Tsitologiya i Genetika», 26, (5), pp. 18-26.
- SWALVE H.H. (2000): *Theoretical basis and computational methods for different test day genetic evaluation methods*, «Journal of Dairy Science», 83, pp. 1115-1124.
- SWINBURNE J., GERSTENBERG C., BREEN M., ALDRIDGE V., LOCKHART L., MARTI E., ANTCHAK D., EGGLESTON-SCOTT M., BAILEY E., MICKELSON J., ROED K., LINDGREN G., VON HAERINGEN W., GUERIN G., BJARNASON J., ALLEN T., BINNS M. (2000): *First comprehensive low-density horse linkage maps based on two 3-generation, full sibling, cross-bred horse reference families*, «Genomics», 66, pp. 123-134.
- TANIGUCHI M., UTSUGI T., OYAMA K., MANNEN H., KOBAYASHI M., TANABE Y., OGINO A., TSUJI S. (2004): *Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acids composition in Japanese Black cattle*, «Mammalian Genome Genes and Phenotypes», 14, pp. 142-148.
- THOMAS J.W., TOUCHMAN J.W., BLAKESLEY R.W., BOUFFARD G.G., BECKSTROM-STERNBERG S.M., MARGULIES E.H., BLANCHETTE M., SIEPEL A.C., THOMAS P.J., McDOWELL J.C., THOMAS J.W., ET AL. (2003): *Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions*, «Nature», 424, pp. 788-793.
- THOMPSON M.P., KIDDY C.A., PEPPER L., ZITTLE C.A. (1962): *Variations in the as-casein fraction of individual cow's milk*, «Nature», 195, pp. 1001-1002.
- TOSSEK-KLOPP G., BENNE F., BONNET A., MULSANT P., GASSER F., HATEY F. (1997): *A first catalog of gene involved in pig ovarian follicular differentiation*, «Mamm. Genome», 8, pp. 250-254.
- TSURUTA S., MIZSTAL I., LAWLOR T.J. (2005): *Changing definition of productive life in US Holsteins: effect on genetic correlations*, «Journal of Dairy Science», 88, pp. 1156-1165.
- VAIMAN D., SCHIBLER L., BOURGEOIS F., OUSTRY A., AMIGUES Y., CRIBIU E.P. (1996): *A genetic linkage map of the male goat genome*, «Genetics», 144, pp. 279-305.

- VAN KOAM J.B., GROENEN M.A., BOVENHUIS H., VEENENDAAL A., VEREIJKEN A.L., VAN ARENDONK J. A. (1999): *Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting growth and feed efficiency*, «Poult. Sci.», 78, pp. 15-23.
- VISSEER S., SLANGEN C.J., LAGERWERF F.M., VAN DONGEN W.D., HAVERKAMP J. (1995): *Identification of a new genetic variant of bovine β -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis*, «Journal of Chromatography», A, 711, pp. 141-150.
- VISSEER S., SLANGEN C.J., ROLLEMA H.S. (1972): *Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography*, «Journal of Chromatography», 548, pp. 361-370.
- VOGLINO G.F. (2000): *A new β -casein variant in Piedmont cattle*, «Animal Blood Groups and Biochemical Genetics», 3, pp. 61-62.
- WARD R.J., TRAVERS M.T., RICHARDS S.E., VERNON R.G., SALTER A.M., BUTTERY P.J., BARBER M.C. (1998): *Steroyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome*, «Biochimica et Biophysica Acta», 1391, pp. 145-156.
- WELLER J.L., KASHI Y., SOLLER M. (1990): *Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle*, «Journal of Dairy Science», 73, pp. 2525-2537.
- WERNERSSON R., SCHIERUP M.H., JØRGENSEN F.G., GORODKIN J., PANITZ F., STÆRFELDT H.H., CHRISTENSEN O.F., MAILUND T., HORNSHØJ H., KLEIN A., WANG J., LIU B., HU S., DONG W., LI W., WONG G.K.S., YU J., WANG J., BENDIXEN C., FREDHOLM M., BRUNAK S., YANG H., BOLUND L. (2005): *Pigs in sequence space: A 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing*, «BMC Genomics», 6, p. 70.
- WIGGANS G.R., GODDARD M.E. (1997): *A computationally feasible Test Day model for genetic evaluation of yield traits in the United States*, «J. Dairy. Sci.», 80, pp. 1795-1800.
- WINTER A., KRÄMER W., WERNER F.A.O., KOLLERS S., KATA S., DURSTEWITZ D., BUTKAMP J., WOMACK J.E., THALLER G., FRIES R. (2002): *Association of a lysine-232_alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content*, «PNAS», 99, pp. 9300-9305.
- WOMACK J. E., JOHNSON J. S., OWENS E. K., REXROAD C. E. 3RD, SCHLAPFER J., YANG Y. P. (1997): *A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping* «Mamm. Genome», 8, pp. 854-856.
- YANCOVICH A., LEWIN I., CAHANER HILLEL J. (1996): *Introgression of the avian naked gene assisted by DNA fingerprint*, «Animal Genetics», 27, pp. 149-155.
- YERLE M., ECHARD G., ROBIC A., MIRAL A., DUBUT-FONTANAT C., RIQUET J., PINTON P., MILAN D., LAHBIB-MANSAIS Y., GELLIN, J. (1996): *A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics*, «Cytogenet. Cell Genet.», 73, pp. 194-202.
- YERLE M., PINTON P., DELCROS C., ARNAL N., MILAN D., ROBIC A. (2002): *Generation and chracterization of a 12,000-rad radiation hybrid panel for fine mapping in pig*, «Cytogenet. Genome Res.», 97, pp. 219-228.
- YERLE M., PINTON P., ROBIC A., ALFONSO A., PALVADEAU Y., DELCROS C., HAWKEN R., ALEXANDER L., BEATTIE C., SCHOOK L., MILAN D., GELLIN J. (1998): *Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs*, «Cytogenet. Cell Genet.», 82, pp. 182-188.
- ZWALD N.R., WEIGEL K.A., CHANG Y.M., WELPER R.D., CLAY J.S. (2005): *Genetic eva-*

lation of dairy sires for milking duration using electronically recorded milking times of their daughters, «Journal of Dairy Science», 88, pp. 1192-1198.

GIULIO PAGNACCO*, ALESSANDRO BAGNATO*, FABIOLA CANAVESI**,
ANTONELLO CARTA***, MARTINO CASSANDRO****, ENRICO SANTUS*****

Latte: selezione tradizionale e assistita da marcatori

LE ORIGINI

I primi decenni dello scorso XX secolo hanno visto, nel campo del miglioramento genetico delle specie domestiche, l'avvio di metodi selettivi totalmente innovativi rispetto alle epoche precedenti. Metodi che hanno prodotto in pochi decenni risultati ben superiori a quelli accumulati nei secoli e millenni trascorsi dalla domesticazione neolitica. Le premesse di questa vera e propria rivoluzione nella selezione del bestiame sono naturalmente da ricercare nell'esplosione del pensiero scientifico e biologico che aveva preso avvio fin dall'Età dei Lumi (Lazzaro Spallanzani sperimenta per la prima volta la fecondazione artificiale nel cane alla fine del '700) per proseguire durante tutto l'Ottocento con studiosi del calibro di Malthus, Darwin, suo cugino Galton e Gregor Mendel. Le specie vegetali e animali vengono viste, da questo momento, come suscettibili di modificazioni, sono entità dinamiche, plasmabili sotto la pressione della selezione naturale, di esse è possibile documentare in molti casi la comparsa, la successiva evoluzione e la finale estinzione. Una visione naturalistica diametralmente opposta a quella imperante fino a quel momento: l'immutabile fissità delle specie così come create in origine dall'Onnipotente. Appare chiaro che, come è possibile ad esempio nel campo della meccanica domare la forza del vapore a beneficio del progresso umano, allo stesso modo

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

** *Associazione Nazionale Allevatori Frisone Italiana, Cremona*

*** *Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna, Olmedo, Sassari*

**** *Dipartimento di Scienze Animali, Agripolis, Università degli Studi di Padova*

***** *Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna, Verona*

deve essere possibile plasmare le specie e le razze domestiche verso le produzioni e i servizi necessari in una società moderna.

All'alba del 1900 giungono a maturazione fatti tecnici e osservazioni scientifiche che permettono un passo avanti sostanziale. La migliorata microscopia ottica lascia scorgere la duplicazione e la divisione di corpi colorati nel nucleo cellulare; le leggi di Mendel appena riscoperte suggeriscono a Morgan la teoria cromosomica dell'eredità; Hardy e Weinberg studiano la variabilità e la frequenza degli alleli nelle popolazioni dando nuova luce al pensiero di Darwin. Vi è materiale abbastanza perché Sewall Wright e Ronald A. Fisher affrontino, su basi matematiche rigorose, la trasmissione ereditaria di caratteri complessi. Tra questi, in primo luogo, quelli che, avendo una manifestazione quantitativa continua anziché quella discreta e qualitativa studiata da Mendel, danno più grattacapi nella loro comprensione.

Nasce in questo contesto scientifico il *modello infinitesimale*. Un modello di interpretazione della variabilità biologica continua che interessa qualsiasi naturalista, ma che diventa fondamentale per chi vuole conoscere la trasmissione delle caratteristiche produttive e quindi economiche delle piante e degli animali domestici. Le prime applicazioni di questo strumento furono concretizzate per le produzioni vegetali e solo con un certo ritardo se ne trovarono impieghi per quelle animali. Qui il pioniere fu J. L. Lush che con il suo celebre *Animal Breeding Plans* (1937) aprì la strada a una fertile esplosione di applicazioni in campo zootecnico. Ma non può essere dimenticato anche il contributo di Falconer con la *Introduction to Quantitative Genetics* (1960). Un modello, quello infinitesimale, che resta un semplice strumento di interpretazione e di previsione, non un fatto oggettivo osservabile al microscopio come la segregazione cromosomica. Un modello straordinario comunque, che dopo quasi un secolo continua a dimostrarsi estremamente efficiente nel generare miglioramento genetico nelle specie domestiche.

MODELLO INFINITESIMALE E MERITO GENETICO INDIVIDUALE

Il modello infinitesimale richiede pochi assunti di input. Lavora fondamentalmente sulla meccanica della trasmissione mendeliana dei caratteri semplici e sulle leggi che controllano la frequenza degli alleli ai singoli loci, come descritta dall'equilibrio di Hardy e Weinberg. Non è necessaria alcuna conoscenza della struttura e dell'organizzazione dei geni. Né sono necessarie informazioni su numero e frequenze di quelli che esercitano la loro influenza sul carattere di nostro interesse. Il modello infinitesimale nasce ben prima che

Watson e Crick svelino la struttura della doppia elica del DNA e paradossalmente non ha bisogno del DNA come oggi lo conosciamo per funzionare. Ecco i suoi aspetti salienti.

– I geni che controllano un carattere quantitativo, in base a questo modello, sono uniformemente distribuiti in tutto il genoma, ogni regione cromosomica ne porta un certo numero e di conseguenza una regione, in termini di contributo al fenotipo e alla sua variabilità, ha identico valore a quello di un'altra qualsiasi regione. E questo vale per tutti i possibili fenotipi misurabili su ogni individuo. Ne consegue che la somiglianza per qualsiasi carattere tra due individui è semplice e diretta funzione della proporzione di genoma che i due individui condividono: una proporzione ben calcolabile dalla loro parentela genealogica.

– Ogni gene presenta, in un dato individuo, due forme alleliche: una di provenienza paterna e l'altra materna; la frequenza di queste forme alleliche (geni) nella popolazione è sconosciuta. Il contributo singolo, in termini di effetto sul fenotipo, di ciascuna di queste forme alleliche si somma a quello di tutte le altre, presenti a tutti i geni, in una componente genetica (G) individuale. Questo contributo singolo a G , se da una parte è molto piccolo (appunto infinitesimale), dall'altra può avere un effetto positivo di incremento del carattere o negativo di decremento.

– In termini simbolici il modello infinitesimale descrive i fenotipi (caratteri) di nostro interesse in modo estremamente semplice: la misura quantitativa del fenotipo (P) operata sull'individuo i è pari alla media (μ) del fenotipo rilevata sull'intera popolazione cui deve essere aggiunta la deviazione (positiva o negativa) che descrive il merito genetico (G) di i e le condizioni ambientali che i ha avuto in sorte (E). In simboli:

$$P_i = \mu + G_i + E_i$$

– Affinando l'analisi, la componente G_i , che naturalmente è quella di maggiore interesse, può essere scomposta nell'effetto semplice infinitesimale (A_i) che ogni gene contribuisce nel determinare P_i e in altri effetti (D_i e I_i) che sono sempre di natura genetica, ma che sono costituiti da quelle che potremmo definire interazioni tra i geni e che caratterizzano la irripetibile combinazione individuale. Questi effetti genetici si creano *ex novo* al concepimento di ogni nuovo individuo senza che possano, per lo meno entro certi limiti, essere condivisi o trasmessi da un individuo all'altro. Ne consegue che la componente A_i rappresenta la somma (effetto appunto additivo) degli effetti dei singoli geni che esercitano la loro azione su un fenotipo e che in base alle leggi di Mendel

vengono per metà trasmessi da ogni genitore alla sua progenie. L'effetto additivo è un concetto ben conosciuto dagli allevatori ai quali è forse più noto col nome di valore riproduttivo o *Breeding Value*. In simboli:

$$G_i = A_i + D_i + I_i$$

– Il breeding value di un individuo ($BV_i = A_i$) in base al modello infinitesimale è quindi contenuto e nascosto nel suo fenotipo. Per enuclearlo da tutto il contorno degli altri effetti genetici e ambientali che lo nascondono sono necessari metodi matematici che trattino i fenotipi come variabili quantitative e ci permettano di ottenere da P_i almeno una stima di BV_i . La stima del BV individuale viene chiamata *Estimated Breeding Value* (EBV_i) e può essere calcolata per tutti gli animali che abbiano un fenotipo noto. Gli allevatori conoscono EBV anche col nome di indice di selezione, perché la scelta degli animali ossia la selezione viene operata proprio in base a questo indicatore. Chi per qualche ragione non ha un fenotipo noto può ottenere ugualmente un indice di *pedigree* mediando quello dei suoi genitori.

Il calcolo dell'indice di selezione degli animali che abbiano un fenotipo disponibile (ossia siano sotto controllo funzionale) ha quindi un ruolo centrale nella selezione basata sui cosiddetti metodi tradizionali. Nulla di strano quindi che questa tematica abbia costituito una palestra di indagine e di sperimentazione nella quale si siano cimentate le menti più brillanti del settore tra gli anni '40 e '90 del secolo scorso. Una circostanza, che però non deve essere dimenticata, è che in questo stesso periodo lo sviluppo dell'informatica rendeva disponibili progressivamente strumenti di calcolo sempre più potenti e in grado di realizzare elaborazioni che all'inizio erano solo ipotizzate in forma teorica o simbolica. Charles Henderson, allievo di Lush, fu il pioniere di questi studi e aprì la strada, attraverso una folta schiera di generazioni di suoi allievi, ai metodi di valutazione genetica che sono oggi ben noti a tutti gli allevatori, anche se con sigle magari poco chiare (BLUP, *Animal Model*, ecc.). La strada aperta da Henderson nel 1949 trovò il primo campo di applicazione nei bovini da latte e, in generale, è in questa specie che ha sviluppato le sue innovazioni più avanzate. Presto però la sua metodologia, che viene generalmente indicata come *metodologia del modello misto*, trovò modi di impiego in tutte le specie domestiche e per ogni tipo di produzione.

Il principio generale di funzionamento del modello misto è quello di enucleare (ossia stimare) il BV dal fenotipo di tutti gli animali di una certa popolazione simultaneamente attraverso la risoluzione di un sistema di equazioni.

Ogni sistema di equazioni prevede delle incognite da stimare a partire da dei termini noti. Qui i termini noti sono dati dalle produzioni controllate e le incognite sono di massima gli stessi elementi del modello infinitesimale descritto più sopra, con qualche precisazione in più circa la media (μ) che non è semplicemente una, quella della intera popolazione, ma sono molte e cioè quelle dei gruppi omogenei in cui gli animali sono funzionalmente riuniti. Il modello misto fu per la prima volta applicato in Nord America negli anni '70 per valutare il BV di poche centinaia di tori (e quindi altrettante equazioni) di un centro di fecondazione artificiale (la *Eastern Cooperative*) e viene oggi applicato in tutte le nazioni a zootecnia avanzata in forme estremamente evolute che includono animali di entrambi i sessi per diversi milioni di equazioni.

Ma il modello infinitesimale non è solo questo. Agli effetti individuali che il modello descrive corrispondono infatti varianze e covarianze che determinano altri fondamentali elementi di comprensione della genetica delle produzioni animali. In buona sostanza, e con pochi plausibili assunti, agli elementi del modello corrispondono delle varianze:

$$V(P) = V(A) + V(D) + V(I) + V(E)$$

dalle quali deriva un parametro genetico centrale nell'analisi dei caratteri quantitativi: l'ereditabilità.

$$h^2 = \frac{V(A)}{V(P)}$$

Le funzioni di questo rapporto sono molteplici e di grande valenza applicativa. Più h^2 si avvicina al suo limite massimo (l'unità) e più la selezione camminerà spedita, i BV saranno stimati con elevata accuratezza e per la loro stima sarà sufficiente la misura diretta del fenotipo individuale. Nel caso delle classiche produzioni selezionate nei ruminanti da latte (quantità di latte, grasso, proteina e relativi titoli) sfortunatamente questo rapporto ha valori medio - bassi, compresi tra 0,2 e 0,5 a seconda dei caratteri, delle popolazioni e dei metodi usati per la stima. Questi valori contenuti di ereditabilità, unitamente alla necessità di stimare con accuratezza i BV dei maschi, per il formidabile impatto che questi, tramite la fecondazione artificiale (FA), possono avere nel diffondere i geni favorevoli nella popolazione, rendono necessario l'impiego di una complessa prassi di campionamento del genoma dei candidati maschi. Tale routine, che richiede tempi e costi elevati, prende il nome di *progeny test* o prova di progenie. Il suo significato è chiaro: i caratteri *dairy* sono espressi

solo nelle femmine in lattazione e ciascuna figlia esprimerà in questa circostanza l'effetto additivo della metà dei geni che ha ricevuto in sorte dal padre, oltre naturalmente a quelli ricevuti dalla madre. Disponendo di un numero sufficiente di figlie dello stesso padre sarà possibile stimare l'intero effetto genetico additivo, ossia il BV, del padre.

Si può constatare in questo semplice caso l'efficienza del modello infinitesimale che permette di trasferire l'informazione fenotipica acquisita su un individuo (la figlia) nella stima del BV di un altro individuo che non è possibile misurare (il padre). La base teorica che consente questo transfer risiede nella covarianza tra gli effetti additivi dei due individui, padre (i) e figlia (j): $\text{Cov}(A_i, A_j)$.

L'assunto del modello infinitesimale qui è che, essendo i geni (e di conseguenza i loro effetti additivi) uniformemente sparsi in tutto il genoma, la covarianza, ossia la somiglianza per un carattere qualsiasi che questi geni controllano, tra padre e figlia è semplicemente definita dalla quota di varianza additiva che questi hanno in comune in conseguenza della loro parentela additiva (a_{ij} , in questo caso pari a $1/2$). La parentela additiva misura infatti la proporzione attesa di geni identici per discendenza (IBD) tra due individui.

$$\text{Cov}(A_i, A_j) = a_{ij}V(A)$$

Una formidabile conseguenza di questo modo di vedere il problema è che se disponiamo dei fenotipi misurati su N animali, uniti tra loro da rapporti di parentela noti, e vogliamo stimarne i relativi BV, l'informazione fornita da ciascuno contribuisce alla valutazione del BV di tutti. La rete delle relazioni di parentela che lega gli individui di una popolazione diventa quindi un elemento di grande importanza per la stima dei BV individuali. Tale rete viene molto ben espressa in forma matriciale dalla cosiddetta *additive relationship matrix* o matrice di parentela additiva. È sempre merito di C. Henderson se questa matrice può essere opportunamente calcolata e integrata nel sistema di equazioni del modello misto in modo da consentire valutazioni genetiche che includano oltre a tutti i dati fenotipici provenienti dai controlli funzionali anche tutti quelli genealogici rilevati in allevamento. Il modello misto raggiunge negli anni '80 la sua formulazione più matura trovando anche gli artifici di calcolo più ingegnosi per gestire simultaneamente i dati produttivi e genealogici di grandi popolazioni zootecniche da latte. Sistemi di decine di milioni di equazioni vengono oggi risolti grazie a metodi iterativi che, paradossalmente, non richiedono nemmeno che le equazioni vengano scritte.

È caratteristica peculiare del modello infinitesimale quella di potersi adattare a qualsiasi carattere quantitativo e di poter descrivere coerentemente le relazioni che diversi caratteri contraggono tra loro. Una conseguenza fondamentale di questo fatto è la definizione di *correlazione genetica additiva* che lega due caratteri, ad esempio la quantità di latte (i) e il suo tenore proteico (j): r_{Aij} . La spiegazione biologica della correlazione genetica si basa sull'assunto che alcuni dei geni che controllano la variabilità del carattere i abbiano anche effetto su quello j . Se poi l'effetto genetico semplice che incrementa i produce un decremento di j allora avremo a che fare con una correlazione genetica negativa. Naturalmente, anche in questo caso, il modello non è basato su evidenze sperimentali biologiche oggettive, ma continua a fondarsi su speculazioni teoriche sostenute però da derivazioni matematiche rigorose.

L'interesse in campo zootecnico di selezionare simultaneamente più caratteri, che possono essere tra loro legati da correlazioni genetiche di segno e intensità differenti, è del tutto evidente. E infatti, analogamente a quanto visto più sopra, a proposito del trasferimento di informazione da un individuo a un altro in forza della loro parentela, l'informazione raccolta per un carattere può essere utilizzata per migliorare la stima di un altro a questo correlato. Campo di applicazione diretto è una migliore definizione dell'EBV individuale. Gli indici genetici, stimati attraverso le sofisticate metodologie del modello misto, possono quindi essere basati non solo sul fenotipo di cui stimano la componente additiva, ma anche su altri fenotipi correlati al primo. L'EBV calcolato non è più, a questo punto, in indice genetico *Single Trait*, ma diventa un indice *Multiple Trait*. Siamo arrivati a un prodotto finale con un contenuto di informazione realmente straordinario: un indice genetico di questo genere include tutte le informazioni che scaturiscono dai controlli produttivi e genealogici, valorizza in maniera ottimale anche i dati dei controlli di caratteri correlati, include in maniera matematicamente esatta le

RAZZA	FEMMINE IN CONTROLLO	N. ANNI PROD. ELABORATI	N. DI EBV DI FEMMINE	N. DI EBV DI MASCHI	N. DI EFFETTI AMBIENTALI STIMATI	FREQUENZA ELABORAZIONE
FRISONA*	1,1 mln	17	4,6 mln	55.000	5,1 mln	trimestrale
BRUNA**	120.000	16	0,5 mln	1.400	1,4 mln	trimestrale
SARDA***	215.000	23	1 mln	12.000	17.000	annuale

Tab. 1 Confronto tra alcuni parametri indicativi della complessità del processo di calcolo degli EBV in due razze bovine nazionali e nella razza ovina Sarda (anno 2005). * Metodologia *Multiple trait* e *Multiple lactation Random Regression TDM*. ** Metodologia *Single Trait Repeatability TDM*. *** *BLUP Single Trait Animal Model*

stime dei parametri genetici del caso (ereditabilità dei caratteri e loro correlazione) e aggiusta simultaneamente i dati fenotipici di input per l'effetto delle molteplici condizioni ambientali che ne hanno condizionato l'espressione. La complessità delle procedure di calcolo che sono oggi implementate presso le principali associazioni di razza per il calcolo degli EBV è forse ben sintetizzata dalla tabella 1.

Siamo in presenza di un punto d'arrivo oltre al quale sembra difficile poter andare, se si vogliono mantenere ferme le premesse di partenza, ossia gli assunti e le derivazioni del modello genetico infinitesimale. Gli spazi di sviluppo possibili sono apparentemente solo quelli lasciati dallo studio di nuovi fenotipi.

CARATTERI OGGETTO DI SELEZIONE

Definito, in base al modello infinitesimale, il valore riproduttivo individuale e la relativa metodologia di stima, non resta che dare un contenuto allo strumento individuando i caratteri oggetto di selezione. Nel caso di ruminanti questi sono abbastanza ovviamente legati alla produzione di latte. Dapprima, fino alla metà degli anni '80, l'obiettivo fu la mera quantità di latte prodotto in una lattazione. A partire dalla fine di quella decade, anche in conseguenza del ridotto tenore in grasso, e soprattutto in proteine, accumulato in forza della correlazione negativa tra percentuali e quantità di latte, venne adottato un *indice selettivo aggregato* che ponderava, con enfasi economiche ragionate, la quantità con la qualità. Nei primi anni '90 la necessità di porre un freno deciso all'erosione di qualità (soprattutto proteine) conseguente alla efficiente selezione per la quantità, portò in qualche caso a definire paradossalmente un'enfasi negativa per i kg di latte. Circa negli stessi anni venne introdotto nell'indice aggregato l'elemento morfologico con una attenzione selettiva minoritaria rispetto a quella produttiva (1:4), ma indicativa della necessità di allargare l'obiettivo di selezione includendo non solo caratteri direttamente responsabili della produzione di reddito, ma anche capaci di produrre risparmio economico. La morfologia veniva in questa fase riletta in una chiave moderna e valutata su una scala lineare e non più vista come confronto rispetto a un modello ideale. Viene valutata l'architettura generale dell'animale, ma l'attenzione principale è volta all'analisi dettagliata della morfologia della mammella e alla correttezza e solidità degli arti. Questi aspetti mostrano inoltre di avere importanti potenzialità predittive circa la capacità di un animale

di rimanere a lungo in allevamento (longevità), una caratteristica che la forte pressione selettiva verso le elevate produzioni sembra compromettere gravemente. Un altro carattere che si affaccia tra gli obiettivi di selezione dalla fine degli anni '90 è la resistenza alla mastite, seconda causa di eliminazione involontaria, dopo i problemi riproduttivi, negli allevamenti da latte. Questa viene indirettamente selezionata attraverso un contenimento del numero di cellule somatiche nel latte, carattere di facile misura, di discreta ereditabilità e correlato solidamente alla difesa immunitaria della mammella. A partire dai primi anni del secolo l'obiettivo della selezione, per lo meno nella razza Frisona, sembra essersi stabilizzato su un cocktail composto da produzione di qualità per il 60% circa e per il rimanente da morfologia (quasi esclusivamente mammella e arti), longevità e cellule somatiche.

Per quanto riguarda la razza Bruna, deve essere sottolineata, in aggiunta a quanto precede, la forte enfasi che la razza ha sempre assegnato alla selezione per la qualità del latte. È noto fin dagli anni '70 il ruolo del *cluster* caseinico nel determinare differenze qualitative dei latti bovini. In particolare la k-caseina presenta una variante proteica (l'allele B) che aumenta la resa casearia e migliora la qualità merceologica del formaggio (Parmigiano Reggiano). La frequenza di questo allele è stata fortemente incrementata nella razza Bruna grazie all'inclusione del genotipo k-caseinico nell'Indice Totale Economico di questa razza. La spinta verso la qualità del latte prende le mosse nella razza Bruna in tempi molto lontani: è degli anni '70 la prima valutazione genetica per i contenuti proteici e da subito tali risultati sono stati di indubbia utilità per la selezione applicata a tale razza. Nei primi anni '90 si ha la definizione della prima versione di ITE (Indice Totale Economico) che include, con pesi adeguatamente bilanciati, una spinta verso la produzione compensata però dalla salvaguardia o addirittura dal miglioramento di alcuni caratteri qualitativi tra i quali le proteine e le già citate k-caseine. Sin da subito infatti le percentuali di grasso e di proteine fanno il loro ingresso tra i caratteri in selezione. L'attenzione verso i caratteri con impatto economico in azienda e una forte propensione alla limitazione dei costi di produzione del latte, ha portato nel tempo per questa razza all'inclusione tra gli obiettivi di selezione anche di caratteri quali la velocità di mungitura, la longevità e la sanità della mammella che hanno completato il panorama selettivo utilizzato.

Le altre specie di ruminanti selezionati per il latte hanno, rispetto alla Razza Bruna e Frisona, obiettivi selettivi più semplificati. Nei Bufali, ad esempio, la selezione per la quantità di latte sta dando buoni risultati, determinando però rallentamenti o cali dei tenori in grasso e proteine. Negli ovini da latte

la razza Sarda detiene in qualche modo il primato di una attività selettiva ragionata e consolidata da una annosa pratica. In questa razza, oltre agli aspetti produttivi, che a causa del mancato pagamento della qualità sono limitati alla sola quantità di latte, la selezione ha da poco introdotto tra i suoi obiettivi anche la morfologia mammaria. Per quanto riguarda le capre, allo stato attuale solo le due razze Saanen e Camosciata delle Alpi dispongono di indici BLUP-MT *Animal Model* per latte, grasso e proteine.

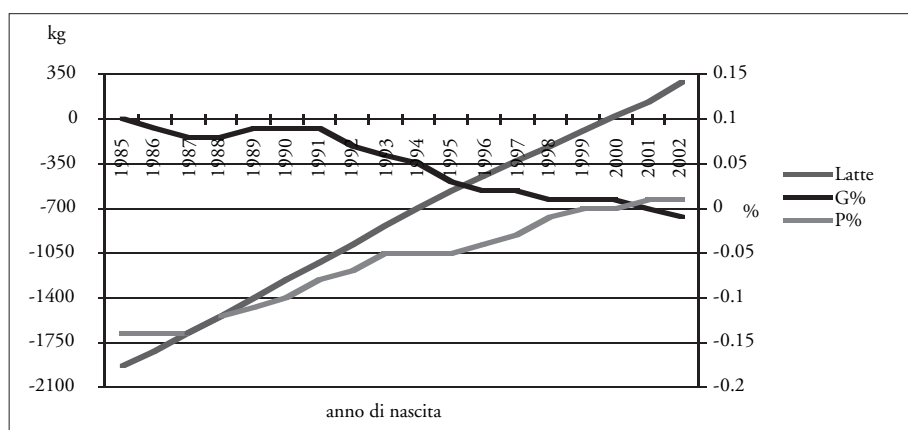
SCHEMI DI SELEZIONE E RISPOSTA SELETTIVA

L'indice genetico, di cui abbiamo sommariamente ricapitolato la genesi, è certamente un punto nodale della selezione tradizionale, ma il successo di quest'ultima risiede nel suo uso corretto all'interno di uno *schema selettivo* che preveda fondamentalmente una gestione ottimale di questa straordinaria risorsa. È grazie a un efficiente schema di selezione che il modello infinitesimale dà il meglio di sé.

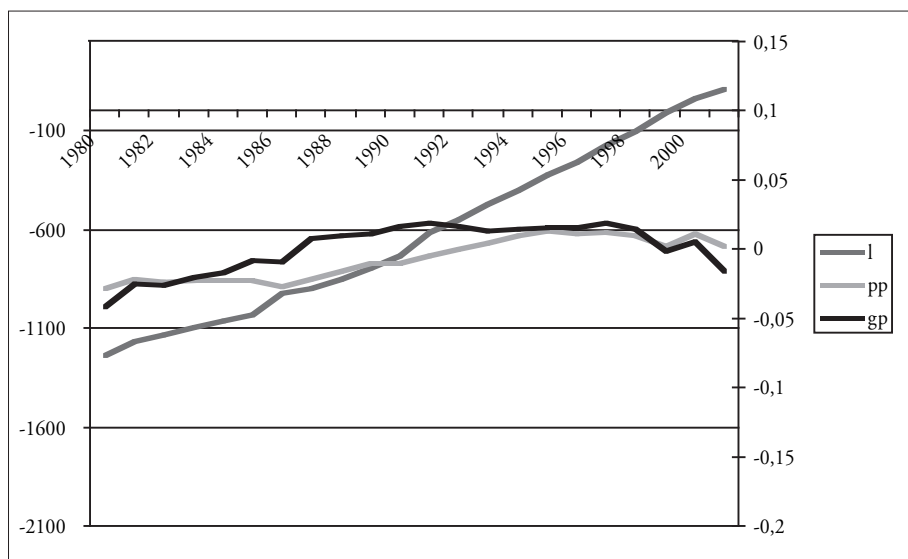
Nelle razze di bovini da latte, la cui consistenza numerica sia sufficiente a supportarne i costi, la prova di progenie è una prassi ormai consolidata. Una certa quota della popolazione femminile in controllo viene destinata ad accoppiamenti con giovani tori da provare. Questi candidati provengono a loro volta da accoppiamenti programmati tra le migliori bovine e i migliori tori disponibili e sono pertanto forniti di indici selettivi elevatissimi, ma basati solo sul loro *pedigree* e quindi con una accuratezza molto bassa. Intorno al compimento del quinto anno di età, i tori in prova ottengono una valutazione individuale basata sulle prime lattazioni delle loro figlie e terminano quindi il periodo della prova. Una certa frazione di questi tori ormai provati accede al ruolo di toro in FA e distribuisce, sempre attraverso la FA, la sua superiorità genetica alla rimanente quota della popolazione femminile. Uno schema selettivo efficiente deve definire quale quota delle bovine sia destinata alla prova e quale invece ne benefici, quanti giovani torelli debbano essere messi in prova annualmente e quanti di questi debbano essere selezionati come tori approvati alla FA, quanti di questi diventeranno padri dei futuri tori, quale ritmo di sostituzione dei tori approvati sia da prevedere e molti altri dettagli tecnici e operativi che naturalmente risultano tutti tra loro ben legati e articolati. Le variabili in gioco sono quindi molte, alcune strettamente biologiche e genetiche, altre tecniche, altre economiche e altre infine prettamente decisionali e quindi politiche. Dobbiamo a Rendel e Robertson (1950) la possibilità di confrontare la bontà di uno schema selettivo con un altro e

RAZZA	MEDIA LATTE 2005	QUOTA DESTINATA ALLA PROVA DI PROGENIE	N. TORI IN PROVA ALL'ANNO	INCREMENTO SULLA MEDIA (%)
FRISONA	8.592	225.000 (20%)	450	1,6
RAZZA BRUNA	6.695	37.500 (30%)	60	1,2

Tab. 2 Alcuni semplici parametri di confronto tra le due maggiori razze bovine da latte allevate in Italia



Graf. 1 Trend genetici per latte grasso e proteina (percentuali) negli ultimi 20 anni nella razza Frisona Italiana



Graf. 2 Trend genetici per latte grasso e proteina (percentuali) negli ultimi 20 anni nella Razza Bruna

prendere quindi decisioni gestionali ottimali. L'optimum viene qui riferito alla migliore risposta generata da uno schema selettivo in termini di progresso genetico, ossia di incremento annuale della media del carattere selezionato. Questo è in ultima analisi lo scopo per il quale tutto l'apparato selettivo viene mosso, il risultato finale del colossale sforzo prodotto dal controllo funzionale, della registrazione delle genealogie e dei molti caratteri accessori che affiancano quelli più propriamente produttivi.

È certamente buona prassi valutare la bontà di un metodo dai risultati che questo produce. Un dato sintetico proveniente dal Ministero dell'Agricoltura Americano ci informa che nei bovini la produzione media per lattazione è cresciuta negli Stati Uniti da 24 quintali nel 1950 a 47 nel '75 a 83 nel 2000 con un incremento annuo medio ben superiore al quintale di latte. Rimanendo a casa nostra, la situazione è schematizzata dalla tabella 2 e dai grafici 1 e 2 che illustrano meglio di ogni possibile commento quanto il modello infinitesimale abbia contribuito alla crescita produttiva delle due maggiori razze bovine da latte nazionali.

Il modello di selezione, basato sulla classica prova di progenie sopra ricordata, non è sempre applicabile a tutte le razze o le popolazioni di ruminanti da latte. Molte di queste, soprattutto se di piccole dimensioni, non riuscirebbero a sostenere il costo della gestione di uno schema con una prova di progenie completa. Il ridotto numero di femmine non consentirebbe di provare maschi in numero sufficiente e la piccola dimensione numerica esporrebbe la razza a non ignorabili rischi di eccessiva consanguineità (Pagnacco et al., 1989). Razze bovine di ridotta consistenza possono adottare convenientemente uno schema selettivo definito a giovani tori che riduce il rischio dell'inbreeding, non richiede tempi di attesa per tori che debbano essere mantenuti a lungo e garantisce risposte selettive se non ottimali certamente molto interessanti. Il principio di questo schema è quello di utilizzare sulla totalità della popolazione torelli in prova di progenie che vengono ricambiati ogni anno. Anche in questo caso i tori in prova sono prodotti da accoppiamenti programmati tra le migliori bovine e i migliori tori provati e garantiscono quindi una genetica avanzata anche se identificata con bassa accuratezza. Al termine della prova i migliori tori, di cui sarà stato naturalmente stoccato un limitato numero di dosi di seme, vengono utilizzati in accoppiamenti programmati per produrre una nuova generazione di giovani torelli.

La prova di progenie quindi serve, in questo caso, solo per identificare i padri dei futuri tori, mentre i padri delle future vacche saranno sempre

RAZZA	N. DI FEMMINE	GIOVANI MASCHI IN FA/ANNO	N. DI PADRI DI MASCHI	$\delta G/\text{ANNO}$	$\delta F/\text{ANNO}$
Rendena	3.300	33	22	35 kg L 1,3 kg G 1,1 kg P	0,002
Valdostana	17.000	26	17	31 kg L 1,1 kg G 1,1 kg P	0,005
Camosciata delle Alpi *	1.000	14	3	7 kg L	0,006

Tab. 3 *Schema selettivo a giovani maschi realizzato in due razze bovine, dati medi degli ultimi 10 anni (L = latte, G = grasso, P = proteine). * Possibile schema a giovani becchi in una razza caprina che produce indici di selezione, ma non dispone ad oggi di uno schema selettivo definito*

giovani maschi scelti in base all'elevato indice di *pedigree*. Questo schema, adatto per popolazioni di poche migliaia di femmine, recupera una parte dello svantaggio, accumulato con l'uso sulla popolazione di tori sempre in prova di progenie con bassa accuratezza, mediante una riduzione consistente dell'intervallo generazionale. Uno schema di questo genere viene applicato in alcune razze dell'arco alpino e potrebbe dare buoni risultati nelle razze caprine più selezionate come la Saanen e la Camosciata delle Alpi (tab. 3).

I LIMITI DEL MODELLO INFINITESIMALE

La flessibilità del modello e la sua versatilità d'uso dovrebbero essere ben evidenti da tutto quanto precede. In buona sostanza si tratta di uno strumento che permette di ottenere risultati concreti anche senza avere alcun background di conoscenza sulla natura stessa del carattere in studio e sulla sua fisiologia. Concepito all'inizio dello scorso secolo, ha trovato nello sviluppo di macchine per il calcolo automatico sempre più potenti e veloci e nella teorizzazione matematico – statistica del modello misto, il modo di affermarsi come strumento efficiente e maturo di miglioramento genetico.

A partire dagli anni '80 iniziarono a manifestarsi i primi sintomi di una certa stanchezza. Sebbene sempre nuovi modelli venissero proposti per includere peculiarità biologiche o matematiche di alcuni caratteri (ad esempio caratteri soglia, effetti legati a inprinting gametico, modelli basati sui dati del controllo giornaliero anziché sull'intera lattazione, i cosiddetti TDM (*Test Day Model*) modelli di confronto tra gli EBV stimati con metodi diversi da paesi diversi, nuovi modelli per la stima di parametri genetici, ecc.) si venne

un po' consolidando la sensazione che i fatti sostanziali erano ormai acquisiti e che quello che restava da fare era solo una messa a punto più fine di qualche dettaglio selettivo che, da un punto di vista strettamente genetico, appariva tutto sommato marginale. A ben vedere, una migliore stima delle componenti della varianza e degli EBV in base a un TDM, o un più corretto confronto tra indici genetici elaborati in paesi diversi, non sono certamente argomenti da poco. Gli interessi economici che la zootecnia da latte muove a livello globale sono colossali. La razza Frisona e, in minore misura, la razza Bruna, ad esempio, sono allevate in quasi tutto il mondo e il mercato del materiale seminale mette in competizione i centri di produzione di genetica avanzata in un ambito che non è certamente più provinciale o nazionale, ma planetario. Le valutazioni genetiche dei tori, dal punto di vista di una nazione o di un centro di FA, non devono solo ordinare correttamente gli EBV, ma devono contemporaneamente dare spazio a un migliore *sharing* del mercato del seme in una competizione che può essere ormai definita *borderless*, senza confini. A questo proposito si sono sviluppate a partire dalla seconda metà degli anni '90 una serie di applicazioni del modello infinitesimale nell'ambito delle valutazioni genetiche internazionali dei riproduttori bovini da latte e carne. Il cosiddetto MACE o (Multiple Across Country Evaluation) proposto nel 1994 da Schaeffer ha permesso di combinare le valutazioni genetiche dei riproduttori, elaborate con i più diversi metodi da 34 paesi, in una singola valutazione internazionale. Sebbene la ricerca in questo ambito abbia un formidabile impatto economico sul successo di questo centro di FA o di quella nazione, molti studiosi hanno finito per lasciarsi affascinare da nuove tecniche genetiche che si erano venute affermando a partire proprio dagli anni '80. La genetica dei caratteri quantitativi, a partire da quegli anni, sembrava essere in qualche modo tramontata a favore dell'astro nascente della genetica molecolare, una genetica basata sul lavoro in laboratorio e direttamente col DNA anziché davanti a un computer manipolando dati fenotipici. Si iniziarono a vedere tutti i limiti e le insufficienze del modello infinitesimale in un crescendo di entusiasmo verso tecniche nuove che promettevano di mandare in pensione in pochi anni tutti i vecchi e faticosi metodi genetici basati su tanta matematica e poco laboratorio.

Il primo e più ovvio limite del modello infinitesimale ancora prima che teorico è direttamente pratico. Per funzionare ha bisogno dei dati fenotipici dei controlli funzionali e di anagrafiche precise. Per quanto riguarda i dati fenotipici, questi sono costosi da registrare, possono essere raccolti solo in un sesso (nel caso dei dati di lattazione) ed è necessario attendere anni prima

che il carattere si esprima, inoltre sono fortemente influenzati dall'ambiente. Tralasciando il caso, non infrequente per certe specie, di registrazioni inattendibili o addirittura artificiali. Per quanto riguarda i dati anagrafici di paternità e maternità, possono essere talvolta errati e la loro verifica richiede costosi accertamenti. Se poi la specie non è quella bovina, ma si tratta di ovini o caprini, la corretta attribuzione di una paternità (ma talvolta anche di una maternità) è spesso quanto meno aleatoria e il suo accertamento può avere un costo pari anche a un terzo del valore dell'animale stesso. Un impegno economico improponibile.

Un secondo limite, questa volta intrinseco al modello, è che in presenza di giovani candidati riproduttori con identica parentela e forniti solo di indice di pedigree (ad esempio fratelli pieni) non abbiamo alcun mezzo per fare una scelta razionale, ma dobbiamo affidarci al caso. Ad esempio, nei bovini da latte, è possibile ottenere mediante tecniche di ovulazione multipla e trasferimento embrionale (MOET) gruppi anche numerosi di fratelli pieni da una sola coppia di riproduttori di altissimo valore genetico. Un centro di fecondazione artificiale interessato a mettere in prova un torello nato da questo accoppiamento magari scegliendolo tra 4 o 5 candidati disponibili, non è in alcun modo aiutato nella scelta dal modello infinitesimale. Invece informazioni provenienti direttamente dal genoma dei candidati potrebbero metterlo in condizione di operare la scelta vincente e migliorare significativamente la sua quota di mercato del seme e conseguentemente il suo fatturato. Il modello infinitesimale prevede con precisione che all'interno di una famiglia di fratelli pieni sia conservata ben metà della variabilità genetica complessiva presente nella popolazione. Questa variabilità, sbrigativamente definita come associata al campionamento mendeliano, sfugge completamente al modello ed è quindi terreno di conquista di chiunque riesca a trovarci qualcosa di utile da sfruttare. È in quest'area che lavora la genetica molecolare.

I FONDAMENTI DELLA SELEZIONE ASSISTITA

All'inizio degli anni '80 vengono scoperti degli enzimi, presenti spesso in batteri da cui prendono il nome, capaci di riconoscere un certo sito nella catena del DNA e tagliarne il filamento in quella precisa corrispondenza. I filamenti che risultano dall'azione di taglio dell'enzima possono essere ordinati per dimensione e riconosciuti individualmente (frammenti di restrizione). La scoperta apre la strada a nuove e interessanti prospettive in quanto, se nel sito riconosciuto dall'enzima è avvenuta una mutazione, l'enzima non riconosce più il sito, è

incapace di agire e la mutazione potrà essere evidenziata con chiarezza. L'aspetto nuovo qui è che riusciamo a vedere una mutazione del DNA senza che necessariamente questa abbia un riscontro in una corrispondente variazione del fenotipo. Si tratta di un fatto assolutamente nuovo e importante. Fino a quel momento infatti le mutazioni del DNA non si potevano vedere, ma se ne ipotizzava l'esistenza in quanto si osservavano differenze fenotipiche in qualche proteina. Di fatto quindi, mentre prima si potevano solo postulare mutazioni in regioni genomiche codificanti, da questo punto in avanti è possibile vedere nel DNA anche mutazioni anonime che non hanno alcun riscontro nel fenotipo, ma che si comportano, come è logico attendersi, secondo le consuete regole della segregazione mendeliana. Sono nati i marcatori genetici.

Dalla metà degli anni '80 vengono costituiti gruppi di lavoro, ben finanziati anche internazionalmente, che realizzano per le principali specie zootecniche delle estese mappe genetiche in cui trova posto una quantità progressivamente crescente di marcatori genetici anonimi. Questi marcatori non hanno naturalmente nessuna pretesa di spiegare le differenze fenotipiche che vengono osservate nei bovini o nei ruminanti da latte, ma sono disposti lungo tutti i cromosomi in maniera abbastanza fitta da lasciar sperare che qualcuno di loro possa trovarsi per caso molto vicino a un QTL. Questa sigla, coniata per l'occasione, vuole proprio indicare una regione genomica in cui sia presente un gene o un *cluster* genico con un effetto rilevante su un carattere quantitativo di interesse (QTL, *Quantitative Trait Locus*). Il modello infinitesimale viene in questo modo messo seriamente in discussione per la prima volta. I geni non sono più sparsi uniformemente nel genoma, ma alcune regioni possono contenere QTL con effetto maggiore, mentre altre regioni possono esserne prive. La nostra speranza di trovare i QTL per un certo carattere si basa sulla vicinanza fisica di questi a un marcatore anonimo. Una vicinanza che ne tradisca la presenza facendo segregare congiuntamente il marcatore e il QTL.

A illustrare semplicemente il concetto si immagini un individuo, ad esempio un toro, in cui un marcatore (M) e un QTL (Q), che ha un effetto importante sulla produzione di latte, siano disposti in questo modo in una particolare regione di un qualsiasi cromosoma.

$$\frac{M_1 Q_1}{M_2 Q_2}$$

Il toro è evidentemente eterozigote sia al marcatore che al QTL e la vicinanza dei due loci rende probabile la loro segregazione congiunta. Ossia al

momento della meiosi, momento in cui si formano i gameti, si produrranno due tipi di cellule (spermatozoi, in questo caso), metà sarà M_1Q_1 e metà M_2Q_2 . Sono certamente sempre possibili fenomeni di crossing over che al momento della meiosi possono ricombinare il cromosoma producendo nuovi tipi di spermatozoi: M_1Q_2 e M_2Q_1 . Ma si tratta di eventi che, se M e Q sono molto vicini, sono molto rari. Tralasciando per semplicità questa ipotesi, possiamo concludere che il nostro toro distribuirà a metà delle sue figlie l'allele M_1 associato a Q_1 e all'altra metà l'allele M_2 associato a Q_2 . Le figlie possono essere tipizzate per il marcatore e quindi riconosciute e divise nei due gruppi. Se l'allele Q_1 ha un effetto più favorevole rispetto a Q_2 sulla produzione, le figlie M_1 produrranno significativamente di più di quelle M_2 . Il *linkage* tra QTL e marcatore diventa quindi la chiave di volta per realizzare una selezione assistita da marcatori (MAS, *Marker-assisted Selection*).

Ma il linkage da solo non basta, è necessario infatti che nella popolazione in studio sia anche presente del *Linkage Disequilibrium*. Per dare ragione di questo secondo concetto utilizziamo ancora l'esempio del toro precedente. Nelle sue figlie, come si è detto, l'associazione M_1Q_1 e M_2Q_2 è ben chiara (fatte salve le possibili ricombinazioni). Ma nella progenie di un secondo toro la fase di associazione potrebbe essere opposta: M_1Q_2 e M_2Q_1 . In questo caso saranno le figlie che hanno ereditato M_2 dal padre a essere più produttive. Il che ci porta, con una certa frustrazione, a dover riconoscere l'aleatorietà del metodo. Il problema, a ben vedere, consiste nel fatto che M e Q sono in *Linkage Disequilibrium*, se ne analizziamo la segregazione entro singole famiglie, ma al livello più generale dell'intera popolazione sono in perfetto *Linkage Equilibrium*. E questo rende M poco affidabile come marcatore da utilizzare in una programma MAS efficiente.

Un programma di selezione che voglia trarre concreti benefici da questo strumento dovrebbe quindi privilegiare marcatori che siano in *Linkage Disequilibrium* con i QTL di interesse non solo entro singole famiglie, ma a livello di intera popolazione, marcatori cioè che si trovino nelle immediate vicinanze del QTL se non addirittura al suo interno (*LD markers*). In questo caso la selezione assistita da marcatori evolve verso una vera e propria selezione assistita dai geni (GAS, *Gene-assisted Selection*). È chiaro che questo tipo di marcatori sono di ben più difficile reperimento di quelli che, a livello di popolazione, sono in *Linkage Equilibrium* (*LE markers*), ma naturalmente di ben maggiore utilità.

Un ultimo punto che è necessario mettere in evidenza riguarda il fatto che disegni sperimentali, volti a scovare per successivamente valorizzare geni e QTL, sono di norma condotti utilizzando molti animali e soprattutto molti

marcatori. Ad esempio, l'analisi sopra illustrata delle figlie di un toro viene condotta sia simultaneamente su molti tori che utilizzando una miriade di marcatori sparsi in tutto il genoma in modo da sondare tutte le regioni di tutti i cromosomi. In questo modo i QTL che cerchiamo saranno fiancheggiati a sinistra e a destra da diversi marcatori e sarà quindi possibile mappare i QTL non in base alla sola associazione con un singolo marcatore, ma all'interno di un *aplotipo* di più marcatori (Goddard, 1992, Meuwissen e Goddard, 1996). In questo modo sarà possibile stimarne con ragionevole precisione non solo la localizzazione cromosomica, ma anche l'effetto quantitativo sul fenotipo di interesse. Un risultato di questo genere implica necessariamente uno sforzo analitico rilevante perché i marcatori che è necessario tipizzare in ogni animale crescono rapidamente anche a qualche centinaio. Consideriamo infatti il genoma bovino che, come quello di molti mammiferi, ha una dimensione di circa 3 miliardi di paia di basi (bp) corrispondenti a circa 3.000 cM. Se utilizzassimo dei marcatori mediamente equispaziati, collocati a 20 cM l'uno dall'altro, sarebbero necessari 150 marcatori per coprire l'intero genoma. In questo caso il QTL di cui andiamo a caccia potrebbe trovarsi al massimo a 10 cM dal marcatore più vicino, una distanza che in termini di paia di basi si avvicina a circa 10 milioni di bp e che potrebbe ospitare senza problemi l'ordine di grandezza di 100 geni diversi. Marcatori così distanziati hanno una utilità per la selezione ben limitata (sono *LE markers*) per l'elevata probabilità di ricombinazione col QTL. D'altra parte aumentare la densità dei marcatori, ad esempio raddoppiandone il numero, comporta benefici, ma anche costi in proporzione, in quanto tutte le tipizzazioni vanno condotte su un numero di animali che garantisca la significatività statistica delle differenze fenotipiche. Sarebbe infatti un peccato, per tornare all'esempio precedente, che le figlie M_1 producessero effettivamente più latte delle figlie M_2 , segnalando quindi la presenza di un vicino QTL, ma a causa del limitato numero di animali, che il budget disponibile ha consentito di tipizzare, la differenza non risultasse significativa. Sarebbe come aver comprato il biglietto vincente della lotteria e non aver controllato il numero.

Nei ruminanti da latte, soprattutto bovini, i principi generali di un *genome scanning* fin qui descritti trovano applicazione attraverso alcune tipologie consolidate di disegno sperimentale.

– *Daughter Design* (DD). È l'applicazione più semplice dei principi sopra riportati (Weller et al., 1990). Le figlie di un certo numero di maschi vengono tipizzate per molti marcatori. Naturalmente sono informativi solo i marcatori che nei maschi sono eterozigoti (M_1M_2) e che sono in *linkage* con QTL a loro

volta eterozigoti. Il confronto viene fatto, per fenotipi oggetto del controllo funzionale, tra le figlie M_1 e quelle M_2 . Il problema principale di questo disegno sperimentale è l'elevato costo associato alle molte tipizzazioni necessarie, problema che le moderne tecniche basate su metodologie highthroughput tende a ridurre.

– *GranDaughter Design* (GDD). Molto simile concettualmente al precedente DD, coinvolge tre generazioni anziché solo due e realizza un sensibile risparmio in termini di tipizzazioni. Vengono qui utilizzati i genotipi dei tori figli di un *grandsire* eterozigote al marcatore e vengono confrontate le produzioni delle figlie dei tori M_1 e quelle dei tori M_2 . Il minore potere del confronto in questo disegno rispetto al precedente è più che compensato dal ridotto numero di tipizzazioni necessarie e dall'elevato numero di fenotipi misurati sulle *granddaughters* .

– *Selective Genotyping*. Persegue, come anche il precedente disegno, lo scopo di ridurre il numero delle tipizzazioni e può venire applicato, ad esempio, a un DD. La differenza tra le figlie M_1 e quelle M_2 viene qui calcolata solo su una parte dell'intera progenie: infatti vengono tipizzate solo le figlie con fenotipi più estremi. La differenza trovata deve essere qui corretta per un fattore di aggiustamento che tenga conto di quanto estreme siano state le code analizzate. Il metodo consente sensibili risparmi in termini di tipizzazioni, ma se si volessero analizzare altri fenotipi nuove code dovrebbero essere definite e tipizzate.

– *Selective DNA Pooling*. Questa metodologia è basata sulla dimostrazione teorica che quasi tutte le informazioni di mappa per un carattere sono legate alla frequenza allelica del marcatore nel migliore e peggiore 25% della distribuzione fenotipica della popolazione per quel carattere (Darvasi e Soller, 1994) e dalla dimostrazione tecnica che per i marcatori microsatelliti la frequenza allelica nei pool di DNA può essere determinata con grande accuratezza attraverso genotipizzazione e successiva analisi densitometrica dei picchi. In questo modo tutte le informazioni di mappa relative a un certo carattere e per le quali sarebbe necessario un campionamento molto esteso, possono essere ottenute con un costo ridotto (per un fattore uguale a 100) attraverso la genotipizzazione e l'analisi densitometrica di un piccolo numero di pool.

– *Backcross*. Questo disegno sperimentale, anziché utilizzare il *Linkage Disequilibrium* presente all'interno di una famiglia come i precedenti, punta sull'incrocio tra razze molto distanti tra loro in cui un limitato numero di maschi F_1 vengono reincrociati con le femmine di una delle due razze parentali. Abbiamo in Italia un interessante esempio di questo disegno negli ovini sardi di cui si dirà di più tra poco.

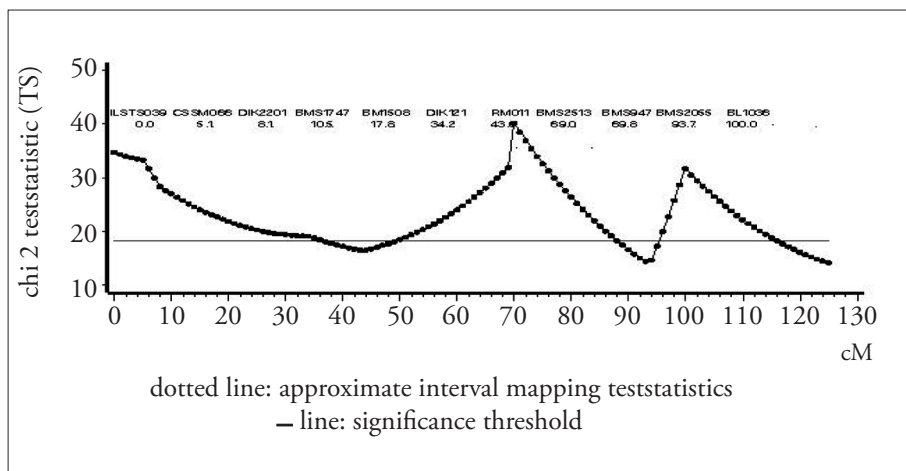
UNA SELEZIONE DI RISULTATI SPERIMENTALI NEI BOVINI...

Recentemente in Italia si è concluso un progetto per l'identificazione di QTL nei bovini da latte che prevedeva un completo *genome scan*. Il progetto (BovMAS), finanziato dalla Unione Europea, ha visto, in Italia, il coinvolgimento della razza Bruna e della razza Frisona Italiana ed è stato sviluppato presso le Università di Milano e Bologna. Altri progetti che hanno investigato la presenza di QTL solo su un numero limitato di cromosomi sono stati attivati nella razza Frisona e Pezzata Rossa Italiana, (questo ultimo ancora in corso) e sviluppati presso le Università di Bologna, Piacenza e Milano. Ci limiteremo qui a riportare alcuni risultati legati al progetto BovMAS, di cui presentiamo elaborazioni preliminari di risultati che sono in fase di pubblicazione su riviste scientifiche del settore. L'obiettivo principale del BovMAS è stato identificare, in ciascuna razza, possibili QTL legati alla produzione di latte e al suo contenuto in proteina percentuale e di verificare, sugli altri caratteri di interesse per la selezione della razza (quantità di proteina e di grasso, contenuto di cellule somatiche e fertilità), l'effetto di questi QTL. Il progetto inoltre ha avuto lo scopo di provare, attraverso apposite simulazioni e sperimentazioni su piccola scala, le possibilità di applicazione della MAS sulle popolazioni di bovini da latte.

Nella razza Bruna (Bagnato et al., 2004 e 2005a) sono stati trovati 64 marcatori in associazione sia con il carattere proteina percentuale (PP) che con la produzione di latte (MY), 28 solo con PP e 21 solo con MY. Questo ci dice che una larga parte di QTL influenza non solo uno specifico carattere produttivo, ma più caratteri simultaneamente. Le analisi di associazione (Lipkin et al., 1998, Mosig et al., 2001) possono essere effettuate tuttavia anche su ciascuna delle dieci famiglie (dove i capofamiglia sono eterozigoti). In questo caso parliamo di associazioni famiglia/marcatore (F/M). Di 704 (PP) e 697 (MY) combinazioni F/M analizzate, 120 sono significative per PP, 110 per MY e 27 per entrambi i caratteri. Tra tutte le combinazioni F/M significative 113 hanno mostrato la stessa direzione dell'effetto mentre 138 direzione opposta. Ciò significa che in 113 casi lo stesso "gene" aumenta sia la quantità di latte prodotto che il tenore proteico, mentre in 138 casi lo stesso gene aumenta la quantità di latte, ma ne diminuisce il contenuto proteico.

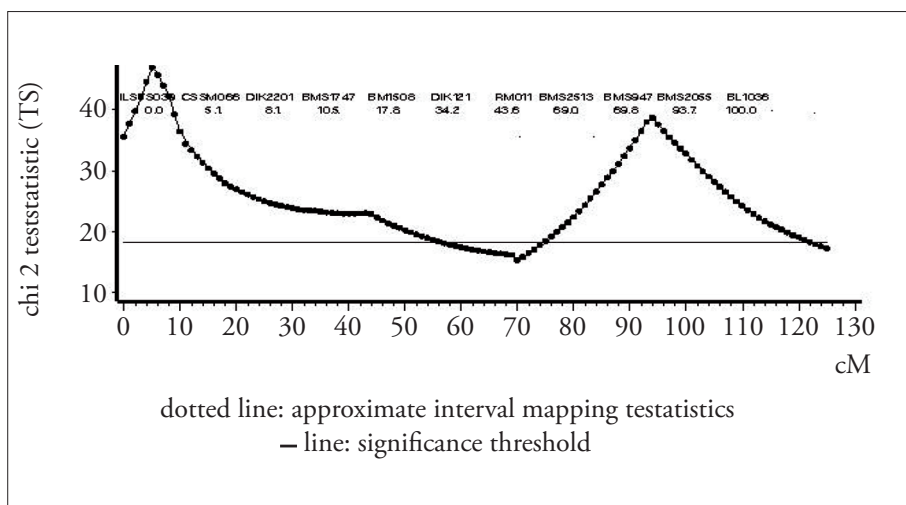
Per quanto riguarda la razza Frisona Italiana (Russo et al., 2004; Fontanesi et al., 2005) sono stati trovati 25 marcatori in associazione con entrambi i caratteri, 30 solo con PP e 33 solo con MY. A livello di analisi F/M sono stati trovati 25 marcatori per MY e 49 marcatori in associazione con PP.

In cinque regioni QTL risultate significative in tutte le popolazioni analizzate è stata sviluppata un'analisi ad alta risoluzione utilizzando il disegno spe-



Graf. 3 Analisi per produzione di latte effettuata con approximate interval mapping nella razza Bruna (Bagnato et al., 2005b)

rimentale *Fractionated Pooling Design* (Cohen et al. 2006). Ciò ha permesso l'identificazione degli *index markers* per ciascuna famiglia, cioè la localizzazione di un marcatore per ogni regione QTL che mostra la più forte associazione con il carattere oggetto di studio.



Graf. 4 Analisi della proteina percentuale effettuata con approximate interval mapping nella razza Bruna (Bagnato et al., 2005)

Marcatori	(cM)	A	B	C	G	M	S1	S2	S3
ILSTS039	0	FP	FP	ns	FP	ns	FP,MY,PP	FP,MY,PP	--
CSSM066	5.1	ns	ns	ns	ns	--	FP	FP,PP	FP,MY
BMS1747	10.5	ns	ns	ns	--	ns	FP	FP,PP	MY
BM1508	17.8	--	--	--	--	--	--	--	--
DIK4681	25.7	--	--	--	--	--	--	--	--
DIK121	34.2	ns	ns	ns	--	--	ns	PP	ns
RM011	43.6	ns	--	ns	-	--	FP	--	ns
BMC1207	51.9	--	PP	ns	--	ns	ns	ns	ns
BMS740	60.7	PP	ns	--	MY	ns	--	ns	ns
CA066	81.3	--	ns	--	--	--	PP	--	FP,MY,PP
BMS2055	93.7	ns	ns	ns	ns	--	ns	nt	--

Tab. 4 Risultati del test Famiglia/Marcatore per MY e PP nel cromosoma 14. In grassetto i caratteri significativi con False Discovery Rate (FDR) <0.01, non in grassetto i caratteri con FDR < 0.05; ns non significativi; nt non testati; -- omozigoti (Fontanesi et al., 2005)

Le figure 3 e 4 mostrano i risultati ottenuti sul cromosoma 14 (Bagnato et al., 2005b) per proteina percentuale e produzione di latte rispettivamente attraverso l'analisi con il metodo *Approximate Interval Mapping* (AIM) sviluppato da Dolezal et al., (2004). Sull'asse orizzontale è riportata la distanza tra i marcatori espressa in cM. Sull'asse verticale è riportato il valore del test statistico utilizzato, in questo caso il δ^2 . Il cromosoma 14 è stato studiato in modo dettagliato da alcuni autori (Khun et al., 2004) che vi hanno identificato un gene responsabile del tenore di grasso nel latte, il DGAT1. Questo gene è anche legato alla produzione di latte e ci si aspetta, dati i legami noti dalla genetica quantitativa, una sua influenza anche sulla proteina percentuale. Come si nota dai grafici 3 e 4, all'inizio del cromosoma è evidente nella razza Bruna una forte associazione dei caratteri MY e PP con il QTL noto del DGAT1. Sul cromosoma 14 è stata trovata anche una seconda regione QTL nella parte distale che mostra la presenza di una associazione significativa sia con MY che con PP.

Anche nella razza Frisone Italiana (Fontanesi et al., 2005) è stata verificata la presenza di un importante QTL per la produzione di latte nella regione prossimale del cromosoma 14 (tab. 4). Inoltre, è stata effettuata la ricerca di altri QTL per i caratteri proteina percentuale, grasso percentuale (FP) e la produzione di latte su questo cromosoma. Così come per la Bruna, anche per la Frisone i risultati mettono in evidenza che il QTL nella regione prossimale del cromosoma 14 è dovuto solo in parte alla nota mutazione A232K del gene DGAT1 e che probabilmente un altro o altri QTL segregano nella regione centro-distale dello stesso cromosoma.

... E NEGLI OVINI

Una importante popolazione-risorsa italiana è stata costruita a partire dal 1999 in Sardegna nell'ambito di un progetto Europeo denominato *Gene-sheepsafety* condotto dall'Istituto Zootecnico Caseario della Sardegna in comune con INRA. Si tratta di un disegno *backcross* in cui 14 arieti d'élite di razza Lacaune hanno generato, attraverso incrocio con 100 pecore di razza Sarda, 10 arieti F₁ figli di padri Lacaune diversi. Questi arieti F₁, accoppiati con circa 3.000 pecore Sarde hanno prodotto quasi 1.000 pecore di *backcross* strutturate in 10 famiglie *half sib* di dimensione compresa tra 76 e 121 individui (Carta et al., 2003, Casu et al., 2003). La gestione sperimentale, all'interno di un unico allevamento, ha consentito la registrazione meticolosa di un elevato numero di fenotipi che hanno riguardato non solo i consueti caratteri produttivi associati al latte, ma anche altri aspetti funzionali e sanitari degli animali. Tra questi, il peso e gli incrementi ponderali degli agnelli (la produzione di carne contribuisce una frazione non irrilevante del reddito dell'allevamento), il BCS delle pecore, la produzione di lana, la morfologia mammaria, la resistenza a malattie come ad esempio parassiti gastrointestinali (Scala et al., 2002), le cellule somatiche e il contenuto di CLA nel latte.

Per quanto riguarda i caratteri produttivi, i cromosomi ovini 3, 16 e 20 mostrano di ospitare QTL che hanno simultaneo effetto sulla quantità di

CROMOSOMA	CARATTERE	PIÙ VICINO MARCATORE	POSIZIONE (CM)	P	EFFETTO ADDITIVO DEL QTL (σ_P)
1	Proteine %	MCM058	98	0,0054	0,46 – 0,71
3	Latte kg	BMC1009	168	0,0012	0,98 - 0,68
	Grasso kg	BMC1009	168	0,0234	0,93 - 0,44
	Proteine kg	BMC1009	166	0,0005	1,06 – 0,54
16	Latte kg	MAF214	34	0,0015	0,51 – 1,06
	Grasso kg	MAF214	32	0,0037	0,38 – 1,06
	Proteine kg	MAF214	32	0,0059	0,44 – 1,01
20	Latte kg	BM1258	2	0,0034	0,57 - 1,27
	Grasso kg	BM1258	0	0,0068	0,56 – 1,05
	Proteine kg	BM1258	2	0,0104	0,49 – 1,26
	Grasso %	OARH56	30	0,0005	0,74 – 0,64

Tab. 5 I più significativi QTL per la produzione di latte negli ovini, la loro posizione e il loro effetto misurato in termini di deviazione standard fenotipica (Fonte: Barillet et al., 2005)

CROMOSOMA	CARATTERE	VARIABILE	POSIZIONE CM	MARCATORE PIÙ VICINO	P	EFFETTO ADDITIVO DEL QTL (σ_P)
3	Diametri trasversali	db+df	203	BMC1009	0,0470	0,58 – 1,19
		Larg. max	207	OARCP43 ^e	0,0006	0,62 – 1,00
		prof	205		0,0207	0,56 – 0,81
9	Posizione capezzoli	PC	2	CSSM66	0,0002	0,48 – 0,92
		Cit_d	6		0,0485	0,80 – 0,61
		Cit_g	4		0,0108	0,71 – 0,59
		Cit_l	2		0,0057	0,82 – 0,76
12	Forza attacco	AT	70	BMS1185 e	0,0036	0,65 – 0,92
		larg_at	54	LSCV38	0,0006	1,29 – 0,71
		ratio	52		0,0001	1,44 – 0,80

Tab. 6 QTL che influenzano la morfologia della mammella negli ovini.

Larg. max: larghezza massima della mammella, db+df: profondità laterale a livello del capezzolo, prof: profondità laterale a livello dell'attacco, PC: posizione dei capezzoli; Cit_: altezza della cisterna destra, sinistra, laterale; AT: attacco ventrale; larg_at: larghezza attacco; ratio: rapporto tra larghezza dell'attacco e altezza della mammella

latte, grasso e proteine, a supporto della positiva e forte correlazione genetica osservata tra questi caratteri (0,80 – 0,95). È interessante osservare come gli omologhi bovini dei cromosomi 16 e 20 ovini (cromosomi 20 e 23) ospitino QTL con effetto analogo sulle produzioni di latte in questa specie. I dati più rilevanti sono riportati nella tabella 5.

Tra i molti caratteri, di cui il disegno sperimentale ha permesso di individuare QTL utili nella selezione, citiamo qui solo qualcosa relativo alla morfologia mammaria e alla emissione di CLA nel latte. La morfologia mammaria che tanta importanza riveste in questa specie ha dato indicazioni rilevanti che vengono riassunte nella tabella 6.

Una attenzione particolare è stata rivolta al contenuto di acido linoleico coniugato (CLA) presente nel grasso del latte a causa delle sue possibili ripercussioni sulla salute umana. È noto che la maggior parte del CLA escreto col latte viene prodotto nella ghiandola mammaria dove l'acido vaccenico viene denaturato dall'enzima delta 9-desaturasi. La popolazione-risorsa Sarda x La-caune ha permesso di localizzare QTL con effetto significativo sul contenuto di CLA nel grasso del latte nei cromosomi 4, 14 e 19. L'analisi del rapporto CLA/acido vaccenico ha invece segnalato QTL attivi sui cromosomi 4, 6, 14 e 22. In questo ultimo cromosoma è precisamente localizzato il gene SCD che codifica per l'enzima delta 9-desaturasi (Carta et al., 2003).

SCENARI FUTURI

Lo scenario selettivo del prossimo futuro dovrà prendere in considerazione necessariamente le mutate condizioni economiche e di mercato del settore del latte in Europa. In generale assistiamo a un graduale ridimensionamento del prezzo di mercato del latte e a una conseguente compressione dei margini di profitto per unità di produzione. Tale compressione dei profitti sta mettendo fortemente in discussione un modello iper-intensivo di produzione del latte che oggi incorpora costi di produzione non sempre e non più assorbibili dal prezzo di vendita del latte. Da una parte, quindi si ricerca un animale che limiti i costi di produzione dall'altra un animale che fornisca un latte adatto a essere valorizzato in prodotti differenziati con l'obiettivo di aumentare la percentuale di valore che viene trasferito al produttore. Lo scenario viene completato da una crescente attenzione del consumatore, e più in generale dell'opinione pubblica, verso aspetti finora rimasti in secondo piano quali la sicurezza e la tracciabilità delle produzioni o le metodologie di produzione e la loro compatibilità con le crescenti istanze legate al benessere animale e alla tutela ambientale.

Tenute in debita considerazione le argomentazioni sopra esposte è evidente che l'aumento produttivo, anche se bilanciato dal rispetto della qualità delle produzioni, rischia di essere un obiettivo limitato e fuori tempo rispetto alle nuove esigenze dei produttori sempre più inseriti in una logica di mercato. Nuovi caratteri si propongono come candidati alla selezione futura proponendo nel contempo nuove sfide tecniche sia in ambito di rilevazione dati che in ambito di disegno degli schemi di selezione. Da una parte abbiamo i nuovi caratteri legati alla funzionalità dell'animale e alla riduzione dei costi di produzione: la già citata mungibilità come pure un rinnovato interesse verso la fertilità degli animali. È nota infatti la naturale correlazione negativa tra produzione e fertilità che madre natura ha fornito agli animali per proteggerli da stress produttivi e riproduttivi concomitanti. In tal senso la ricerca di animali che resistano meglio agli stress produttivi potrebbe favorire la selezione per animali che rispondano meglio alle necessità di riproduzione presenti nelle aziende.

La sanità degli animali, di estremo interesse pratico per i produttori, è stata finora solo sfiorata dai processi selettivi nazionali. Ad oggi non esistono sistemi di rilevazione dati che possano permettere un rapido cambio di direzione in questo senso, ma sono in corso riflessioni a tutti i livelli sull'argomento. D'altra parte la selezione si dovrà occupare in modo più organico della qualità delle produzioni intesa come caratteristica intrinseca del prodotto, in questo caso del latte, che lo rendono adatto a essere valorizzato. Esistono studi in corso che affrontano in modo sistematico l'argomento delle caseine nel latte con

la possibile prospettiva di abbandonare il mito delle proteine nel latte. Ciò avviene mentre importanti realtà casearie nazionali già hanno deciso di passare dal pagamento del latte in base alle proteine al pagamento in base alle caseine. Il discorso caseine è certamente più interessante se lo si affronta con un approccio ancora più articolato. Si parla quindi di varianti genetiche di alcune sieroproteine, ma anche di aplotipi caseinici, vista la modalità di trasmissione ereditaria di questo *cluster* genico (Caroli et al., 2004, Boettcher et al., 2004a, 2004b). Si parla anche di valorizzazione della diversità di lattici nell'attitudine alla caseificazione rilevata attraverso lattodinamografia (Bittante et al., 2002). In questo senso anche il necessario ridisegno degli schemi di selezione dovuto a un lavoro su caratteri spesso o a bassa ereditabilità o di difficile rilevazione in campo dovrà essere fatto con un occhio di riguardo alle nuove tecnologie di genetica molecolare. Non si intravede quindi una sostituzione dei vecchi metodi quantitativi con nuovi metodi molecolari quanto invece una integrazione tra le potenzialità dei due approcci.

A distanza di dieci anni dalla pubblicazione dei primi risultati circa il ritrovamento di QTL per la produzione di latte nei bovini (Georges et al., 1995) sembra di poter concludere che il rilevamento routinario dei dati di produzione primaria da cui vengono elaborati, via modello infinitesimale, gli EBV individuali per una miriade di diversi caratteri, non sarà certo dismesso a breve. In qualche caso, in presenza di un QTL di forte impatto, le informazioni molecolari potranno essere integrate in un modello misto che accolga, accanto alla tradizionale componente poligenica infinitesimale, l'informazione relativa a una specifica sezione di genoma di elevato valore economico (*finite locus model*). E modelli di questo genere sono stati ampiamente esplorati negli ultimi 15 anni (Fernando e Grossman, 1989, Pagnacco e Jansen, 2001, Stella et al., 2002a, 2002b). D'altra parte la secolare selezione che ha operato nelle nostre razze per l'incremento della produzione di latte ha verosimilmente, e già da tempo, fissato nelle popolazioni gli alleli di più forte e favorevole effetto ed è quindi ragionevole attendersi che il modello infinitesimale continui a rappresentare uno strumento di collaudata robustezza e sicura utilità. Novità potrebbero forse scaturire dalla comparsa di nuove mutazioni o dalla scoperta di nuovi alleli interessanti, ma con bassissima frequenza, magari generati da eventi di ricombinazione molto rari, oppure reperiti in popolazioni o in razze che oggi attirano l'attenzione solo per la necessità della salvaguardia della loro biodiversità, ma che in realtà potrebbero essere serbatoi di forme alleliche di grandissima importanza.

Le tecniche genetiche molecolari possono invece aprire scenari realmente innovativi quando intervengono nella preselezione di torelli da destinare, ad

esempio, a prova di progenie, situazioni in cui il modello infinitesimale non riesce a essere di alcun aiuto. Qui la genetica molecolare può fare realmente la differenza, soprattutto nel fatturato di un centro di FA.

Ancora, la precisa conoscenza delle basi molecolari che definiscono differenze nella resistenza a patologie, magari potenzialmente anche pericolose per la specie umana, può dare un contributo alla selezione e alla nostra sicurezza alimentare di primaria importanza. Ne è ottimo esempio la selezione, in atto nella specie ovina, contro alleli che prefigurano una maggiore suscettibilità alla Scrapie: una patologia sorella della encefalite spongiforme bovina (BSE) che ha dimostrato di poter pericolosamente cambiare la specie bersaglio.

Infine e in generale, la selezione assistita da marcatori (e dovranno essere alla fine *LD-markers*) potrà dare dei contributi formidabili e inarrivabili coi metodi tradizionali, nella selezione per aspetti qualitativi realmente innovativi delle produzioni. Ad esempio particolari aplotipi caseinici o peptidi bioattivi con particolari prerogative nutrizionali, CLA, resistenza a parassiti, e in generale caratteri la cui bassa ereditabilità renda il modello infinitesimale poco efficiente nel discriminare la biodiversità individuale.

RIASSUNTO

La selezione per il latte nei ruminanti è stata nel corso degli ultimi cento anni estremamente efficace nel determinare un formidabile incremento produttivo, soprattutto quantitativo delle produzioni. I progressi genetici osservati nelle razze bovine più evolute hanno spesso superato il quintale di latte all'anno. Il merito di questi risultati è dovuto essenzialmente al modello genetico infinitesimale e alla sua capacità, attraverso la stima del valore riproduttivo individuale, di riconoscere i genotipi superiori. Negli ultimi venticinque anni si sono affermate nuove metodologie genetiche che aprono prospettive affascinanti nella selezione degli animali da latte. La genetica molecolare potrà prevedibilmente affiancare il modello infinitesimale dando un sostanziale contributo alla selezione là dove questo risulta inefficiente nel discriminare le differenze tra gli animali. Il suo maggiore impatto è da prevedere per caratteri a bassa ereditabilità o quando la localizzazione e l'effetto del gene di interesse sono noti con una precisione sufficiente.

ABSTRACT

Selection for dairy traits in ruminants has been very effective since the beginning of the last century in most of the developed countries. Quantitative production has increased dramatically mainly for milk yield with observed genetic gain often over hundred kg per year. Infinitesimal model is largely responsible of that increase through all the most

sophisticated technologies developed to predict the individual breeding value, namely the mixed model methodology. In the last two decades of the XX century a number of new genetic tools have grown up, opening new intriguing perspectives to further improve dairy traits and other functional traits. Molecular genetics, rather than substituting the traditional methods of selection based on the infinitesimal model, seems well suited to give important contributions to the improvement of traits with low heritability or when the gene of interest is clearly located or can be exploited by linkage disequilibrium marker-assisted selection.

BIBLIOGRAFIA

- BAGNATO A., SCHIAVINI F., DUBINI S., ROSSONI A., MALTECCA C., SANTUS E., MEDJUGORAC I., SOELKNER J., LIPKIN E., SOLLER M. (2004): *The BovMAS Consortium: A Complete Genome Scan of Brown Swiss Cattle for Milk Yield and Protein Percent Using Selective DNA Pooling with milk samples*, Proc. 29th International Conference on Animal Genetics, Tokyo, 11-26 settembre 2004, p. 131 (F021).
- BAGNATO A., SCHIAVINI F., DUBINI S., ROSSONI A., MALTECCA C., SANTUS E., DOLEZAL M., MEDJUGORAC I., SÖLKNER J., FRIEDMAN A., LIPKIN E., SOLLER M. (2005a): *The BovMAS Consortium - A complete genome scan for identification of QTL for milk yield and protein percent in the Brown Swiss breed*, «Italian Journal of Anim. Sci.», 4, Supp.2, pp. 118.
- BAGNATO A., SCHIAVINI F., DOLEZAL M., DUBINI S., ROSSONI A., MALTECCA C., SANTUS E., MEDJUGORAC I., SÖLKNER J., FRIEDMAN A., LIPKIN E., SOLLER M. (2005b): *The BovMAS Consortium - Identification of QTL for milk yield and milk protein percent on chromosome 14 in the Brown Swiss breed*, «Italian Journal of Anim. Sci.», 4, Supp.2, pp. 13-15.
- BARILLET F., ARRANZ J.J., CARTA A. (2005): *Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep*, «Genet. Sel. Evol.», 37, Supp. 1, pp. 109-123.
- BITTANTE G., MARUSI M., CESARINI F., POVINELLI M., CASSANDRO M. (2002): *Genetic analysis on milk rennet-coagulation properties ability in Italian Holstein cows*, Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Productions, Montpellier, August 19-23, pp. 478-481.
- BOETTCHER P. J., PAGNACCO G., STELLA A. (2004a): *A Monte Carlo Approach for Estimation of Haplotype Probabilities in Half-sib Families*. «J. Dairy Sci.», 87, pp. 4303-4310.
- BOETTCHER P. J., CAROLI A., STELLA A., CHESSA S., BUDELLI E., CANADESI F., GHIROLDI S., PAGNACCO G. (2004b): *Effects of Casein Haplotypes on Milk Production Traits in Italian Holstein and Brown Swiss Cattle*, «J. Dairy Sci.», 87, pp. 4311-4317.
- CAROLI A., CHESSA S., BOLLA P., BUDELLI E., GANDINI G. (2004): *Genetic structure of milk protein polymorphisms and effects on milk production traits in a local dairy cattle*, «J. Anim. Breed. Genet.», 121, pp. 119-127.
- CARTA A., PIREDDA G., FIORI M., LEROUX C., BARILLET F. (2003): *A genome scan to detect QTL for CLA content in the milk fat of dairy sheep*, Proc. 54th EAAP Annual Meeting, Rome, 31 August-2 September, Book of Abstract, p. 89.

- CASU SARA, MARIE-ETANCELIN C., SCHIBLER L., CRIBIU E., MURA L., SECHI T., FRAGHÌ A., CARTA A., BARILLET F. (2003): *A genome scan to identify quantitative trait loci affecting udder morphology traits in dairy sheep*, Proc. of IWMGQSG, Tolosa, 8-11 Dicembre, Communication 2, p. 19.
- COHEN L., FRENKEL Z., LIPKIN E., SOLLER M., KOROL A. (2006): *Advanced Features of Fractioned Pooling Design of QTL Mapping for Selective DNA Pooling Experiments*, Proc. XIV conference on Plant and Animal Genome, San Diego, 14-18 gennaio.
- DARVASI A. AND SOLLER M. (1994): *Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus*, «Genetics», 138, pp. 1365-1373.
- DOLEZAL M., SCHWARZENBACHER H., SOELKNER J., VISSCHER P. (2004): *The BovMAS Consortium: an approximate interval mapping procedure for selective DNA pooling*, Proc. 29th International Conference on Animal Genetics, Tokyo, 11-26 settembre, p. 48.
- FALCONER D. S. (1960): *Introduction to Quantitative Genetics*, Oliver and Boyd, London.
- FERNANDO R. L., GROSSMAN M. (1989): *Marker assisted selection using best linear unbiased prediction*, «Genet. Sel. Evol.», 21, pp. 467-477.
- FONTANESI L., E. SCOTTI, D. PECORARI, P. ZAMBONELLI, D. BIGI, S. DALL'OLIO, R. DAVOLI, E. LIPKIN, M. SOLLER, V. RUSSO (2005): *Investigation of bovine chromosome 14 for quantitative trait loci affecting milk production and quality traits in the Italian Holstein-Friesian breed*, «Italian Journal of Anim. Sci.», 4, Supp. 2, pp. 16-18.
- GEORGES M., NIELSEN D., MACKINNON M., MISHRA A., OKIMOTO R., PASQUINO A., SARGEANT L., SORENSEN A., STEELE M., ZHAO X., WOMACK J. HOESCHELE I. (1995): *Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing*, «Genetics», 139, pp. 907-920.
- GODDARD M. E. (1992): *A mixed model for analyses of data on multiple genetic markers*, «Theor. Appl. Genet.», 83, pp. 878-886.
- HENDERSON C. (1949): *Estimates of changes in herd environment*, «J. Dairy Sci.», 32, pp. 706-712.
- LUSH J. L. (1937): *Animal Breeding Plans*, Iowa State University Press, Ames.
- KÜHN C., THALLER G., ET AL. (2004): *Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus betetr explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle*, «Genetics», 167, pp. 1873-1881.
- LIPKIN E., MOSIG M.O., DARVASI A., SOLLER M. (1998): *Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective DNA pooling using milk samples and dinucleotide microsatellite markers: analysis of milk protein percentage*, «Genetics», 149, pp. 1557-1567.
- MEUWISSEN, T. H. E., GODDARD M. (1996): *The Use of marker haplotypes in animal breeding schemes*, «Genet. Sel. Evol.», 28, pp. 161-176.
- MOSIG M. O., LIPKIN E., KHUTORESKAYA G., TCHOURZYNA E., SOLLER M., FRIEDMANN A. (2001): *A Whole genome scan for QTL affecting milk protein percent in Israeli-Holstein cattle, by means of selective milk DNA pooling in a daughter design, using a modified false discovery rate criterion*, «Genetics», 157, pp. 1683-1698.
- PAGNACCO G., JANSSEN G.B. (2001): *Use of marker haplotype to refine covariances among relatives for breeding value estimation*, «J. Anim. Breed. Genet.», 118, pp. 69-82.
- PAGNACCO G., CARTA A. (2003): *Animal Breeding from Infinitesimal model to MAS: the case of a backcross design in dairy sheep (Sarda x Lacaune) and its possibile impact on selection*, Proc. International Workshop on Marker assisted selection: a fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?, 17-18 Ottobre, Torino.

- PAGNACCO G., GANDINI G., BAGNATO A., MIGLIOR F., CAROLI A. (1989): *Genetic gain and conservation in a small alpine cattle breed*, «Journal of Animal Breeding and Genetics», 106(5), pp. 351-357.
- RENDEL J. M., ROBERTSON A. (1950): *Estimation of genetic gain in milk yield by selection in a closed herd of dairy cattle*, «J. Genet.», 50, pp. 1-8.
- RUSSO V., FONTANESI L., ZAMBONELLI P., DALL'OLIO S., BIGI D., SCOTTI E., PECORARI D., BLASI M., MOTOVALIAN M., LANZA A., CANAVESI F., LIPKIN E., SOLLER M., DAVOLI R. (2004): *The BovMAS Consortium: Mapping QTL for milk yield and protein percentage in Italian Holstein-Friesian dairy cattle by selective DNA pooling of milk samples*, Proc. 29th International Conference on Animal Genetics, Tokyo 11-26 settembre, p. 131.
- SCALA A., CARTA A., LIGIOS S., BARILLET F., GRUNER L. (2002): *Resistenza genetica ai nematodi g.i. degli ovini: ricerca di QTL sul cromosoma 3*, Atti XV Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C., 11-14 Settembre, Cagliari, p. 46.
- SCHAEFFER L.R. (1994): *Multiple-country comparison of dairy sires*, «J. Dairy Sci.», 77, pp. 2671-2678.
- STELLA A., JANSSEN G. B., BOETTCHER P. J., GIBSON J. P., LOHUIS M. M., PAGNACCO G. (2002a): *Accounting for uncertainty in QTL location in marker-assisted pre-selection*, «J. Anim. Breed. Genet.», 119, pp. 15-24.
- STELLA A., LOHUIS M. M., PAGNACCO G., JANSSEN G. B. (2002b): *Strategies for Continual Application of Marker Assisted Selection in an Open Nucleus Population*, «J. Dairy Sci.», 85, pp. 2358-2367.
- WELLER J.I., KASHI Y., SOLLER M. (1990): *Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle*, «J. Dairy Sci.», 73, pp. 2525-2537.

PAOLO AJMONE-MARSAN*, ANNA MARIA CAROLI**, PAOLA CREPALDI***,
LILIANA DI STASIO****, MARIA FELIGINI*****, LUCA FERRETTI*****,
PIERO MASINA*****, LUIGI RAMUNNO*****, ANDREA RANDO*****

Geni singoli nella selezione degli animali da latte

INTRODUZIONE

L'identificazione di geni singoli con effetti significativi su caratteri di interesse per la selezione degli animali da latte rappresenta un obiettivo primario della ricerca nel settore della genetica molecolare in zootecnia.

I sistemi biologici sono estremamente complessi e spesso non esiste un rapporto univoco di causa-effetto tra varianti alleliche dei geni e fenotipo. Questa relazione non univoca è dovuta al numero e alla complessità dei passaggi che portano alleli differenti di un gene ad avere effetti diversi sul fenotipo di un animale. Le sequenze codificanti per essere espresse devono essere trascritte in mRNA. Studi recenti indicano che la regolazione spazio-temporale e quantitativa dell'espressione di un gene è influenzata non solo da sequenze in *cis*, promotori, *enhancer* e introni, ma anche da controlli di tipo epigenetico, come la metilazione delle sequenze riconosciute dai fattori di trascrizione (Chen e Riggs, 2005, Cosgrove e Wolberger, 2005). Tali controlli non sono determinati dalle sequenze specifiche dei diversi alleli.

Inoltre la regolazione operata da elementi in *trans* non è limitata a proteine codificate da geni regolatori; esistono infatti piccoli segmenti di RNA

* Istituto di Zootecnica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
** Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Brescia
*** Istituto di Zootecnica Generale, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Milano
**** Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Torino, Grugliasco
***** Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani", Lodi
***** Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università degli Studi di Pavia
***** Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali, Università degli Studi della Basilicata, Potenza
***** Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, sez. "T. M. Bettini", Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Portici

(microRNA) che sembrano svolgere un ruolo fondamentale di silenziamento post-trascrizionale (Aravin e Tuschl, 2005; Wienholds e Pasterek 2005). Un gene trascritto può dare origine a proteine differenti, anche con funzioni diverse, attraverso i) il meccanismo dello *splicing* alternativo che avviene durante la maturazione del mRNA, ii) differenti modificazioni post-traduzionali (glicosilazioni, metilazioni, acetilazioni, tagli enzimatici, ecc.).

Va ricordato ancora che una proteina non agisce in modo isolato, ma all'interno di un sistema in cui l'interazione con altre molecole proteiche è la norma, più che l'eccezione. Un ruolo chiave viene esercitato poi sia dall'ambiente, che può facilmente amplificare o mascherare le differenze dovute ai genotipi, sia dalle interazioni tra genotipo e ambiente, che possono portare gli stessi alleli a comportarsi in modo divergente in ambienti diversi.

L'identificazione di geni e di mutazioni con effetto fenotipico sui caratteri complessi rappresenta quindi una difficile sfida per il ricercatore, che oggi però dispone di strumenti di indagine innovativi. Investimenti significativi sono stati fatti in diversi paesi europei ed extraeuropei (Stati Uniti, Canada, Israele, Australia, Cina, Giappone) per mettere a disposizione della comunità scientifica nuovi strumenti molecolari e per identificare geni utili nel genoma degli animali di interesse zootecnico. Sono disponibili o in corso di sviluppo migliaia di nuovi marcatori, in particolare polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP), mappe ad alte densità di marcatori neutri e sequenze espresse, mappe comparative, mappe fisiche (di cloni BAC, cromosomi artificiali batterici), strumenti per lo studio sistematico dell'espressione genica e del proteoma, informazioni sull'ontologia dei geni. Inoltre in *Bos*, *Gallus* e *Sus* è in corso il sequenziamento completo del genoma, praticamente terminato per le prime due specie. Sono anche a disposizione gli strumenti bioinformatici necessari alla gestione del numero crescente di informazioni e alla scoperta di possibili connessioni tra i dati.

Esistono strategie diverse per cercare geni utili. L'approccio più seguito fino a oggi è quello del gene candidato: i) si sceglie un gene che ha una funzione nota e correlata con un carattere bersaglio; ii) si studia la variabilità molecolare del gene e si identificano due o più varianti alleliche; iii) si verifica l'effetto degli alleli sul carattere bersaglio attraverso test di associazione.

I geni delle caseine del latte sono stati analizzati in questo modo. Per seguire questa strategia devono essere prese alcune precauzioni: il numero di campioni analizzato deve essere sufficientemente grande e non troppo sbilanciato tra le classi genotipiche; la struttura dei *pedigree* deve essere nota e considerata in fase di analisi dei dati.

Negli animali zootecnici la funzione di un gene viene generalmente dedotta dalla sequenza e dalla funzione nota in altri organismi. Ciò permette

di identificare un numero elevato di geni candidati per funzione, ma rende difficile la scelta oggettiva di quelli più promettenti, su cui investire tempo e sforzo sperimentale. Per questo motivo sono state studiate strategie alternative per l'identificazione di geni di interesse. Una di queste è l'isolamento per posizione, a seguito di un esperimento di mappatura di *Quantitative Trait Loci* (QTL; Pagnacco et al., in questa pubblicazione). Questa strategia, un tempo perseguibile solo su uomo e topo, sarà probabilmente la via del futuro anche nel settore zootecnico, grazie alla disponibilità di mappe fisiche e comparative e di genomi sequenziati. Un esempio di isolamento per posizione verrà descritto nella sezione del capitolo dedicata al gene *DGAT1*. Anche i profili di espressione genica sono fonti di informazioni utili (Valentini et al., in questa pubblicazione), ma è solo l'integrazione dei diversi approcci che offre la maggiore probabilità di successo. Posizione, funzione all'interno di una via metabolica, profilo di espressione e co-regolazione con altri geni, informazioni sulle interazioni molecolari tra prodotti genici possono risultare molto efficienti nell'indirizzare opportunamente la scelta dei geni da studiare in modo più approfondito.

Lo studio di geni singoli può rispondere sia a quesiti di base sia a esigenze applicative. I quesiti di base possono riguardare per esempio la fisiologia animale, la biodiversità delle popolazioni zootecniche, la loro storia evolutiva e i meccanismi dell'adattamento. Le applicazioni possono invece riguardare l'inserimento dei geni nei programmi di selezione oppure l'utilizzo delle informazioni molecolari a fini diagnostici, ad esempio per la tracciabilità dei prodotti animali negli alimenti, come verrà illustrato con lo studio del gene *MC1R*, trattato in seguito. Spesso i confini tra ricerca di base e applicata sono sfumati e le applicazioni emergono, a volte inaspettatamente, proprio da studi di base.

È indubbio che l'identificazione e l'uso di geni singoli nella selezione sia più vantaggioso rispetto all'uso di QTL, indipendentemente dalle strategie che si utilizzano per integrare le informazioni molecolari negli schemi di selezione (selezione entro famiglia, inserimento nei metodi di valutazione dei riproduttori o altro; Pagnacco et al., in questa pubblicazione). La conoscenza del gene responsabile e ancor più della mutazione funzionale non espone al rischio di perdita dell'associazione tra QTL e marcatore dovuta a ricombinazione. Nella *Gene Assisted Selection* (GAS) la fase di associazione marcatore-QTL non deve essere verificata periodicamente ed è la stessa in tutte le famiglie selezionate.

L'identificazione di un gene utile e dei suoi alleli *plus-* e *minus-* varianti è comunque solo il primo passo verso l'applicazione della GAS. Per progettare un programma di GAS devono essere considerati una serie di fattori. In particolare bisogna verificare quali siano gli effetti del gene su caratteri correlati

con quello bersaglio. Questi ultimi possano essere influenzati positivamente o negativamente dalla GAS, a seconda del segno della correlazione. I programmi di GAS devono anche valutare e attenuare con opportuni accorgimenti le possibili conseguenze negative sulla diversità genetica ad altri loci e sulla consanguineità. Inoltre si dovrebbero valutare le possibili conseguenze sul benessere animale e sull'ambiente e verificare che l'effetto della selezione assistita sia coerente con le richieste dei consumatori in termini di sicurezza, qualità e salubrità delle produzioni. Oltre a soddisfare queste condizioni, la GAS deve risultare economicamente conveniente, considerato che l'obiettivo ultimo della selezione è la massimizzazione del reddito per l'allevatore.

In questa rassegna vengono descritti gli studi condotti su geni estremamente diversi. Verranno infatti illustrati:

- i geni che codificano le proteine del latte, che sono ben caratterizzati dal punto di vista molecolare e permettono sia studi di base, di elevata valenza culturale, come lo studio della co-evoluzione tra geni bovini e geni umani (Beja-Pereira et al., 2003), sia studi estremamente applicativi, per il miglioramento della resa casearia e la produzione di latte con caratteristiche particolari;
- il gene *DGAT1*, che permette una descrizione esemplare dell'uso delle nuove tecnologie per isolare un gene responsabile di un effetto QTL;
- il gene *PRNP*, che ha importanti ricadute sulla sicurezza alimentare e pone quesiti circa la conservazione della biodiversità nelle razze ovine selezionate contro la presenza degli alleli sensibili alle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE);
- il gene *CDS*, che influenza la produzione di acido linoleico coniugato CLA, un composto tipico, del latte dei ruminanti particolarmente interessante per gli effetti positivi che determina sulla salute umana;
- il gene *MC1R*, che possiede interessanti potenzialità applicative nell'ambito della tracciabilità dei prodotti zootecnici.

I GENI DELLE LATTOPROTEINE

Più del 95% delle proteine contenute nel latte dei ruminanti è codificato da 6 geni strutturali, attualmente ben caratterizzati (Martin et al., 2002). Le

due sieroproteine più importanti, α -lattalbumina (α -LA) e β -lattoglobulina (β -LG), sono codificate dai geni *LAA* e *LGB*. Le tre caseine calcio-sensibili, α_{s1} -caseina (α_{s1} -CN), β -caseina (β -CN), e α_{s2} -caseina (α_{s2} -CN) sono codificate dai geni *CSN1S1*, *CSN2*, and *CSN1S2*. La κ -caseina (κ -CN), che svolge un ruolo essenziale nella stabilizzazione delle micelle caseiniche (Alexander et al., 1988), è codificata dal gene *CSN3*.

I quattro geni delle caseine sono strettamente associati a formare un *cluster* di 250-kb (Ferretti et al., 1990; Threadgill e Womack, 1990) localizzato sul cromosoma 6 (Hayes et al., 1993; Popescu et al., 1996) e che comprende nell'ordine, *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* e *CSN3*. *LAA* e *LGB* sono stati mappati sui cromosomi 5 (Hayes et al., 1993) e 11 (Hayes e Petit, 1993) in bovino e capra e sul cromosoma 3 ovino, costituito dalla fusione dei cromosomi 5 e 11 degli altri ruminanti (Crawford et al., 1995).

Negli ultimi quindici anni sono stati dedicati sforzi notevoli allo studio delle varianti genetiche delle proteine del latte a livello di DNA, permettendo l'identificazione delle mutazioni causative delle varianti proteiche e l'identificazione di nuove varianti (Medrano e Aguilar-Cordova, 1990; Damiani et al., 1990, 1992; Schlieben et al., 1991; Erhardt et al., 1997; Prinzenberg et al., 1999, 2005; Jann et al., 2002a, 2002b; Ceriotti et al., 2004; Farrell et al., 2004). L'importanza zootecnica della grande variabilità a questi 6 geni si riflette sulla composizione del latte e sulle caratteristiche tecnologiche per la caseificazione. L'effetto delle varianti alleliche è stato studiato considerando i geni delle caseine singolarmente o come aplotipo (Aleandri et al., 1990; Caroli et al., 2000; Lien et al., 1995; Braunschweig et al., 2000; Di Stasio e Mariani, 2000; Ikonen et al., 2001; Boettcher et al., 2004). Inoltre i polimorfismi delle proteine del latte sono uno strumento utile per la caratterizzazione, lo studio della biodiversità e dell'evoluzione delle razze (Merlin e Di Stasio, 1982; Lien et al. 1999; Mahé et al., 1999; Moazami-Goudarzi et al. 2001; Beja-Pereira et al., 2002; Ceriotti et al., 2004; Jann et al., 2004a, 2004b).

I geni delle proteine del latte sono stati studiati approfonditamente nei bovini e nelle capre, in cui sia le sequenze codificanti che quelle non codificanti sono state ampiamente caratterizzate (Boulanger et al., 1984; Mahé e Grosclaude, 1993; Bouniol et al., 1994; Ramunno et al., 1995; Rando et al., 1998; Parma et al.; 1999; Persuy et al., 1999; Damiani et al., 2000a, 2000b; Lagonigro et al., 2001; Ramunno et al., 2001a, 2001b, 2004, 2005; Feligini et al., 2002, 2005; Neveu et al., 2002; Prinzenberg et al., 2003; Chessa et al., 2005).

Considerato lo scopo di questa relazione, concentreremo la nostra attenzione sulle acquisizioni nella specie caprina e su *CSN1S1* in particolare.

Le caseine di capra sono state studiate in modo approfondito sia a livello di DNA che di proteina. Numerose mutazioni sono state identificate. Una caratteristica unica delle caseine nella capra è che alleli deboli, che producono bassi livelli di proteina, e alleli nulli, che non producono la proteina, sono stati identificati in tutti i geni delle caseine calcio-sensibili (*CSN1S1*, *CSN2*, e *CSN1S2*; Ramunno et al., 1995, 2001b, 2005; Rando et al., 1996; Martin et al., 1999; Persuy et al., 1999; Cosenza et al., 2003).

Nella specie caprina sono descritti 17 alleli del gene *CSN1S1*, associati alla produzione di quantità differenti di α_{s1} -CN nel latte. Sulla base del contenuto di α_{s1} -CN nel latte, gli alleli di *CSN1S1* possono essere classificati in quattro gruppi: alleli forti (*A*, *B1*, *B2*, *B3*, *B4*, *C*, *H*, *L* e *M*), che producono quasi 3.5 g/L di α_{s1} -CN; alleli medi (*E* e *I*; 1.1 g/L); alleli deboli (*D*, *F* e *G*; 0.45 g/L); e nulli (*O1*, *O2* e *N*) che non producono α_{s1} -caseina (Grosclaude et al. 1987; Chianese et al., 1997; Martin et al., 1999; Rando et al., 1998; Bevilacqua et al., 2002; Chessa et al., 2003; Ramunno et al., 2005; per una rassegna vedere Grosclaude e Martin, 1997).

I diversi alleli di *CSN1S1* non hanno effetto solamente sul contenuto di proteine nel latte, ma anche sulle caratteristiche aromatiche del latte, sul diametro e sul contenuto in calcio delle micelle proteiche (gli alleli forti formano micelle più piccole e numerose), con conseguenze sulla resa casearia e su altre caratteristiche tecnologiche del latte. Genotipi omozigoti per gli alleli deboli hanno resa casearia inferiore rispetto ai genotipi omozigoti per gli alleli forti (ad es. *CSN1S1 F/F* ha una resa del 18,3%, mentre *CSN1S1 A/A* del 21,9%) e sapore ircino molto più intenso (Remuef, 1993).

Il fatto che esistano alleli deboli e nulli al gene *CSN1S1* e agli altri geni delle caseine calcio-sensibili offre opportunità uniche per la selezione nella specie caprina, per la produzione di latte con proprietà ipoallergeniche, basso contenuto calorico e composizione simile al latte umano. Dati recenti indicano come il principale allergene presente nel latte sia la caseina α_{s2} (Natale et al., 2004). In questo lavoro è mostrato come bambini allergici sottoposti a test sviluppino anticorpi specifici per questa proteina nel 90% dei casi, mentre solo nel 45% dei casi producano anticorpi contro la β -lattoalbumina, ritenuta fino a ora la principale responsabile delle reazioni allergiche al latte nei bambini.

Alcuni studi hanno inoltre evidenziato l'azione biologica dei biopeptidi prodotti dalla digestione enzimatica delle proteine del latte (Schlimme e Meisel, 1995; Hartwig et al., 1997). Tale attività dipende dalla sequenza delle stesse proteine e dalla presenza di mutazioni che determinano cambiamenti aminoacidici. Ad esempio la variante *CSN2*A2* bovina che si differenzia da

*CSN2*A1* e *CSN2*B* per la presenza di una Prolina al posto di un'Istidina nella posizione 67 della proteina matura, avrebbe un effetto positivo sulla salute umana. L'Istidina67 determina infatti un taglio enzimatico con rilascio di β -casomorfina-7, un peptide che determina una soppressione del sistema immunitario e sembra pertanto implicato nell'eziologia del diabete di tipo 1 (Elliott et al., 1999).

È evidente l'utilità di approfondire gli studi sui geni delle caseine sia per ricerca di base che applicata.

IL GENE *DGATI*

La scoperta di questo gene e la raccolta di prove circa il suo coinvolgimento nella determinazione della percentuale di grasso presente nel latte rappresentano un esempio interessante di isolamento di un gene per posizione sul genoma. La caccia a *DGATI* ha inizio in seguito a un esperimento di mappatura di QTL nel corso del quale sono stati rilevati effetti significativi sulla quantità e composizione del latte nella regione centromerica del cromosoma bovino 14 (BTA14; Coppetiers et al., 1998; Heyen et al., 1999).

In seguito, un interessante approccio che ha combinato l'analisi di *linkage* in famiglie GDD e DD (*Grand Daughter Design* e *Daughter Design*, vedi Pagnacco et al., in questa pubblicazione) e di *linkage disequilibrium* tra i capostipite delle famiglie analizzate, ha permesso di localizzare il QTL in un intervallo discreto di 3,8 cM, tra i microsatelliti BULGE30 e BULGE9 (Riquet et al., 1999, Farnir et al., 2002).

La caccia è proseguita costruendo quello che in gergo tecnico viene chiamato "*BAC contig*" (una serie di frammenti di DNA clonati in cromosomi artificiali batterici che coprono completamente una regione cromosomica) tra BULGE30 e BULGE9. Studiando la regione omologa del genoma umano, a quel tempo già completamente sequenziato, è stato identificato un gene candidato per posizione e per funzione: il gene diacilglicerolo acil transferasi (*DGATI*; Grisart et al., 2002), che catalizza l'ultima reazione nella biosintesi dei trigliceridi (Cases et al., 1998). Il genoma bovino è interamente sequenziato e non sarebbe oggi necessario ricorrere a mappe comparative per identificare i geni presenti in una determinata regione cromosomica. L'uso delle mappe comparative sarebbe comunque importante per identificare con certezza il gene omologo umano e sfruttare le "annotazioni" sulla funzione dei geni, che nella nostra specie sono molto più precise.

Successivamente il gene *DGAT1* è stato sequenziato in individui omozigoti per alleli diversi del QTL ed è stata identificata una sostituzione di una Lisina con una Alanina nella posizione 232 (K232A) della proteina codificata dal gene. Questa mutazione è risultata associata con la produzione e la composizione di latte in diverse razze bovine (Grisart et al., 2002; Winter et al., 2002; Spelman et al., 2002). Altri esperimenti hanno confermato che gli effetti osservati erano dovuti alla mutazione K232A e non ad altre mutazioni o ad altri geni in *linkage disequilibrium* con *DGAT1*. La regione tra BULGE30 e BULGE9 è stata arricchita con diversi marcatori SNP di nuova generazione e l'analisi di associazione ripetuta su nuove popolazioni. La mutazione causativa della sostituzione K232A è risultata quella più significativamente associata alla percentuale di grasso nel latte. Lo studio del *linkage disequilibrium* attorno al gene ha anche mostrato tracce di una selezione recente sull'allele plusvariante K, in accordo con i recenti indirizzi selettivi verso il miglioramento della qualità del latte delle popolazioni analizzate. Infine l'efficienza degli alleli 232K e 232A è stata valutata in sistemi di espressione in linee cellulari. In questi esperimenti l'allele K è risultato in grado di sintetizzare trigliceridi più velocemente dell'allele A.

In realtà nessuno di questi risultati dimostra in modo univoco la relazione causa/effetto tra K232A e le differenze nella percentuale di grasso nel latte. Tuttavia, presi tutti insieme, i dati raccolti rappresentano prove circostanziali estremamente convincenti del fatto che *DGAT1* sia il QTG (*Quantitative Trait Gene*) e che la mutazione che determina K232A sia il QTN (*Quantitative Trait Nucleotide*). È ipotizzabile che il successo ottenuto con *DGAT1* sarà seguito dalla “caccia” per posizione a un numero sempre crescente di geni nelle regioni in cui sono stati identificati QTL per caratteri interessanti. I nuovi strumenti e le nuove informazioni sono efficienti “battitori” che rendono la caccia sempre più facile.

Il caso di *DGAT1* è però emblematico anche da un altro punto di vista. L'allele K infatti non solo determina un aumento della quantità e della percentuale di grasso nel latte, ma è legato anche a una riduzione della quantità di latte e di proteine, effetti che devono assolutamente essere considerati nel caso si volesse includere *DGAT1* in programmi di *Gene Assisted Selection*.

IL GENE PRNP

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE), comunemente note come malattie da prioni, sono patologie neurodegenerative caratterizzate dall'ac-

cumulo nel sistema nervoso centrale di una isoforma anomala (PrP^{Sc}) di una proteina cellulare, PrP^{C} , la cui funzione fisiologica è tuttora ignota. Secondo l'ipotesi del prione, la trasformazione della proteina cellulare PrP^{C} nella versione anomala PrP^{Sc} è l'evento causativo delle patologie da prioni. In altre parole l'agente eziologico delle TSE è una proteina, non un agente infettivo "canonico" quale un virus o un microrganismo patogeno (Prusiner, 1998). Le TSE esistono nell'uomo (CJD, *Creutzfeldt Jakob Disease*) e nelle principali specie di animali domestici quali la specie bovina (BSE, *Bovine Spongiform Encephalopathy*, la malattia della mucca pazza), e ovicaprina (scrapie). A queste specie si aggiungono il gatto (*Feline Spongiform Encephalopathy*) e varie specie selvatiche quali il visone e il cervo per citarne alcune. La notorietà delle malattie da prioni si deve senza dubbio all'epidemia europea di BSE degli anni '90 e alla descrizione di una variante della CJD umana (vCJD) che, in base a dati epidemiologici e sperimentali, sembra essere dovuta al passaggio dell'agente infettivo della BSE dal bovino all'uomo (Hill et al., 1997).

L'esistenza di una base genetica della suscettibilità degli organismi alle TSE è stata ipotizzata sin dagli anni '60 (Parry, 1962). In seguito alla scoperta, avvenuta negli anni '80, che la proteina prionica è codificata da un gene endogeno (*PRNP* nell'uomo e nelle altre specie, *Prnp* nel topo), sono state man mano identificate varianti genetiche che conferiscono al soggetto portatore una suscettibilità più o meno marcata all'infezione da prione.

Nel topo sono note due varianti, *Prnp-a* e *Prnp-b*, che si differenziano ai codoni 108 e 109 per la presenza di Leucina o Treonina, e Fenilalanina o Valina. La prima variante è caratterizzata da tempi di infezione brevi rispetto alla seconda, che è meno suscettibile. Nell'uomo la base genetica è molto complessa perché oltre alla CJD esistono altre malattie neurodegenerative in cui alleli del gene *PRNP* hanno effetti causativi (Mead, 2006). Per la CJD è interessante rilevare che mentre nella popolazione esiste un diffuso polimorfismo al codone 129 della proteina prionica (Valina/Metionina), tutti i soggetti finora colpiti dalla nuova variante (vCJD) hanno la Metionina 129.

Per quanto riguarda la specie ovina esistono molti polimorfismi del gene *PRNP* (Baylis e Goldmann, 2004). Sono state descritte nove sostituzioni aminoacidiche ai codoni 112, 127, 137, 138, 141, 143, 151, 176 e 211, per lo più rare e non associate alla suscettibilità alla scrapie. Al contrario, tre polimorfismi, in posizione 136 (Valina/Alanina; V/A), 154 (Istidina/Arginina; H/R) e 171 (Glutammina/Istidina/Arginina; Q/H/R), influenzano direttamente la suscettibilità all'infezione, per quanto il loro effetto sia complesso. Infatti, esistono differenze tra razze sia nelle frequenze alleliche di tali varianti, sia per la loro influenza nei confronti della suscettibilità ad agenti

scrapie naturali e sperimentali. Così, pecore Cheviot con almeno una Valina in posizione 136 sono sensibili all'inoculo di agente infettivo scrapie SSBP-1 mentre soggetti omozigoti 136^{AA} sono resistenti. Animali eterozigoti 136^{VA} sono meno resistenti se sono anche 171^{QQ} rispetto ad animali che hanno la variante 171^{RQ}. Diversamente, se l'agente infettivo è il ceppo CH1641 o un isolato BSE, sembra che l'influenza dell'allele al codone 136 sia minima. Nelle pecore Suffolk, dove l'allele 136^V è molto raro, i soggetti 171^{QQ} sono i più esposti al rischio di infezione. In questo quadro alquanto articolato è sicuramente di grande importanza l'osservazione che l'aplotipo 136^A 154^R 171^R sembra conferire resistenza sia all'infezione da agente scrapie naturale che da agente BSE inoculato sperimentalmente (Goldmann et al., 1994).

Nei caprini gli studi sulla suscettibilità alla scrapie sono meno numerosi che negli ovini, ma recentemente sono state descritte molte varianti del gene *PRNP*, alcune delle quali sembrano essere associate a una maggiore suscettibilità o resistenza alla infezione. La crescente attenzione verso la specie caprina si deve anche alla scoperta del passaggio dell'agente infettivo della BSE alle capre, documentata recentemente in Francia a conclusione di una indagine iniziata peraltro circa due anni fa (Eloit et al., 2005). I polimorfismi descritti riguardano i codoni 21, 23, 49, 102, 127, 142, 143, 146, 154, 168, 211, 220 e 240. Di essi sembra che le varianti 142 (Isoleucina/Metionina) e 143 (Istidina/Arginina), rispettivamente gli alleli 142^M e 143^R, conferiscano ai soggetti portatori una maggiore resistenza alla scrapie.

Nei bovini sono descritte numerosissime varianti sia nella regione codificante la proteina sia, più recentemente, nell'introne 1, nel 3' dell'esone 3 e soprattutto nella regione di controllo al 5' dell'esone 1. Sander e collaboratori (2004) hanno documentato in una popolazione di bovini tedeschi ben 60 polimorfismi, la maggioranza dei quali risiede proprio nella regione di controllo al 5' del gene. Per la prima volta nella specie bovina è emersa la possibile associazione tra una inserzione di 23 bp nella regione del promotore del gene *PRNP* (*indel 23 bp*) e la suscettibilità alla BSE. In particolare, animali sani presentano l'inserzione di 23 bp con una frequenza significativamente più elevata rispetto agli animali affetti da BSE. La stessa osservazione è stata fatta per un'altra inserzione di 12 bp (*indel 12 bp*) che si trova nell'introne 1 del gene, ma esiste la possibilità che l'*indel 23 bp* e l'*indel 12 bp* siano in *linkage disequilibrium*, cioè strettamente associate, in tutti gli animali studiati.

Anche negli USA è stato compiuto uno studio approfondito sulla frequenza del polimorfismo *indel 23 bp* in 132 tori, rappresentativi di 39 razze, utilizzati per l'inseminazione artificiale (Seabury et al., 2004). I risultati hanno confermato l'esistenza del polimorfismo con frequenze simili a quelle

riscontrate nella popolazione di bovini tedeschi dello studio originale, a dimostrazione dell'effettiva significatività di questo nuovo marcatore genetico.

La descrizione del polimorfismo probabilmente associato a una maggiore suscettibilità alla BSE (*indel 23 bp* del promotore *PRNP*) è un dato molto recente e da sottoporre a opportune verifiche. rimane inoltre da chiarire se l'effetto primario sulla suscettibilità alla BSE sia dovuto all'*indel 23 bp* o se anche l'*indel 12 bp* svolga un qualche ruolo.

Con ulteriori studi su campioni più rappresentativi di tori riproduttori sarà possibile confermare l'utilità del marcatore ed eventualmente utilizzarlo per una pre-selezione degli animali destinati alla inseminazione strumentale.

L'importanza degli studi sui prioni nelle specie zootecniche è legata soprattutto alla sorveglianza sanitaria, per il rischio della trasmissione delle malattie da prioni dagli animali di interesse zootecnico all'uomo. Come già detto è molto probabile che la variante della CJD nota come vCJD rappresenti il risultato di una trasmissione e adattamento del ceppo bovino (BSE) all'uomo e la dimostrazione che la BSE può passare anche agli ovini e ai caprini non fa che rafforzare la necessità di limitare il più possibile questo passaggio mediante la selezione di animali resistenti all'infezione da prioni.

Le pratiche selettive mirate alla eradicazione delle patologie da prioni, o per lo meno al contenimento del fenomeno, devono evitare la perdita di caratteristiche produttive importanti e la riduzione del pool genico su cui si basano gli attuali schemi di miglioramento genetico, e in tal senso si stanno muovendo i paesi dell'Unione Europea.

Gli studi sulla genetica dei prioni hanno avuto un grande impulso dopo la pubblicazione del regolamento UE n. 270/2002 che impone agli Stati membri di a) tipizzare il gene *PRNP* in tutti i casi di scrapie documentati e b) analizzare il ceppo di prione in quegli animali colpiti dalla scrapie nonostante fossero ritenuti resistenti in base al loro genotipo *PRNP*.

Lo scopo del piano di sorveglianza negli ovi-caprini, che in Italia è coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità e vede coinvolti gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali in tutto il territorio nazionale, è duplice: ampliare le conoscenze sulla base genetica della scrapie a tutta l'area europea per attuare piani di selezione degli animali resistenti alla infezione e identificare la comparsa di focolai di scrapie atipici, causati da nuovi agenti infettanti capaci di colpire anche soggetti con i genotipi finora resistenti.

In Italia sono in corso studi di tipizzazione delle maggiori razze ovine, quali la Sarda, la Comisana e la Massese, nonché caprine, in particolare la Ionica, per la quale sono stati riportati focolai di scrapie sin dal 2001 (Agrimi et al., 2003). I risultati della tipizzazione genetica di *PRNP* sono essenziali come punto di

partenza per l'adozione di piani di accoppiamento mirati all'aumento della frequenza dell'aplotipo "resistente" 136^A 154^R 171^R nelle popolazioni. Le frequenze dei diversi aplotipi sono state recentemente descritte anche nelle pecore di razza Bergamasca. Lo studio ha mostrato in questa razza la predominanza (67%) dell'aplotipo 136^A 154^R 171^Q (Cambuli et al., 2005).

Gli studi sui prioni nella specie zootecnica possono essere estremamente interessanti anche per le ricerche applicative che vedono l'impiego di animali come bioreattori. La disponibilità di animali "prione-free", cioè esenti da prioni, offrirebbe una ulteriore garanzia della sicurezza dei prodotti che si recuperano dai bioreattori e sono principalmente destinati alla somministrazione nell'uomo (farmaci, ormoni e composti "salvavita"). Anche in questo campo sono state avviate iniziative interessanti. Per garantirsi il massimo livello di sicurezza sono stati generati bovini che contengono un gene *PRNP* modificato in modo tale da rendere la proteina che esso produce incapace di trasformarsi nella versione patologica infettiva, né come tale né in seguito a contatto con l'agente infettivo proveniente dall'esterno. Questi bovini sono stati generati in Corea e negli USA e sono attualmente sotto sperimentazione per confermare che abbiano le caratteristiche attese di "immunità" verso prioni infettanti. Se la sperimentazione avrà esiti positivi l'approccio potrà essere esteso potenzialmente a tutti gli animali usati come bioreattori, non solo bovini ma ovi-caprini, con ovvi benefici per quanto riguarda la sicurezza dei prodotti da essi derivati.

Va sottolineato che non essendo a tutt'oggi nota la funzione fisiologica di *PRNP* il campo delle ricerche sui prioni si è allargato a organismi molto distanti evolutivamente, nella speranza che l'identificazione della versione più ancestrale del gene del prione possa fornire indicazioni utili a comprenderne il ruolo fisiologico. In questo senso ha destato molto interesse la descrizione nei pesci Teleostei di un nuovo gene simile a *PRNP*, battezzato dagli autori dello studio *Shadoo*, cioè l'ombra del prione, dal giapponese (Premzl et al., 2004). Naturalmente è del tutto prematuro discutere il ruolo di *Shadoo* nelle patologie da prioni, ma dopo le aspettative, in buona sostanza disattese, sul coinvolgimento di *Doppel* (*PRND*), un altro gene della famiglia dei prioni che però non ha apparentemente alcun ruolo nelle TSE (Comincini et al., 2001), è legittimo sperare che *Shadoo* possa essere in qualche modo messo in relazione alle patologie da prioni.

IL GENE SCD

La componente lipidica del latte ha una grande importanza per le caratteristiche nutrizionali e aromatiche che conferisce al prodotto e per le

implicazioni di ordine tecnologico legate alla sua conservazione e trasformazione.

Il grasso del latte è composto per il 70% da acidi grassi saturi, per il 25% da acidi grassi monoinsaturi e per il 5% da acidi grassi polinsaturi. Il numero di carbonio dei trigliceridi, la distribuzione posizionale degli acidi grassi nei trigliceridi e il loro grado di saturazione influenzano il valore nutrizionale del grasso del latte e la sua funzionalità fisica nei prodotti da esso derivati.

Le variazioni nella composizione del grasso del latte, che possono migliorarne le caratteristiche nutrizionali e il gradimento da parte del mercato, includono: la riduzione del rapporto degli acidi grassi saturi rispetto agli insaturi; l'aumento del livello degli acidi grassi polinsaturi omega 3 e l'aumento del contenuto in acido linoleico coniugato (Hillbrick e Augustin, 2002).

Il grasso del latte dei ruminanti è infatti ricco di acidi grassi saturi (SFA) e presenta un rapporto fra polinsaturi (PUFA) e saturi assai ridotto a causa della bioidrogenazione ruminale dei PUFA di origine alimentare. L'elevata presenza di SFA è una caratteristica nutrizionale considerata negativa poiché un elevato consumo di SFA è associato a un incremento delle lipoproteine seriche a bassa densità (LDL) e del livello di colesterolo, che è riconosciuto come fattore di rischio delle patologie coronariche cardiache.

Il grasso del latte presenta anche un ridotto contenuto di acidi grassi omega 3 ai quali è riconosciuto un ruolo importante nello sviluppo del sistema nervoso centrale e della retina, dello sviluppo cognitivo e della riduzione del rischio di malattie coronariche cardiache. Accanto a queste prerogative negative del grasso del latte, di recente è stato evidenziato che i prodotti alimentari che derivano dai ruminanti sono la fonte naturale più ricca di acido linoleico coniugato (CLA) che si ritiene abbia importanti funzioni positive sulla salute umana. Il CLA sembra infatti inibire la carcinogenesi, prevenire l'aterosclerosi indotta dal colesterolo, ridurre l'accumulo di grasso corporeo, innalzare la risposta immunitaria e promuovere l'aumento della crescita, migliorare il diabete e il metabolismo delle ossa (Tanaka, 2005).

Un aumento del CLA nel latte può dunque migliorare le caratteristiche nutrizionali positive per la salute umana e il gradimento e il consumo dei prodotti lattiero-caseari.

Il termine acido linoleico coniugato riunisce una miscela di isomeri geometrici e di posizione dell'acido linoleico $C_{18:2}$. L'isomero predominante nel grasso dei ruminanti è il cis-9, trans 11 CLA, definito acido rumenico che rappresenta il 75-90% del CLA totale presente, seguito dal trans-7, cis 9 CLA presente per il 3-16% (Kramer et al., 1998).

Il cis-9 trans 11 CLA è un intermedio della bioidrogenazione dell'acido linoleico ad acido stearico. L'isomero cis-9, trans 11 CLA che troviamo nel grasso del latte, sfugge alla completa bioidrogenazione ruminale, viene assorbito nel tratto digestivo e trasportato alla ghiandola mammaria. La concentrazione di CLA nel ruminale è però piuttosto bassa. Si ritiene che la maggior parte del cis-9, trans 11 CLA presente nel grasso del latte dipenda da sintesi endogena che vede coinvolta l'enzima delta 9-desaturasi, a partire dal trans-11C_{18:1} o acido vaccenico, un intermedio della bioidrogenazione ruminale dell'acido linoleico e α -linolenico. Va rilevato che è stata osservata una stretta relazione lineare fra il contenuto in acido vaccenico e cis-9, trans 11 CLA nel latte (Jahreis et al., 1997).

Per aumentare il livello di CLA nel latte si può quindi agire in due modi: aumentare la produzione ruminale di trans 11C_{18:1} o aumentare l'attività dell'enzima delta 9 desaturasi nella ghiandola mammaria (Tanaka, 2005).

Molti lavori hanno evidenziato che variazioni nella dieta e nel razionamento dei ruminanti modificano sensibilmente il contenuto in CLA dei loro prodotti. Si hanno sensibili innalzamenti attraverso il pascolo o la somministrazione di foraggio fresco che contiene acido linoleico e α -linolenico in quantità elevate (Kelly et al., 1998; Stockdale et al., 2003). Anche la presenza di oleaginose nella razione è efficace nell'indurre un aumento di CLA nel grasso del latte (Kelly et al., 1998); inoltre cambiamenti del rapporto fibra/concentrato, alterando la flora microbica ruminale, influenzano il contenuto in CLA del grasso del latte (Bauman et Griinari, 2001). Diversi studi hanno evidenziato l'influenza della razza (Lawless et al., 1999), dell'età degli animali (Peterson et al., 2002) e della stagione (Stanton et al., 1997) sui livelli di CLA del latte.

Variazioni sostanziali del contenuto di CLA (da 3 a 10 volte) sono state osservate in bovine alimentate con la stessa dieta (Jiang et al., 1996; Solomon et al., 2000; Peterson et al., 2002).

Le ragioni di queste variazioni non sono state ben comprese. Da un lato si ritiene che il CLA di derivazione ruminale contribuisca in maniera maggiore quando l'animale è alimentato con foraggio fresco; d'altra parte le variazioni del CLA possono essere legate a variazioni delle condizioni ruminali che portano a una diversa disponibilità del CLA e dei suoi precursori che sfuggono al ruminale.

Accanto a queste ipotesi si sta valutando il ruolo del gene stearoyl-CoA desaturasi (*SCD*) che codifica l'enzima delta 9 desaturasi. È stato supposto infatti che le variazioni di CLA osservate nel latte dei bovini possano essere dovute a differenze nella regolazione dell'espressione del gene *SCD*, oppure a differenze nella struttura dell'enzima dovute a polimorfismo genetico o infine

a differenze in fattori che influenzano l'interazione, enzima-substrato (Peterson et al., 2002).

In *Ovis aries* è stata condotta un'analisi fenotipica preliminare per l'identificazione di QTL associati alla composizione acidica del grasso del latte e al contenuto in CLA e in 2 delle 4 famiglie studiate (backcross Sarda x Lacaune) sul cromosoma 22, dove è localizzato il gene SCD, è stato identificato un QTL putativo per il rapporto fra CLA e acido vaccenico (Carta et al., 2002).

Inoltre sono state prodotte capre transgeniche per l'*SCD*: nel latte di questi animali e di parte della loro prole si è assistito a un aumento del CLA (Reh et al., 2004).

Recentemente è stato isolato e caratterizzato il promotore bovino del gene Stearoyl-CoA desaturasi attraverso una strategia di *genome walking* (Keating et al., 2005), ma finora non sono stati identificati polimorfismi nelle regioni del promotore di bovine appartenenti alle razze Frisona, Montbeliarde, Normanna, Norwegian Red, Charolais Limousin e Kerry.

Nelle banche dati internazionali sono depositate sequenze indicanti presenza di SNP in alcuni esoni del gene SCD e in particolare nell'esone 3, 4 e 6 di razze bovine coreane (acc. n. AAZ73612). SNP e associazioni interessanti sono stati segnalati anche in Holstein, Jersey e Brown Swiss (Secchiari et al., in questa pubblicazione).

L'analisi dei polimorfismi del promotore e del gene *SCD* merita di essere approfondita anche in altre razze. Andrebbe inoltre approfondita l'esistenza di cofattori in grado di modulare l'azione dell'enzima e del suo substrato.

In conclusione, lo studio di questo gene è ancora alle prime battute ma esso è un candidato particolarmente interessante per il miglioramento delle caratteristiche qualitative della componente lipidica del latte. Sarà necessario valutare se le variazioni della composizione del grasso del latte e delle sue proprietà nutrizionali non influenzino anche altre caratteristiche legate alla trasformazione tecnologica e alla qualità finale dei prodotti lattiero-caseari, prima di un loro eventuale inserimento fra gli obiettivi di selezione, e se tale intervento possa essere integrato con altre tipologie di azione poiché la composizione acidica della frazione lipidica del latte, oltre alla selezione genetica può infatti essere modificata attraverso l'alimentazione e l'utilizzo di appropriati processi tecnologici.

IL GENE *MC1R*

Il gene *MC1R* (melanocortin-1 receptor) codifica, per l'omonimo recettore melanocortinico, caratterizzato da sette domini transmembrana espresso sulla

membrana dei melanociti. Questo recettore prende parte al complesso meccanismo di regolazione della biosintesi delle melanine, unico pigmento presente nei mammiferi. Il gene è stato studiato con grande interesse nella specie murina e umana per il suo coinvolgimento nella pigmentazione e nella suscettibilità ai melanomi (Schaffer et al., 2001; Goldstein et al., 2005). Il suo interesse in campo zootecnico è molto recente ed è legato alla sua possibile applicazione in studi di tracciabilità dei prodotti di origine animale.

La pigmentazione è infatti un carattere distintivo fondamentale delle principali razze bovine allevate e costituisce ancora oggi uno dei requisiti per l'iscrizione a numerosi Libri Genealogici (Marilli et al., 2005).

Lo studio del gene *MC1R* si è rivelato particolarmente semplice poiché è costituito da un solo esone. Sono stati evidenziati numerosi polimorfismi nell'uomo (Schaffer et al., 2001), nel topo (Robbins et al., 1993) e nella maggior parte delle specie di interesse zootecnico: dal suino (Kijas et al., 2001) al cavallo (Marklund et al., 1996) al pollo (Takeuchi et al., 1996) e al bovino (Klungland et al., 1995).

Nella specie bovina sono attualmente noti 2 SNP e 4 inserzioni/delezioni. Due di questi polimorfismi SNP sono associati a un particolare fenotipo. Il primo è la sostituzione T296C, che provoca la sostituzione di una Leucina con una Prolina nel secondo dominio transmembrana e si traduce in un recettore costitutivamente attivo che induce un incremento del livello di sintesi di eumelanine. I bovini portatori di questa delezione presentano mantello nero dominante. Il secondo è la delezione di una Guanina in posizione 310, che provoca la formazione di un codone di stop prematuro e si traduce in un recettore incompleto e difettivo, con conseguente sintesi di feomelanine. I bovini caratterizzati da questa delezione allo stato omozigote presentano mantello rosso recessivo.

La frequenza di questi genotipi è stata valutata in diverse razze bovine allevate in Francia (Rouzard et al., 2000; Maudet e Taberlet, 2002) e in Italia (Crepaldi et al., 2003a, 2003b, 2005; Russo et al., 2004). Tutti questi autori hanno suggerito la possibilità di utilizzare tali polimorfismi per la tracciabilità molecolare dei prodotti di alcune razze. In particolare risulta possibile la distinzione di tre gruppi di razze, le razze feomelaniche, le razze eumelaniche nere e le altre, che possono presentare mantelli di colori diversi quali, ad esempio, bruno e grigio.

Queste indicazioni, unite alle nuove conoscenze genetiche e biochimiche sulla pigmentazione, hanno riaperto l'interesse verso ricerche indirizzate a una migliore comprensione del processo di pigmentazione che permetteranno di identificare nei geni implicati nella pigmentazione altri marcatori mo-

lecolari, utili per la valorizzazione e la tracciabilità dei prodotti delle diverse razze bovine allevate.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

In Italia il settore della genomica zootecnica, pur potendo disporre di ricercatori di fama internazionale, non è mai riuscito a ottenere risorse e organizzazione sufficienti per svolgere un ruolo significativo a livello europeo e mondiale. Questo ritardo è ora colmabile; la velocità di analisi dei nuovi strumenti molecolari potrebbe permettere infatti di recuperare il tempo perduto. È necessario però che il processo inizi immediatamente, per evitare che altri paesi studino e brevettino geni appartenenti al patrimonio genetico nazionale. È indispensabile che si formino gruppi di lavoro interdisciplinari che coniughino ricerca di base e applicazione. Genetisti molecolari, quantitativi e bioinformatici devono lavorare fianco a fianco per scoprire nuovi geni, valutarne l'effetto e integrarli nei programmi di selezione. Questi potrebbero essere utilmente affiancati da zootecnici e fisiologi, per la comprensione dei meccanismi di base che regolano l'espressione fenotipica dei caratteri zootecnici.

Le azioni da intraprendere in modo coordinato sono: i) la raccolta e l'aggiornamento sistematico delle conoscenze esistenti in letteratura e delle informazioni presenti nelle banche dati internazionali; ii) la caratterizzazione del patrimonio genetico italiano per geni candidati con funzione nota; iii) la valutazione dei metodi di integrazione delle informazioni molecolari nei programmi di miglioramento genetico tradizionali; iv) l'estensione dell'applicazione dei polimorfismi funzionali (per es. caseine e *DGATI*) nella selezione e per la produzione di latte con particolari caratteristiche; v) la convalida degli effetti di nuovi geni candidati; vi) la ricerca di nuovi geni che controllano caratteri difficilmente migliorabili con metodi tradizionali (a bassa ereditabilità, difficili o troppo costosi da misurare), quali resistenze a malattie, fertilità, longevità e contenuto in metaboliti con influenza sulla salute umana.

È necessario promuovere una ricerca avanzata, pronta ad adottare tempestivamente strategie innovative che possano essere sviluppate in altri settori. Nuovi approcci di *Linkage Disequilibrium mapping* sono stati recentemente adottati nell'uomo per identificare geni responsabili di predisposizioni a malattie multifattoriali (Ellis et al., 2006). Altri, basati sulla genetica di popolazione (*population genomics*), sono stati sviluppati per l'identificazione di regioni sotto selezione (Luikart et al., 2003). Recentemente un approccio innovativo, basato sull'analisi spaziale della diversità genetica e su modelli di

regressione logistica univariata, è stato proposto per l'identificazione dei geni coinvolti nell'adattamento alle condizioni ambientali (Joost, 2005). I risultati preliminari su specie naturali sembrano promettenti (Joost, 2006), ma la strategia deve essere studiata nelle popolazioni zootecniche, per valutarne la validità e l'applicabilità.

La lista di geni con effetto noto su caratteri che possono avere ricadute economiche rilevanti sugli allevamenti, e che possono soddisfare le richieste dei consumatori in termini di sicurezza alimentare, qualità e salubrità delle produzioni, è destinata ad allungarsi rapidamente.

L'utilizzo di dati molecolari su geni singoli, visto il costo decrescente delle tecnologie di analisi, è destinato a espandersi rapidamente, garantendo un vantaggio a quei paesi che saranno in grado di introdurre efficacemente queste informazioni nei loro schemi di selezione.

RIASSUNTO

In questa rassegna vengono descritte le opportunità offerte dalla selezione assistita da geni (*Gene Assisted Selection*) attraverso la descrizione dello stato attuale delle conoscenze su alcuni geni che influenzano caratteri importanti per il miglioramento genetico degli animali da latte.

In particolare vengono esaminati i geni delle caseine del latte e il gene *DGAT1*, che controllano la qualità e quantità delle produzioni lattiero-casearie; il gene *PRNP*, responsabile della sensibilità o tolleranza alla scrapie negli ovi-caprini e alla BSE bei bovini, il gene *SCD*, coinvolto nella biosintesi di CLA (acido linoleico coniugato) nel latte e il gene *MC1R* coinvolto nella pigmentazione e nella tracciabilità delle produzioni.

Investimenti significativi sono stati fatti in diversi paesi europei ed extraeuropei (Stati Uniti, Canada, Israele, Australia, Cina, Giappone) per identificare geni utili negli animali di interesse zootecnico. Progetti sono in corso per il sequenziamento completo del genoma di alcune specie, per la localizzazione di regioni cromosomiche con effetti significativi su diversi caratteri lattiferi e la mappatura di *Quantitative Trait Loci* (QTL), per l'identificazione dei geni e delle mutazioni responsabili (alleli) di questi effetti, per lo studio su larga scala dell'espressione genica e delle proteine prodotte dalla trascrizione e traduzione dei geni. Le informazioni e i nuovi strumenti messi a disposizione da questi progetti consentono non solo di comprendere meglio i meccanismi di azione, di regolazione e di interazioni di geni noti da tempo, ma soprattutto di identificare nuovi geni che controllano sia aspetti quantitativo-qualitativi delle produzioni, sia caratteri difficili o troppo costosi da migliorare attraverso metodi tradizionali, quali la resistenza a malattie, la fertilità, la longevità e il contenuto in metaboliti con influenza sulla salute umana. La lista di geni con effetto noto su caratteri che possono avere ricadute economiche rilevanti sugli allevamenti, e che possono soddisfare le richieste dei consumatori in termini di sicurezza alimentare, di qualità e di salubrità delle produzioni, è quindi destinata ad allungarsi rapidamente.

L'utilizzo di dati molecolari su geni singoli, visto il costo continuamente decrescente delle tecnologie di analisi, ha pertanto una elevata probabilità di espandersi rapidamente,

garantendo un vantaggio a quei paesi che saranno in grado di introdurre efficacemente queste informazioni nei loro schemi di selezione.

ABSTRACT

This paper reviews the present knowledge on a few genes of particular interest for Gene Assisted Selection (GAS) in dairy livestock. These are the casein genes and *DGAT1*, that influence milk production and quality; the *PRNP* gene, involved in tolerance/susceptibility to *scrapie* in sheep and BSE in cattle; the *SCD* gene, involved in milk conjugated linoleic acid (CLA) biosynthesis and the *MC1R* gene, that influences coat colour and is potentially useful for the breed traceability of animal products.

Several EU and Extra European Countries (USA, Canada, Israel, Australia, China, Japan) significantly funded animal genomics, to promote the identification genes of economic interest in livestock. Research is progressing towards the complete genome sequencing in some animal species; the QTL mapping of economic traits and the identification of candidate genes and candidate mutations responsible for the QTL effects; large scale transcript and protein profiling. The mass of information collected through the use of new tools permits to better understand the mechanisms of action, regulation and interaction of known genes and to identify new ones, controlling animal production or influencing traits that are difficult or expensive to improve by traditional methods, as disease resistance, fertility, longevity, nutraceutical metabolite milk content. The number of genes of known effect on economic traits meeting consumer demand in terms of food quality, safety and healthiness is going to increase rapidly.

The use of specific gene information in animal breeding is likely to rapidly expand, as new genes are discovered and the cost of genotyping decreases. Molecular breeding will benefit Countries able to effectively and rapidly introduce molecular information in genetic improvement programmes.

BIBLIOGRAFIA

- AGRIMI U., CONTE M., MORELLI L., DI BARI M.A., DI GUARDO G., LIGIOS C., ANTONUCCI G., AUFIERO G.M., POZZATO N., MUTINELLI F., NONNO R., VACCARI G. (2003): *Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics*, «Vet. Res. Commun.», 27, Suppl. 1, pp. 31-38.
- ALEANDRI R., BUTTAZZONI L.G., SCHNEIDER J.C., CAROLI A., DAVOLI R. (1990): *The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability*, «J. Dairy Sci.», 73, pp. 241-255.
- ALEXANDER L.J., STEWART A.F., MACKINLAY A.G., KAPELINSKAYA T.V., TKACH T.M., GORODETSKY S.I. (1988): *Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene*, «Eur. J. Biochem.», 178, pp. 395-401.
- ARAVIN A., TUSCHL T. (2005): *Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing*, «Febs Lett.», 579 (26), pp. 5830-5840.
- BAUMAN D.E., GRIINARI J.M. (2001): *Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome*, «Liv. Prod. Sci.», 70, pp. 15-29.

- BAYLIS M., GOLDMANN W. (2004): *The genetics of scrapie in sheep and goats*, «Curr. Mol. Med.», 4, pp. 385-396.
- BEJA-PEREIRA A., ERHARDT G., MATOS C., GAMA L., FERRAND N. (2002): *Evidence of a geographical cline of casein haplotypes in Portuguese cattle breeds*, «Anim. Genet.», 33, pp. 295-300.
- BEJA-PEREIRA A., LUIKART G., ENGLAND P.R., BRADLEY D.G., JANN O.C., BERTORELLE G., CHAMBERLAIN A.T., NUNES T.P., METODIEV S., FERRAND N., ERHARDT G. (2003): *Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes*, «Nat. Genet.», 35, pp. 311-313.
- BEVILACQUA C., FERRANTI P., GARRO G., VELTRI C., LAGONIGRO R., LEROUX C., PIETROLÀ E., ADDEO F., PILLA F., CHIANESE L., MARTIN P. (2002): *Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new alpha(s1)-casein variant found in the goat species*, «Eur. J. Biochem.», 269, pp. 1293-1303.
- BOETTCHER P.J., CAROLI A., STELLA A., CHESSA S., BUDELLI E., CANAVESI F., GHIROLDI S., PAGNACCO G. (2004): *Effects of casein haplotypes on production traits in Italian Holstein and Brown Cattle*, «J. Dairy Sci.», 87, pp. 4311-4317.
- BOULANGER A., GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F. (1984): *Polymorphisme des caséines α_{s1} and α_{s2} de la chèvre (*Capra hircus*)*, «Génét. Sél. Evol.», 16, pp. 157-176.
- BOUNIOU C., BRIGNON G., MAHÉ M.F., PRINTZ C. (1994): *Biochemical and genetic analysis of variant C of caprine α_{s2} -casein*, «Anim. Genet.», 25, pp. 173-177.
- BRAUNSCHWEIG M., HAGGER C., STRANZINGER G., PUHAN Z. (2000): *Associations between casein haplotypes and milk production traits of Swiss Brown cattle*, «J. Dairy Sci.», 83, pp. 1387-1395.
- CAMBULI C., GALLI A., BONGIONI G. (2005): *PrP gene polymorphisms associated to scrapie susceptibility in Bergamasca breed sheep*, «Proceeding of XXXX Simposio Internazionale di Zootecnia – Genome to proteome», Lodi, 29 settembre 2005, in corso di stampa.
- CAROLI A., BOLLA P., BUDELLI E., BARBIERI G., LEONE P. (2000): *Effect of k-casein E allele on clotting aptitude of Italian Friesian milk*, «Zoot. Nutriz. Anim.», 3, pp. 127-130.
- CARTA A., PIREDDA G., ADDIS M., CABIDDU A., FIORI M., LEROUX C., CARILLET F. (2002): *Fatty acid composition of sheep milk from backcross Sarda x Lacauene resource population: preliminary QTL detection for CLA content*, «Options Méditerranéennes», 55, pp. 107-113.
- CASES S., SMITH S.J., ZHENG Y.W., MYERS H.M., LEAR S.R., SANDE E., NOVAK S., COLLINS C., WELCH C.B., LUSIS A.J., ERICKSON S.K., FARESE R.V. (1998): *Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 95, pp. 13018-13023.
- CERIOTTI G., MARLETTA D., CAROLI A., ERHARDT G. (2004): *Milk protein polymorphism in taurine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) populations bred in hot climate*, «J. Anim. Breed. Genet.», 121, pp. 404-415.
- CHEN Z.X., RIGGS A.D. (2005): *Maintenance and regulation of DNA methylation patterns in mammals*, «Biochem. Cell Biol.», 83 (4), pp. 438-448.
- CHESSA S., BUDELLI E., BOLLA P., CAROLI A. (2003): *Il polimorfismo della caseina caprina: uno straordinario «puzzle» genetico dalle svariate potenzialità applicative*, «Sci. Tecn. Latt.-Cas.», 54, pp. 343-358.
- CHESSA S., BUDELLI E., CHIATTI F., CITO A.M., BOLLA P., CAROLI A. (2005): *Predominance of β -casein (CSN2) C allele in goat breeds reared in Italy*, «J. Dairy Sci.», 88, pp. 1878-1881.

- CHIANESE L., FERRANTI P., GARRO G., MAURIELLO R., ADDEO F. (1997): *Occurrence of three novel alpha s1-casein variants in goat milk*, «Milk Protein Polymorphism FIL-IDF Palmerston North, New Zeland», pp. 259-267.
- COMINCINI S., FOTI M.G., TRANULIS M.A., HILLS D., DI GUARDO G., VACCARI G., WILLIAMS J.L., HARBITZ I., FERRETTI L. (2001): *Genomic organization, comparative analysis, and genetic polymorphisms of the bovine and ovine prion Doppel genes (PRND)*, «Mamm Genome», 12, pp. 729-733.
- COPPIETERS W., RIQUET J., ARRANZ J.J., BERZI P., CAMBISANO N., GRISART B., KARIM L., MARCQ F., SIMON P., VANMANSHOVEN P., VAGENAAR D., GEORGES M. (1998): *A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14*, «Mamm. Genome», 9, pp. 540-544.
- COSENZA G.F., ILLARIO R., RANDO A., DI GREGORIO P., MASINA P., RAMUNNO L. (2003): *Molecular characterization of the goat CSN1S101 allele*, «J. Dairy Res.», 70 (2), pp. 237-240.
- COSGROVE M.S., WOLBERGER C. (2005): *How does the histone code work?* «Biochem. Cell Biol.», 83 (4), pp. 468-476.
- CRAWFORD A.M., DODDS K.G., EDE A.J., PIERSON C.A., MONTGOMERY G.W., GARMOMWAY H.G., BEATTIE A.E., DAVIES K., MADDOX J.F., KAPPES S.W., STONE R.T., NGUYEN T.C., PENTY J.M., LORD E.A., BROOM J.E., BUITKAMP J., SCHWAIGER W., EPPLIN J.T., MATTHEW F.P., MATTHEW M.E., HULME D.J., BEH K.J., MCGRAW R.A., BEATTIE C.W. (1995): *An Autosomal Genetic Linkage Map of the Sheep Genome*, «Genetics», 140, pp. 703-724.
- CREPALDI P., FORNARELLI F., MARILLI M. (2005): *MC1R gene: comparison between different farm animal species*, «Ital. J. Anim. Sci.», 4, suppl. 2, pp. 43-45.
- CREPALDI P., MARILLI M., GORNI C., MEGGIOLARO D., CICOGNA M., RENIERI C. (2003a): *Preliminary study on MC1R polymorphisms in some cattle breeds raised in Italy*, «Ital. J. Anim. Sci.», 2, Suppl. 1, pp. 13-15.
- CREPALDI P., MARILLI M., MEGGIOLARO D., FORNARELLI F., RENIERI C., MILANESI E., AJMONE-MARSAN P. (2003b): *The MC1R gene polymorphism in some cattle breeds raised in Italy*, «Pigment Cell Res.», 16, p. 578.
- DAMIANI G., BUDELLI E., FLORIO S., CAROLI A., PAGNACCO G. (2000a): *Polymorphism of κ -casein SINE Bov-A2 and CYP21-hydroxylase in some bovine breeds*, «Zoot. Nutr. Anim.», 3, pp. 145-148.
- DAMIANI G., FERRETTI L., ROGNONI G., SGARAMELLA V. (1990): *Restriction fragment length polymorphism analysis of the kappa-casein locus in cattle*, «Anim. Genet.», 21, pp. 107-114.
- DAMIANI G., FLORIO S., BUDELLI E., BOLLA P., CAROLI A. (2000b): *Single nucleotide polymorphisms (SNPs) within Bov-A2 SINE in the second intron of bovine and buffalo κ -casein (CSN3) gene*, «Anim. Genet.», 31, pp. 277-279.
- DAMIANI G., PILLA F., LEONE P., CACCIO S. (1992): *Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine beta-casein B variant*, «Anim. Genet.», 23, pp. 561-565.
- DI STASIO L., MARIANI P. (2000): *The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production*, «Zoot. Nutr. Anim.», 26, pp. 69-90.
- ELLIOT R.B., HARRIS D.P., HILL J.P., BIBBY N.J., WASMUTH H.E. (1999): *Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption*, «Diabetologia», 42, pp. 292-296.
- ELLIS N.A., KIRCHHOFF T., MITRA N., YE T.Z., CHUAI S., HUANG H., NAFA K., NORTON L., NEUHAUSEN S., GORDON D., STREUWING J.P., NAROD S., OFFIT K. (2006): *Loca-*

- lization of breast cancer susceptibility loci by genome-wide SNP linkage disequilibrium mapping, «Genet Epidemiol.», 30, pp. 48-61.
- ELOIT M., ADJOU K., COULPIER M., FONTAINE J.J., HAMEL R., LILIN T., MESSIAEN S., ANDREOLETTI O., BARON T., BENCsik A., BIACABE A.G., BERINGUE V., LAUDE H., LE DUR A., VILOTTE J.L., COMOY E., DESLYS J.P., GRASSI J., SIMON S., LANTIER F., SARRADIN P. (2005): *BSE agent signatures in a goat*, «Vet Rec.», 156, pp. 523-524.
- ERHARDT G., PRINZENBERG E.M., BUCHBERGER J., KRICK-SALECK H., KRAUSE I., MILLER M. (1997): *Bovine κ -casein G detection, occurrence, molecular genetic characterization, genotyping and coagulation properties*, «Proc. IDF Milk Protein Polymorphism Seminar II», Palmerston North, New Zealand, International Dairy Federation, Bruxelles, pp. 328-329.
- FARNIR F., GRISART B., COPPIETERS W., RIQUET J., BERZI P., CAMBISANO N., KARIM L., MNI M., MOISIO S., SIMON P., WAGENAAR D., VILKKI J., GEORGES M. (2002): *Simultaneous mining of linkage and linkage disequilibrium to fine map quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: revising the location of a quantitative trait locus with major effect on milk production on bovine chromosome 14*, «Genetics», 161, pp. 275-287.
- FARRELL H.M., JIMENEZ-FLORES R., BLECK G.T., BROWN E.M., BUTLER J.E., CREAMER L.K., HICKS C.L., HOLLAR C.M., NG-KWAI-HANG F., SWAISGOOD H.E. (2004): *Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth edition*, «J. Dairy Sci.», 87, pp. 1641-1674.
- FELIGINI M., CUBRIC-CURIK V., PARMA P., CURIK I., GREPPI G.F., ENNE G. (2002): *Polymorphism of kappa-casein in Italian goat breeds: a new ACRS-PCR designed DNA test for the characterisation of A and B alleles*, «Food Technology and Biotechnology», 40 (4), pp. 293-298.
- FELIGINI M., FRATI S., CUBRIC CURIK V., BRAMBILLA A., PARMA P., CURIK I., GREPPI G.F., ENNE G. (2005): *Caprine alphas1-casein polymorphism: characterisation of A, B, E and F variants by means of various biochemical and molecular techniques*, «Food Technol. Biotechnol.», 43 (2), pp. 123-132.
- FERRETTI L., LEONE P., SGARAMELLA V. (1990): *Long range restriction analysis of the bovine casein genes*, «Nucleic Acids Res.», 18, pp. 6829-6833.
- GOLDMANN W., HUNTER N., SMITH G., FOSTER J., HOPE J. (1994): *PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie*, «J. General Virology», 75, pp. 989-995.
- GOLDSTEIN A.M., LANDI M.T., TSANG S., FRASER M.C., MUNROE D.J., TUKER M.A. (2005): *Association of MC1R variants and risk of melanoma in melanoma-prone families with CDKN2A mutations*, «Cancer Epid. Biomarkers and prevention», 14, pp. 2208-2212.
- GRISART B., COPPIETERS W., FARNIR F., KARIM L., FORD C., CAMBISANO N., MNI M., REID S., SPELMAN R., GEORGES M., SNELL R. (2002): *Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition*, «Genome Res.», 12, pp. 222-231.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., BRIGNON G., DI STASIO L., JEUNET R. (1987): *A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat $\alpha s1$ casein*, «Génét. Sél. Evol.», 19, pp. 399-412.
- GROSCLAUDE F., MARTIN P. (1997): *Casein polymorphisms in the goat*, «Proc. IDF Milk Protein Polymorphism Seminar II», Palmerston North, New Zealand, International Dairy Federation, Bruxelles, pp. 241-253.
- HARTWIG A., TESCHEMACHER H., LEHMANN W., GAULY M., ERHARDT G. (1997): *In-*

- fluence of genetic polymorphism in bovine milk on the occurrence of bioactive peptides*, «Proc. IDF Milk Protein Polymorphism Seminar II», Palmerston North, New Zealand, International Dairy Federation, Bruxelles, pp. 459-460.
- HAYES H., PETIT E., BOUNIOL C., POPESCU P. (1993): *Localisation of the alpha_{s2}-casein gene (CASAS2) to the homologous cattle, sheep and goat chromosome 4 by in situ hybridisation*, «Cytogenet. Cell Genet.», 64, pp. 282-285.
- HAYES H., PETIT E. (1993): *Mapping of the β -lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence in homologous cattle, sheep, and goat chromosomes*, «Mamm. Genome», 4, pp. 207-210.
- HEYEN D.W., WELLER J.I., RON M., BAND M., BEEVER J.E., FELDMESSER E., DA Y., WIGGANS G.R., VANRADEN P.M., LEWIN H.A. (1999): *A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle*, «Physiol. Genomics», 1, pp. 165-175.
- HILL A.F., DESBRUSLAIS M., JOINER S., SIDLE K.C., GOWLAND I., COLLINGE J., DOEY L.J., LANTOS P. (1997): *The same prion strain causes vCJD and BSE*, «Nature», 389, pp. 448-450.
- HILLBRIK G., AUGUSTIN M.A. (2002): *Milkfat characteristics and functionality: opportunities for improvement*, «Australian Journal of Dairy technology», 57, pp. 45-51.
- IKONEN T., BOVENHUIS H., OJALA M., RUOTTINEN O., GEORGES M. (2001): *Associations between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows*, «J. Dairy Sci.», 84, pp. 507-514.
- JAHREIS G., FRITDSCHÉ J., STEINHART H. (1997): *Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system*, «Nutrition Research», 17, pp. 1479-1484.
- JANN O., CERIOTTI G., CAROLI A., ERHARDT G. (2002a): *A new variant in exon VII of bovine β -casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds*, «J. Anim. Breed. Genet.», 119, pp. 65-68.
- JANN O., IBEAGHA-AWEMU E., ÖZBEYAZ C., ZARAGOZA P., WILLIAMS J.L., AJMONE-MARSAN P., LENSTRA J.A., MOAZAMI-GOUDARZI K., ERHARDT G. (2004a): *Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus*, «Genet. Sel. Evol.», 36, pp. 243-257.
- JANN O., PRINZENBERG E.M., BRANDT H., WILLIAMS J.L., AJMONE-MARSAN P., ZARAGOZA P., ÖZBEYAZ C., ERHARDT G. (2002b): *Intragenic haplotypes at the bovine CSN1S1 locus*, «Arch. für Tierzucht», 45, pp. 13-21.
- JANN O., PRINZENBERG E.M., LUIKART G., CAROLI A., ERHARDT G. (2004b): *High polymorphism in the κ -casein (CSN3) gene from wild and domestic caprine species revealed by DNA sequencing*, «J. Dairy Res.», 71, pp. 188-195.
- JIANG J., BJOERCK L., FOUNDEN R., EMANUELSON M. (1996): *Occurrence of conjugated cis-9, trans 11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen*, «Journal of Dairy Sci.», 79, pp. 438-445.
- JOOST S. (2006): *The geographical dimension of genetic diversity. A GIScience contribution for the conservation of animal genetic resources*, Ph.D. Thesis, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland.
- JOOST S., THE ECONOGENE CONSORTIUM (2005): *Combining biotechnologies and GIScience for livestock genetic resources conservation*, «Proceedings of the 8th AGILE Conference», pp. 231-240.
- KEATING A.F., STANTON C., MURPHY J.J., SMITH T.J., ROSS R.P., CAIRNS M.T. (2005): *Isolation and characterization of the bovine Stearoyl-CoA desaturase promoter and analysis of polymorphisms in the promoter region in dairy cows*, «Mammalian genome», 16, pp. 184-193.

- KELLY M.L., BERRY J.R., DWYER D.A., GRIINARI J.M., CHOUINARD P.Y., VAN AMBURGH M.E., BAUMAN D.E. (1988): *Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating cows*, «Journal of Nutrition» 128, pp. 881-885.
- KIJAS J.M.H., MOLLER M., PLASTOW G., ANDERSSON L. (2001): *A frameshift mutation in MC1R and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs*. 158, pp. 779-785.
- KLUNGLAND H., VAGE D.I., GOMEZ-RAYA L., ADALSTEISSON S., LIEN S. (1995): *The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination*, «Mammalian genome», 6, pp. 636-639.
- KRAMER J.K.G., PARODI P.W., JENSEN R.G., MOSSOBA M.M., YURAWECZ M.P., ADLOF R.O. (1998): *Rumenic acid: a proposal common name for the major conjugated linoleic acid isomers found in natural products*, «Lipids», 33, p. 853.
- LAGONIGRO R., PIETROLA E., D'ANDREA M., VELTRI C., PILLA F. (2001): *Molecular genetic characterization of the goat α_{s2} -casein E allele*, «Anim. Genet.», 32, pp. 391-393.
- LAWLESS F., STANTON C., L'ESCOPI P., DEVERRY R., DILLON P., MURPHY J.J. (1999): *Influence of breed on bovine milk cis-9, trans 11-conjugated linoleic acid content*, «Livestock production Sci.», 62, pp. 43-49.
- LIEN S., GOMEZ-RAYA L., STEINE T., FIMLAND E., ROGNE S. (1995): *Associations between casein haplotypes and milk yield traits*, «J. Dairy Sci.», 78, pp. 2047-2056.
- LIEN S., KANTANEN J., OLSAKER I., HOLM L.E., EYTHORSDDOTTIR E., SANDBERG K., DALSGAID B., AND ADALSTEINSSON S. (1999): *Comparison of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds*, «Anim. Genet.», 30, pp. 85-91.
- LUIKART G., ENGLAND P.R., TALLMON D., JORDAN S., TABERLET P. (2003): *The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing*, «Nature Rev.», 4, pp. 981-994.
- MAHÉ M.F., GROSCLAUDE F. (1993): *Polymorphism of β -casein in the Creole goat of Guadeloupe, evidence for a null allele*, «Génét. Sél. Evol.», 25, pp. 403-408.
- MAHÉ M.F., MIRANDA G., QUEVAL R., BADO A., ZAFINDRAJONA P.S., GROSCLAUDE F. (1999): *Genetic polymorphism of milk proteins in African Bos taurus and Bos indicus populations. Characterization of variants α_{s1} -Cn H and α -Cn J*, «Genet. Sel. Evol.», 31, pp. 239-253.
- MARILLI M., FORNARELLI F., CASALEGGI M., MILANESI E., FILIPPINI F., CREPALDI P. (2005): *Il gene MC1R e il colore del mantello della razza romagnola*, «Proc. 4th World Italian Beef Cattle Congress», Perugia, Italy, April 29th-May 1st, pp. 241-246.
- MARKLUNG L., JOHANSSON MOLLER M., SANDBERG K., ANDERSSON L. (1996): *A missense mutation in the gene for melanocyte stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat colour in horses*, «Mammalian genome», 7, pp. 895-899.
- MARTIN P., SZYMANOWSKA M., ZWIERZCHOWSKI L., LEROUX C. (2002): *The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminants milks*, «Reprod. Nutr. Dev.», 42, pp. 433-459.
- MARTIN, P., OLLIVIER-BOUSQUET, M., GROSCLAUDE, F. (1999): *Genetic polymorphism of casein: a tool too investigate casein micelle organization*, «Int. Dairy J.», 9, pp. 163-171.
- MAUDET C., TABERLET P. (2002): *Holstein's milk detection in cheeses inferred from Melanocortin Receptor 1 (MC1R) gene polymorphism*, «J. Dairy Sci.», 85, pp. 707-715.
- MEAD S. (2006): *Prion disease genetics*, «Eur. J. Hum. Genet.», [Epub ahead of print].
- MEDRANO J.F., AGUILAR-CORDOVA E. (1990): *Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis*, «Anim. Biotech.», 1, pp. 73-77.

- MERLIN P., DI STASIO L. (1982): *Study on milk protein loci in some decreasing Italian cattle breeds*, «Ann. Génét. Sél. anim.», 14, pp. 17-28.
- MOAZAMI-GOUDARZI K., BELEMSAGA D.M.A., CERIOTTI G., LALOË D., FAGBOHOUN F., KOUAGOU N'T., SIDIBÈ I., CODJIA V., CRIMELLA C., GROSCLAUDE F., TOURÈ S.M. (2001): *Caractérisation de la race bovine Somba à l'aide de marqueurs molécolaires*, «Revue Elev. Méd. Vet. Pays trop.», 54, pp. 129-138.
- NATALE M., BISSON C., MONTI G., PELTRAN A., PERONO GAROFFO L., VALENTINI S., FABRIS C., BERTINO E., COSCIA A., CONTI A. (2004): *Cow's milk allergens identification by two dimensional immunoblotting and mass spectrometry*, «Mol. Nutr. Food Res.», 48, pp. 363-369.
- NEVEU C., MOLLÉ D., MORENO J., MARTIN P., LÉONID J. (2002): *Heterogeneity of caprine beta-casein elucidated by RP-HPLC/MS: genetic variants and phosphorylation*, «J. Protein Chem.», 21, pp. 557-567.
- PARMA P., FELIGINI M., NOÈ L., ALEANDRI R., IAMETTI S., GREPPi G.F., ENNE G. (1999): *Detection of the goat α 2-casein genetic variants by ASA-PCR*, «Animal Genetics», 30, pp. 231.
- PARRY H.B. (1962): *Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep*, «Heredity», 17, pp. 75-105.
- PERSUY M.A., PRINTZ C., MEDRANO J.F., MERCIER J.C. (1999): *A single nucleotide deletion resulting in a premature stop codon is associated with marked reduction of transcripts from a goat β -casein null allele*, «Anim. Genet.», 30, pp. 444-451.
- PETERSON D.G., KELSEY J.A., BAUMAN D.F. (2002): *Analysis of variation in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat of dairy cows*, «Journal of Dairy Sci.», 85, pp. 2164-2172.
- POPESCU C.P., LONG S., RIGGS P., WOMACK J., SCHMUTZ S., FRIES R., GALLAGHER D.S. (1996): *Standardization of cattle karyotype nomenclature: report of the committee for the standardization of the cattle karyotype*, «Cytogenet Cell Genet.», 74, pp. 259-261.
- PREMZL M., GREADY J.E., JERMIIN L.S., SIMONIC T., MARSHALL GRAVES J.A. (2004): *Evolution of vertebrate genes related to prion and Shadoo proteins – clues from comparative genomic analysis*, «Mol. Biol. Evol.», 12, pp. 2210-2231.
- PRINZENBERG E.M., GUTSCHER K., CHESSA S., CAROLI A., ERHARDT G. (2005): *Caprine k-casein (CSN3) polymorphism: new developments of the molecular knowledge*, «J. Dairy Sci.», 88, pp. 1490-1498.
- PRINZENBERG E.M., KRAUSE I., ERHARDT G. (1999): *SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, AI)*, «Anim. Biotechnol.», 10, pp. 49-62.
- PRINZENBERG E.M., WEIMANN C., BRANDT H., BENNEWITZ J., KALM E., SCHWERIN M., ERHARDT G. (2003): *Polymorphism of the bovine CSN1S1 promoter: Linkage mapping, intragenic haplotypes, and effect on milk production traits*, «J. Dairy Sci.», 86, pp. 2696-2705.
- PRUSINER S. (1998). *Prions*, «Porc. Natl. Acad. Sci. USA», 95, pp. 13363-13383.
- RAMUNNO L., COSENZA G., PAPPALARDO M., LONGOBARDI E., GALLO D., PASTORE N., DI GREGORIO P., RANDO A. (2001a): *Characterization of two new alleles at the goat CSN1S2 locus*, «Anim. Genet.», 32, pp. 264-268.
- RAMUNNO L., COSENZA G., RANDO A., PAUCIULLO A., ILLARIO R., GALLO D., DI BERARDINO D., MASINA P. (2005): *Comparative analysis of gene sequence of goat CSN1S1 F and N alleles and characterization of CSN1S1 transcript variants in mammary gland*, «Gene», 345, pp. 289-299.

- RAMUNNO L., COSENZA G., RANDO A., ILLARIO R., GALLO D., DI BERARDINO D., MASINA P. (2004): *The goat α_{s1} -casein gene: gene structure and promoter analysis*, «Gene», 334, pp. 105-111.
- RAMUNNO L., LONGOBARDI E., PAPPALARDO M., RANDO A., DI GREGORIO P., COSENZA G., MARIANI P., PASTORE N., MASINA P. (2001b): *An allele associated with a non detectable amount of alphas2-casein in goat milk*, «Anim. Genet.», 32, pp. 19-26.
- RAMUNNO L., MARIANI P., PAPPALARDO M., RANDO A., CAPUANO M., DI GREGORIO P., COSENZA G. (1995): *Un gene ad effetto maggiore sul contenuto di caseina β nel latte di capra*, «Atti XI Conv. ASPA», Grado (GO), 19-22 giugno, pp. 185-186.
- RANDO A., DI GREGORIO P., RAMUNNO L., MARIANI P., FIORELLA A., SENESE C., MARLETTA D., MASINA P. (1998): *Characterization of the CSN1AG allele of the bovine α_{s1} -casein locus by the insertion of a relict of a long interspersed element*, «J. Dairy Sci.», 81, pp. 1735-1742.
- RANDO A., PAPPALARDO M., CAPUANO M., DI GREGORIO P., RAMUNNO L. (1996): *Two mutations might be responsible for the absence of β -casein in goat milk*, «Anim. Genet.», 27 (Suppl. 2), p. 31.
- REH W.A., MAGA E.A., COLLETTE N.M., MOYER A., CONRAD-BRINK J.S., TAYLOR S.J., DEPETERS E.J., OPPENHEIM S., ROWE J.D., BONDURANT R.H., ANDERSON G.B., MURRAY J.D. (2004): *Hot topic: using stearyl-CoA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition*, «J. Dairy Sci.», 87, pp. 3510-3504.
- REMUEF F. (1993): *Influence du polymorphisme génétique de la caseine α_1 caprine sur les caractéristique physico-chimiques et technologiques du lait*, «Lait», 73, pp. 549-557.
- RIQUET J., COPPIETERS W., CAMBISANO N., ARRANZ J.-J., BERZI P., DAVIS S., GRISART B., FARNIR F., KARIM L., MNI M., SIMON P., TAYLOR J.F., VANMANSHOVEN P., WAGENAAR D., WOMACK J.E., GEORGES M. (1999): *Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 96, pp. 9252-9257.
- ROBBINS L.S., NADEAU J.H., JOHNSON K.R., KELLY M.A., ROSELLI-REHFUSS L., BAAK E., MONTJOY K.G., CONE R.D. (1993): *Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function*, «Cell», 72, pp. 827-834.
- ROUZAUD F., MARTIN J., GALLET P.F., DELOURME D., GOULEMONT-LAGER V., AMIGUES Y., MENISSIER F., LEVEZIEL H., JULIEN R., OULMOUDEN A. (2000): *A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (MC1R)*, «Genet. Sel. Evol.», 32, pp. 511-520.
- RUSSO V., FONTANESI L., SCOTTI E., TAZZOLI M., DALL'OLIO S., DAVOLI R. (2004): *Study of melanocortin receptor 1 (MC1R) gene polymorphisms in some Italian dairy cattle breeds and their possible use for traceability of milk and milk products*, «Proc. 55th European congress EAAP», p. 62.
- SANDER P., HAMANN H., PFEIFFER I., WEMHEUER W., BREINIG B., GROSCHUP M.H., ZIEGLER U., DISTL O., LEEB T. (2004): *Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds*, «Neurogenetics», 1, pp. 19-25.
- SCHAFER J.V., JEAN M.D., BOLOGNIA M.D. (2001): *The melanocortin-1 receptor. Red hair and beyond*, «Arch. Dermatol.», 37, pp. 1477-1485.
- SCHLIEBEN S., ERHARDT G., SENFT B. (1991): *Genotyping of bovine k-casein (k-CNA, k-CNB, k-CNC, k-CNE) following DNA sequence amplification and direct sequencing of k-CNE PCR product*, «Anim. Genet.», 22, pp. 333-342.
- SCHLIMME E., MEISEL H. (1995): *Casein-bound phosphorus and contents of free amino acids in milk subjected to different heat treatments*, «Kieler Milch. Forschung», 47, pp. 289-295.

- SEABURY C.M., WOMACK J.E., PIEDRAHITA J., DERR J.N. (2004): *Comparative PRNP genotyping of U.S. cattle sires for potential association with BSE*, «Mamm. Genome», 15, pp. 828-833.
- SOLOMON R., CHASE L.E., BEN-GHEDALIA D., BARMAN D.E. (2000): *The effect of non-structural carbohydrate and additino of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows*, «Journal of Dairy Sci.», 83, pp. 1322-1329.
- SPELMAN R. J., FORD C. A., McELHINNEY P., GREGORY G.C., SNELL R.G. (2002): *Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population*, «J. Dairy Sci.», 85, pp. 3514-3517.
- STANTON C., LAWLESS F., KJELLMER G., HARRINGTON D., DEVERY R., CONNOLLY J.F., MURPHY J. (1997): *Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content*, «Journal of Food Sci.», 62, pp. 1083-1086.
- STOCKDALE C.R., WALKER G.P., WALES W.J., DALLEY D.E., BIRKETT A., SHEN Z., DOYLE P.T. (2003): *Influence of pasture and concentrates in the diet of grazing dairy cows on the fatty acid composition of milk*, «Journal of Dairy Science», 70, pp. 267-276.
- TAKEUCHI S., SUZUKI S., HIROSE S., YABUUCHI M., SATO C., YACAMOTO H., TAKAHASHI S. (1996): *Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortine 1 receptor gene*, «Biochem. Biophys. Acta», 1206, pp. 122-126.
- TANAKA K. (2005): *Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions*, «Animal Science Journal», 76, pp. 291-303.
- THREADGILL D.W., WOMACK J.E. (1990): *Genomic analysis of the major bovine milk proteins genes*, «Nucleic Acids Res.», 18, pp. 6935-6942.
- WIENHOLDS E., PLASTERK R.H. (2005): *MicroRNA function in animal development*, «Febs letters», 579, pp. 5911-5922.
- WINTER A., KRAMER W., WERNER F.A., KOLLERS S., KATA S., DURSTEWITZ G., BUITKAMP J., WOMACK J.E., THALLER G., FRIES R. (2002): *Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 99, pp. 9300-9305.

VINCENZO RUSSO*, LUCA BUTTAZZONI**, PAOLO CARNIER***,
LUCA FONTANESI*, ORESTE FRANCI****

Selezione tradizionale e assistita da marcatori nei suini

SELEZIONE TRADIZIONALE

Breve storia

In Italia i primi tentativi di attuare la selezione nei suini sono stati effettuati all'inizio del secolo scorso da parte di alcuni allevatori delle regioni dell'Italia centrale, nelle quali si concentrava l'allevamento da riproduzione per la produzione di suini svezzati di circa 15-30 kg di peso vivo o di magroni di 50-80 kg, che riforniva gli allevamenti per l'ingrasso dell'Italia settentrionale. L'attività di selezione si svolgeva a livello aziendale per iniziativa di singoli allevatori.

La selezione ufficiale ha avuto inizio negli anni '30 con l'intervento e l'assistenza del Ministero dell'Agricoltura. Le razze interessate erano la Large White e alcune razze locali. Per ogni razza e per ogni provincia interessata furono costituiti i cosiddetti "nuclei di selezione", nei quali, i singoli animali erano registrati su schede e sottoposti a valutazione morfologica per il miglioramento della conformazione e, quando possibile, al controllo ponderale per misurare la velocità di crescita. Sulle scrofe venivano rilevati e registrati numerosi caratteri materni, come età al primo parto, intervallo tra i parti, numero nati e svezzati per parto. Per i verri non si attuava alcun controllo, ma c'era l'aspirazione ad attuare un controllo di progenie sul modello di quanto avveniva in

* DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Università degli Studi di Bologna

** Associazione Nazionale Allevatori Suini, Roma

*** Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Padova

**** Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Firenze

Danimarca (Buiatti, 1978). L'organizzazione unitaria della selezione dei suini a livello nazionale risale agli anni '60 del secolo scorso. In quegli anni, infatti, nasce l'Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS), come associazione di secondo grado delle Associazioni provinciali ed interprovinciali di allevatori, e viene costituito il Libro genealogico della specie suina. L'Associazione viene legalmente riconosciuta dal Ministero dell'Agricoltura che le affida la tenuta del Libro genealogico.

Alla fine di quegli stessi anni si verificò un evento sanitario che mutò profondamente i caratteri della suinicoltura nazionale: l'epidemia di Peste Suina Africana nell'Italia centrale, per la cui eradicazione le Autorità sanitarie dovettero bloccare per un lungo periodo qualunque movimentazione di suini dal Centro al Nord Italia. Veniva così ad interrompersi il tipico sistema produttivo italiano che vedeva la riproduzione suina concentrata nelle regioni centrali (Toscana, Marche ed Umbria) e l'ingrasso dei suini nella Pianura Padana, soprattutto come produzione accessoria ai caseifici. Il processo di cambiamento, certamente aiutato da altre concause quali la crisi della mezzadria, comportò la diffusione in Pianura Padana degli allevamenti da riproduzione.

Il Libro genealogico iniziò la propria attività con l'obiettivo principale di migliorare i caratteri di economia di allevamento, ed in particolare l'indice di conversione degli alimenti, e le caratteristiche della carcassa. Si trattava del tipico approccio tecnico agrario di allora, teso ad aumentare l'efficienza di produzione ed a massimizzare i volumi produttivi.

Il caposaldo del programma nazionale di selezione fu l'introduzione della valutazione genetica dei verri presso i centri genetici appositamente costruiti. La valutazione dei verri iniziò con il metodo del *progeny test* sull'esempio del Libro genealogico danese che lo aveva messo a punto e lo praticava con successo da oltre cinquant'anni. I verri candidati alla riproduzione venivano valutati in una prima fase con punteggi separati per le caratteristiche di economia dell'allevamento (velocità di crescita e indice di conversione) e per la percentuale di tagli magri e grassi e successivamente con un indice di selezione aggregato per le stesse caratteristiche, rilevate su 16 figli, metà maschi e metà femmine, provenienti in eguale numero da 4 covate ottenute da altrettante scrofe non parenti tra loro e con il verro. La prova iniziava con l'immissione dei suinetti di circa 20 kg di peso vivo e si concludeva con la loro macellazione a circa 125 kg. Il controllo iniziato sulla razza Large White era stato esteso successivamente alla Landrace.

Questo metodo fu utilizzato in modo esclusivo fino al 1974 e contemporaneamente al *combined test* fino al 1979.

Nel 1980 il *progeny test* fu definitivamente sostituito col *combined test* perché si era rivelato molto costoso e, soprattutto, poco efficiente in termini di progresso genetico. Rispetto alla valutazione con il *combined test* quella effettuata con il *progeny test*, sebbene fornisca una stima più accurata del valore genetico del verro, richiede per la prova un più elevato numero di soggetti, determina un aumento notevole dell'intervallo di generazione e riduce l'intensità della selezione, stante il numero limitato di posti disponibili nei centri di controllo genetico.

Con il *combined test* la valutazione veniva effettuata su un gruppo di quattro soggetti: il verro candidato, un maschio castrato e due femmine. Il gruppo di prova veniva inviato ai centri di controllo genetico dove venivano rilevati l'incremento ponderale giornaliero e l'indice di conversione su tutti gli animali e le caratteristiche di carcassa sui soli fratelli.

Inoltre per venire incontro alle esigenze dell'industria di trasformazione, che lamentava uno scadimento della qualità della carne (Russo, 1988), si introdusse il test col gas alotano per identificare ed eliminare i soggetti affetti dalla malattia ereditaria *Porcine stress syndrome*, che sono predisposti alla produzione di carni PSE.

Il *combined test*, seppure con alcuni cambiamenti riguardanti il numero di fratelli pieni del gruppo di prova ridotto da tre a due e il peso di macellazione portato a 145 kg di peso vivo e l'introduzione della misura ultrasonica dello spessore del lardo dorsale, fu utilizzato fino al 1990, oltre che nelle razze Large White e Landrace anche nella Duroc, che in quegli anni si era affermata come razza incrociante sulle scrofe Large White x Landrace ai fini della produzione di suini pesanti da macello, e sporadicamente su altre razze (Hampshire, Landrace Belga e Pietrain) per le quali era stata attivata una sezione del Libro genealogico.

Nel 1990 il *combined test* fu sostituito con il *sib test*. Il cambiamento non fu determinato da motivi genetici ma da difficoltà di ordine riproduttivo e sanitario. Infatti i verri valutati positivamente alla fine della prova quando ritornavano negli allevamenti di origine manifestavano difficoltà al salto per mancanza di allenamento precoce o per problemi agli arti causati dalle particolari condizioni ambientali dei centri di controllo genetico. Inoltre gli allevatori per motivi sanitari manifestavano contrarietà a reintrodurre nei propri allevamenti i verri tenuti nei centri, anche quando avevano ottenuto una eccellente valutazione.

Questo cambiamento rappresentò l'epifenomeno di una revisione generale del programma di selezione nazionale; dagli obiettivi, all'organizzazione delle prove, alla diffusione del miglioramento genetico a tutto il patrimo-

nio suinicolo nazionale, fino ai dettagli tecnici delle elaborazioni statistiche. Dall'inizio degli anni '80 era in corso in Italia una discussione sulla necessità della revisione della selezione, che, anche su sollecitazione dell'allora Ministero dell'Agricoltura che spingeva tutti i Libri genealogici a presentare un programma di sviluppo tecnico pluriennale, portò l'ANAS a definire uno schema di selezione completamente rinnovato in diversi aspetti.

Infatti, il panorama dell'agricoltura e della suinicoltura italiana era molto cambiato. In quegli anni stava infatti maturando la politica della caratterizzazione qualitativa dei prodotti agro-alimentari nazionali e della loro distinzione dalle derrate di importazione.

I nuovi indirizzi richiedevano quindi di definire, differenziare e qualificare in modo più forte la nostra suinicoltura, da sempre orientata a produrre un tipo di suino idoneo alla produzione di salumi di alto pregio diverso da quello degli altri paesi europei. La politica della differenziazione rappresentava una buona opportunità per compensare il deficit competitivo della suinicoltura italiana, che non poteva contare per l'alimentazione sui sottoprodotti a basso costo impiegati nel Nord Europa. Coerentemente con questi nuovi indirizzi nel 1990 furono emanate le nuove leggi di tutela dei prosciutti di Parma e San Daniele che prevedevano per la prima volta l'origine nazionale della materia prima, e nel 1992 venne emanato il Regolamento europeo 2081/92 che istituì le denominazioni di origine (DOP e IGP). Si trattava di norme che finalmente consentivano di legare la produzione agricola locale al prodotto finito, rendendo realisticamente possibili gli investimenti nella specializzazione delle produzioni agricole. In tal senso, i selezionatori italiani di suini avevano percorso i tempi, scommettendo sulla differenziazione qualitativa del prodotto con qualche anno di anticipo.

Schema attuale di selezione per la produzione del suino pesante da salumeria

Il nuovo schema di selezione fu pienamente attivato nel settembre del 1990 e nella sua impostazione generale non è più cambiato. Il nuovo schema di selezione riguarda soltanto le razze Large White italiana, Landrace italiana e Duroc italiana, le uniche ritenute idonee per la produzione del suino pesante destinato a fornire cosce per la produzione dei prosciutti italiani a denominazione di origine protetta.

Esso è imperniato sulla valutazione dei verri mediante il *sib test*, effettuata per ciascun verro candidato, che rimane nell'allevamento di origine, su un gruppo di tre fratelli di covata (due femmine e un maschio castrato),

trasportati e allevati nei centri di controllo genetico fino ad almeno 155 kg di peso vivo.

I gruppi di suinetti vengono prelevati dagli allevamenti ad un'età compresa tra i 30 ed i 45 giorni e trasportati al Centro, dove dopo un periodo di ambientamento di circa sette settimane sono avviati alla prova. Il razionamento è uguale per tutti i soggetti e viene prestabilito in base alla loro età. Al superamento dei 155 kg di peso vivo i suini vengono macellati. Durante la prova ciascun suino viene pesato ogni due settimane mentre il consumo individuale di alimenti viene misurato ogni giorno. Al macello vengono rilevati il peso della carcassa, delle lombate, delle coppe, delle cosce e delle spalle e lo spessore del lardo a livello del muscolo gluteo medio e, nei soggetti di razza Duroc, il grasso intramuscolare visibile. Le cosce vengono inoltre seguite al prosciuttificio dove viene rilevato il calo di prima salatura.

Inoltre viene effettuato l'accertamento dell'ascendenza e del genotipo per la sensibilità all'alotano.

Per ogni verro vengono elaborati gli indici genetici per caratteri rilevati e un indice di selezione aggregato. Le metodologie statistiche usate sono del tipo BLUP-Multiple Trait – Animal Model. L'Indice di selezione è definito in modo da garantire il massimo progresso genetico possibile nella quantità di tagli magri (coppe e lombate) e nella velocità di accrescimento, senza ridurre in alcun modo lo spessore del grasso e la qualità della carne per la stagionatura così come definita dall'Indice genetico parziale per il calo di peso della coscia durante la prima salagione.

I verri con migliori indici vengono prelevati dagli allevamenti dove erano rimasti durante la prova sui fratelli pieni e sottoposti a esami sanitari e morfo-funzionali. Superati questi esami, i verri vengono trasferiti presso un centro di produzione seme convenzionato con l'ANAS, dove per qualche mese producono seme solo per gli allevamenti iscritti al Libro genealogico. Successivamente essi vengono venduti all'asta ai centri di produzione seme commerciali.

Lo schema garantisce in questo modo la diffusione dei risultati della selezione a tutti gli allevamenti iscritti al Libro genealogico e il loro rapido trasferimento a livello della produzione commerciale.

Lo schema di selezione comprende, per le razze Large White italiana e Landrace italiana, anche il miglioramento dei caratteri riproduttivi sia attraverso l'istituzione di "soglie" morfologiche (tutti i soggetti iscritti devono avere almeno 14 mammelle funzionali) sia attraverso il calcolo di Indici genetici BLUP – Animal Model per il numero di nati vivi.

In Italia viene attuato anche uno schema di selezione per il suino da consumo fresco. Lo schema attualmente interessa soltanto la razza Pietrain. Gli

obiettivi di selezione sono l'aumento dei tagli magri, il miglioramento della velocità di crescita e l'eliminazione del gene per la sensibilità all'Alotano.

La tipicità della selezione italiana

La selezione italiana persegue gli obiettivi comuni ai programmi di selezione di tutti gli altri paesi europei ed extraeuropei con, tuttavia, alcuni limiti imposti dalla grande attenzione che rivolge alla qualità della carne (tab. 1), vale a dire a quel complesso di caratteristiche che la rendono idonea a soddisfare le esigenze di tutti coloro che la utilizzano (macellatori, trasformatori, distributori e consumatori). In particolare vengono prese in considerazione alcune caratteristiche che rendono la carne idonea alla produzione di salumi interi, quali ad esempio i prosciutti di Parma e San Daniele, per i quali la tecnologia di trasformazione non è in grado di correggere carenze e difetti originari. In altri termini sono utilizzati criteri di selezione correlati con l'attitudine alla salagione e alla stagionatura, intesa come capacità intrinseca delle cosce a determinare alte rese di trasformazione o bassi cali di stagionatura e a conferire ottime caratteristiche organolettiche ai prodotti stagionati. Tali criteri sono elencati nella tabella 1.

Un primo obiettivo di selezione è l'eliminazione dell'allele recessivo del locus Alotano responsabile del difetto PSE (*Pale, Soft, Exudative*) della carne, oltre che della sindrome da stress del suino (*Porcine Stress Syndrome, PSS*). La carne che presenta questo difetto è caratterizzata da masse muscolari di colore bianchiccio, flaccide, che lasciano trasudare dalla superficie di taglio notevoli quantità di liquido sieroso. Le conseguenze economiche sono molto rilevanti perché il difetto altera le più importanti caratteristiche qualitative della carne, quali il colore, la consistenza e il potere di ritenzione idrica ed interessa le masse muscolari che costituiscono i tagli più pregiati, come la lombata ed il prosciutto. Le caratteristiche anormali conferite dalla PSE rendono la

OBIETTIVI	CRITERI
Eliminare PSE	- Test Alotano (fino al 1995) - Mutazione C>T gene CRC
Evitare aumento calo di stagionatura e migliorare le caratteristiche organolettiche	- Calo di prima salatura - Spessore del lardo dorsale
Ridurre difetto grassinatura (solo nella razza Duroc)	- GIV

Tab. 1 *Obiettivi e criteri di selezione per la qualità della carne nelle razze italiane usate per la produzione del suino pesante*

carne meno attraente per il consumatore e meno idonea alla trasformazione in salumi tipici di alto pregio, quali sono i prosciutti crudi di Parma e di S. Daniele. Infatti lo scarso potere di ritenzione idrica di queste carni provoca un aumento dei cali di stagionatura e della frequenza dei difetti di trasformazione (Russo e Nanni Costa, 1995). Inoltre la mortalità per PSS, soprattutto durante il trasporto, provoca notevoli perdite dal punto di vista economico. Il test fenotipico dell'Alotano, che consiste nel far inalare questo anestetico ai suini, utilizzato in Italia fino al 1995, si era rivelato utile per ridurre la frequenza dell'allele recessivo perché consentiva di distinguere ed eliminare dalla riproduzione i soggetti omozigoti recessivi nn, ma non ne permetteva l'eliminazione, perché non riusciva a distinguere gli omozigoti normali NN dagli eterozigoti portatori Nn (Russo et al., 1996). Ciò è stato reso possibile con l'utilizzo della genetica molecolare che ha individuato in una mutazione nel gene *Calcium Release Channel (CRC)*, detto anche *Ryanodine Receptor 1 (RYR1)*, localizzato sul cromosoma 6, la causa del difetto (Fujii et al., 1991). L'individuazione di questa mutazione, caratterizzata dalla sostituzione di un solo aminoacido (arginina con cisteina) della catena polipeptidica, dovuta alla sostituzione di una citosina con una timina al nucleotide 1843, ha aperto la strada allo sviluppo di un test rapido e sicuro basato sulla tecnica della PCR seguita da un'analisi con enzimi di restrizione (PCR-RFLP). Partendo dai risultati di queste ricerche, anche in Italia è stato messo a punto un protocollo di analisi che utilizza la tecnica PCR per identificare il genotipo per la sensibilità all'Alotano dei suini direttamente a livello di DNA (Russo et al., 1993).

Il metodo consente una precisa identificazione del genotipo Alotano. Inoltre permette di superare il problema dei falsi negativi e dei falsi positivi all'alotano, dovuti a penetranza incompleta del gene. L'eliminazione di questi errori diagnostici, pari al 4-6% per i falsi negativi ed a meno dell'1% per i falsi positivi, e l'individuazione degli eterozigoti portatori del gene per la sensibilità all'Alotano costituiscono un notevole vantaggio per la selezione volta ad eliminare la sindrome da stress ed il difetto *PSE* della carne nelle popolazioni suine. L'analisi può essere effettuata a partire dal sangue, da piccolissime quantità di muscolo o grasso freschi e stagionati o da una singola setola (Russo et al., 1994). Dal 1995 il nuovo metodo viene utilizzato dall'ANAS.

Un altro obiettivo è la riduzione del calo di stagionatura dei prosciutti. Per raggiungere questo obiettivo la selezione italiana utilizza come criterio di selezione il calo di prima salatura, che misura la perdite di peso del prosciutto nei primi sette giorni di salatura. Si tratta di un parametro originale, messo a punto dalla ricerca italiana, che presenta una forte correlazione fenotipica (Russo et al., 1991) e genetica (Buttazzoni et al., 1993) positiva con il calo

di stagionatura e per il quale sono stati trovati coefficienti di ereditabilità dell'ordine di 0,30-0,61 (Buttazzoni et al., 1993; Carnier et al., 1999; Ufficio Tecnico ANAS, 2003).

Sfortunatamente il calo di prima salatura ha una correlazione elevata e positiva con il peso dei tagli magri ($r_g = 0,78$) e, di conseguenza, la selezione per la sua riduzione implica come risposta correlata una riduzione di questi ultimi. Per evitare un eccessivo rallentamento nel miglioramento della quantità di tagli magri la selezione si pone come obiettivo quello di mantenere costante il calo di prima salatura.

Contrariamente a tutti gli altri Paesi del mondo, che si pongono l'obiettivo di ridurre lo spessore del lardo dorsale, in Italia la selezione per il suino pesante mira a mantenere costante questo parametro perché un'insufficiente copertura adiposa delle cosce determina un aumento del calo di stagionatura ed un peggioramento delle caratteristiche organolettiche del prosciutto.

Anche questo obiettivo, come quello riguardante il calo di prima salatura, riduce il progresso genetico che si potrebbe ottenere per l'aumento dei tagli magri perché esiste una correlazione elevata e negativa tra questi e lo spessore del lardo dorsale.

Un ultimo originale criterio di selezione messo a punto dall'ANAS è rappresentato dal GIV (grasso visibile), che viene utilizzato per ridurre nella razza Duroc i cosiddetti difetti di "grassinatura" e di "noce" dovuti ad una elevata infiltrazione di grasso intra ed intermuscolare delle cosce (Ufficio Tecnico ANAS, 2003).

Razze autoctone e Registro Anagrafico

Agli inizi del secolo scorso erano state censite in Italia ben 21 razze o genotipi locali. Questo numero documenta l'elevata ricchezza genetica suina nell'Italia di allora, anche se queste popolazioni, che assumevano di regola il nome della regione di origine e allevamento, avevano un alto grado di rassomiglianza reciproca e quindi potevano essere considerate varietà di un più piccolo numero di razze differenti. Le trasformazioni socio-economiche del dopo guerra, le modifiche nell'utilizzo del territorio, l'intensificazione e l'industrializzazione dell'allevamento suino e l'utilizzazione massiccia delle razze estere più produttive e più rispondenti alle mutate esigenze del consumo hanno determinato in pochi decenni il declino dell'importanza delle razze italiane locali. Alcuni tentativi di miglioramento e di valorizzazione delle razze locali furono attuati a livello locale con scarsi risultati. Un caso particolare è rappresentato dalla Cinta senese

RAZZA	VERRI	SCROFE	ALLIEVI	ALLEVAMENTI
Calabrese	14	50	227	7
Cinta senese	157	811	1373	163
Casertana	8	14	61	3
Mora romagnola.	48	117	594	35
Nero siciliano	22	108	719	21

Tab. 2 *Consistenza dei tipi genetici autoctoni: dati del Registro Anagrafico ANAS del 2005*

per la quale dal 1934 fu messo in opera un piano di miglioramento della razza concomitante all'istituzione di un suo primo Libro Genealogico gestito dall'Ispettorato dell'Agricoltura di Siena e cessato negli anni '60.

Nell'ambito delle attività di tipo genetico volte al recupero e alla conservazione dei tipi locali autoctoni sopravvissuti bisogna ricordare l'apertura nel 1996 da parte dell'ANAS della sezione Cinta senese all'interno del Libro Genealogico della specie suina, seguita dall'attribuzione all'ANAS della tenuta del Registro Anagrafico della specie suina con Legge 3 agosto 1999, n. 280, e dal trasferimento della Cinta senese dal Libro al Registro. Attualmente l'attività del Registro Anagrafico riguarda le razze Cinta senese, Mora romagnola, Nero siciliano, Casertana, Calabrese e, da ultimo, anche la razza Sarda.

Per queste razze per le quali non è realizzabile un programma di selezione per la loro limitata consistenza (tab. 2), l'obiettivo prioritario è il recupero e la conservazione attraverso il mantenimento della loro variabilità genetica, il contenimento della consanguineità e la valorizzazione delle loro carni ottenute in condizioni di allevamento brado o semibrado.

Risultati della selezione

L'efficienza e la coerenza con gli obiettivi del complesso programma di selezione possono essere valutate dai risultati conseguiti.

Per quanto riguarda la prolificità i dati riportati nella tabella 3 mostrano un andamento positivo dell'indice genetico medio (differenza nel numero di nati vivi al primo parto).

Per quanto riguarda il gene Alotano si può affermare che grazie all'introduzione del test PCR-RFLP l'obiettivo dell'eliminazione dell'allele responsabile della predisposizione alla PSE nelle tre razze utilizzate per la produzione del suino pesante è stato pressoché raggiunto. Infatti in base ai test effettuati nel 2004 questo allele non è stato più trovato nella razza Duroc e presenta una frequenza inferiore allo 0,01% nelle razze Large White e Landrace.

ANNO I PARTO	LANDRACE ITALIANA		LARGE WHITE ITALIANA	
	NUMERO DI PARTI DI PRIMIPARE	MEDIA INDICI	NUMERO DI PARTI DI PRIMIPARE	MEDIA INDICI
1995	684	0,101	6513	0,017
1996	838	0,056	6107	0,030
1997	744	0,149	6794	0,043
1998	967	0,155	8551	0,038
1999	833	0,113	8694	0,055
2000	1219	0,146	7429	0,076
2001	1367	0,312	8039	0,088
2002	1268	0,235	8515	0,106
2003	1135	0,206	7592	0,119
2004	888	0,346	6341	0,153

Tab. 3 *Dati sull'indice genetico prolificità* (Fonte: Ufficio Tecnico ANAS)

I dati esposti nella tabella 4 evidenziano in generale una buona risposta alla selezione nelle razze allevate per la produzione del suino pesante.

Nell'insieme questi dati se da una parte confermano l'efficienza del piano di selezione nazionale, dall'altra mettono in evidenza le difficoltà di dover selezionare contemporaneamente per caratteri antagonisti. Infatti sia il calo di prima salatura che lo spessore del lardo dorsale sono correlati sfavorevolmente con la percentuale di tagli magri; di conseguenza l'aumento di questi ultimi, fortemente richiesto dall'industria di macellazione, condiziona il pieno raggiungimento dell'obiettivo di tener costante lo spessore del lardo dorsale e di non aumentare il calo di prima salatura.

INDICI	LARGE WHITE ITALIANA	LANDRACE ITALIANA	DUROC
Incremento ponderale giornaliero (g)	4	5	4
Indice di conversione	-0,017	-0,022	-0,021
Tagli magri (kg)	0,237	0,25	0,261
Cosce (kg)	0,066	0,047	0,089
Spessore lardo (mm)	-0,3	-0,3	-0,4
Calo di prima salatura (g)	1	2	2
Grasso intramuscolare visibile (GIV)	-	-	-0,066
Indice di selezione	0,11	0,06	0,11

Tab. 4 *Risposta media annua alla selezione nelle razze allevate per la produzione del suino pesante* (Fonte: Ufficio Tecnico ANAS)

INDICI	ITALIANI (340*)	ESTERI (13**)
Calo	+ 10,0	+ 29,0
Spessore Lardo	- 2,0	- 4,8
Tagli Magri	+ 2,194	+ 3,166
IMG	+ 33,00	+59,00
ICA	- 0,155	- 0,263
* n. gruppi con entrambi i genitori nel Libro Genealogico italiano		
** n. gruppi con almeno un genitore nel Libro Genealogico estero		

Tab. 5 *Confronto degli indici genetici dei verri candidati di razza Large White con genitori italiani o esteri* (Fonte: Ufficio Tecnico ANAS)

Tuttavia il risultato ottenuto dalla selezione italiana nel miglioramento di queste due caratteristiche determinanti per la qualità della carne destinata alla produzione di prosciutti DOP si può apprezzare osservando i dati (tab. 5) riguardanti gli indici genetici dei verri della razza Large White, nati da genitori italiani o da almeno un genitore proveniente da un libro genealogico estero. Gli indici calo di prima salatura dei verri di provenienza esclusivamente dalla selezione italiana, seppure positivi, sono circa 3 volte inferiori a quelli dei soggetti con almeno un genitore proveniente dalla selezione di altri Paesi. Analogamente per lo spessore del lardo si osserva una minore riduzione di circa 2,4 volte più favorevole nei verri della selezione totalmente italiana.

Al contrario proprio per il sopradetto antagonismo i verri con almeno un genitore di origine estera risultano superiori per la quantità dei tagli magri, per l'incremento ponderale giornaliero e per l'indice di conversione.

Questi dati mettono in evidenza le difficoltà della selezione per caratteri antagonisti, che i metodi attuali non sono in grado di risolvere completamente.

Una prospettiva di risoluzione potrebbe venire, come verrà detto più avanti, dalla migliore conoscenza del genoma suino, in particolare dall'individuazione, dal mappaggio e dalla conoscenza della fase associativa dei geni responsabili dei caratteri antagonisti.

ACQUISIZIONI DELLA GENETICA MOLECOLARE NEL SUINO

Il genoma suino

La genomica applicata al suino trova le sue basi a partire dall'inizio del 1900 con i primi studi effettuati per identificare il numero dei cromosomi del cariotipo della specie (Wødsedalek, 1913). Solo successivamente con l'introdu-

zione delle moderne tecniche citogenetiche è stato possibile stabilire il corretto numero di cromosomi per *Sus scrofa domestica* ($2n = 38$) (Gimenez-Martin et al., 1962). Nel 1988 venne proposta una nomenclatura standardizzata, basata sul bandeggio G e R del cariotipo suino (Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig, 1988), la quale costituisce lo standard attualmente seguito.

Decine di aberrazioni cromosomiche, aberrazioni numeriche e strutturali (traslocazioni e duplicazioni/delezioni), sono state segnalate in letteratura, la maggior parte delle quali con effetti deleteri, in particolare sulle caratteristiche riproduttive di verri e scrofe (Chowdhary, 1998; Gustavsson, 1990).

Oltre alle conoscenze relative alle possibili mutazioni cromosomiche, dal punto di vista applicativo ai fini del miglioramento genetico, il passo fondamentale, seppure ancora di base, è stato quello di costruire mappe geniche contenenti marcatori del DNA e di agganciare questi marcatori a ciascuno dei 18 autosomi e ai cromosomi sessuali.

I principali marcatori cromosomici sono rappresentati da polimorfismi che possono essere analizzati a livello proteico o direttamente a livello di DNA. Con l'introduzione delle tecniche di genetica molecolare è stato possibile identificare e analizzare un numero sempre più elevato di marcatori del DNA che a seconda del tipo di mutazioni o del metodo di analisi sono denominati RFLP, microsatelliti (SSR), minisatelliti, AFLP, RAPD e SNP.

Il numero di marcatori individuati sulla mappa genica del suino è via via sempre più cresciuto grazie anche al pieno utilizzo della genetica molecolare. Nel 1985 il numero di geni mappati nel genoma suino era di 35 (Lalley e McKusick, 1985), nel 1989 era di 40 (Lalley et al., 1989) e nel 1992 era di 84 (Echard et al., 1992). Nel 1993 il numero di marcatori assegnati a cromosomi mediante analisi di linkage o mappaggio fisico e a gruppi di linkage non identificati su singoli cromosomi era di 172 (Andersson et al., 1993). Successivamente, grazie allo sforzo di diversi gruppi di ricerca europei e americani e grazie al lavoro del consorzio PiGMap (che ha riunito un gran numero di laboratori di diversi paesi, fra i quali anche l'Italia, rappresentata dall'Università di Bologna) sono state pubblicate diverse mappe genetiche (di prima e seconda generazione) con una densità sempre più elevata di marcatori (es. Ellegren et al., 1994; Rohrer et al., 1994; Archibald et al., 1995; Rohrer et al., 1996). L'utilizzo delle tecniche di ibridazione *in situ* di sonde sul cariotipo suino (Chowdhary, 1998) e la costruzione di pannelli di ibridi di cellule somatiche suino/roditore (es. Yerle et al., 1996; Zijlstra et al., 1996) hanno permesso di agganciare ed orientare le mappe genetiche ai singoli cromosomi e di costruire la mappa citogenetica (Yerle et al., 1995). Nel complesso, attualmente, il

numero di marcatori mappati geneticamente e/o fisicamente nel suino sono più di 7000, localizzati su tutti gli autosomi e sui cromosomi sessuali.

La maggior parte dei marcatori utilizzati per la costruzione delle mappe genetiche o di linkage è rappresentata da marcatori microsatelliti che, per il loro elevato numero di alleli, risultano particolarmente efficaci. In genere, però, i microsatelliti identificano regioni genomiche anonime e per questo sono denominati marcatori di tipo II. Il numero di marcatori di tipo I, che marcano regioni geniche, integrati nelle mappe genetiche disponibili, anche se inferiore rispetto a quello dei marcatori di tipo II sta aumentando grazie all'identificazione di un elevato numero di SNP in geni espressi (Fahrenkrug et al., 2002; Jungerius et al., 2003). Le informazioni riguardanti le mappe genetiche e citogenetiche del suino, come quelle per le principali specie di interesse zootecnico, sono disponibili in diverse banche dati accessibili via internet.

Lo sviluppo di strumenti di mappaggio innovativi ad alta risoluzione, quali i *radiation hybrid panel* (*RH-panel*) che accoppiano le potenzialità dei pannelli di ibridi di cellule somatiche con la maggiore risoluzione dovuta alla frammentazione del DNA causata da diverse dosi di radiazione, rappresentano l'evoluzione successiva delle mappe genetiche e permettono un'alta risoluzione di mappaggio senza la necessità di identificare polimorfismi come nel caso delle mappe genetiche. Per quanto riguarda il suino, la comunità scientifica ha sviluppato inizialmente due *RH-panel*, il 7000 rad INRA/University of Minnesota radiation hybrid panel (IMpRH; Yerle et al., 1998) e il Pig T43 whole genome panel (Archibald & Goodfellow, non pubblicato, disponibile presso Research Genetics). Grazie a questi due *RH-panel* sono già state costruite le prime *radiation hybrid map* (*RH map*) per la specie suina (Hawken et al., 1999; Rattink et al., 2001; Rink et al., 2002). Un terzo pannello (SSRH, 5000 rad), sviluppato in Giappone ha permesso di ottenere una prima mappa RH a media risoluzione (Hamashima et al., 2003). Un quarto pannello, il IMNpRH2 (Yerle et al., 2002), sviluppato grazie ad una collaborazione tra l'INRA, l'Università del Minnesota e l'Università del Nevada, è stato costruito utilizzando una dose di radiazioni maggiore (12000 rad) in modo da frammentare di più il genoma suino e quindi permettere una maggiore risoluzione di mappaggio. Questo pannello è stato infatti applicato per risolvere in modo più preciso alcune regioni del genoma suino e permettere una comparazione più fine con il genoma umano (Martins-Wess et al., 2003; Liu et al., 2005). Per poter passare direttamente dalle mappe genetiche o dalle *RH map* alla dimensione fisica effettiva del DNA, per consentire il sequenziamento di regioni delimitate da due marcatori e per costruire contig, anche

nella specie suina sono stati sviluppati altri strumenti quali le librerie di larghi inserti (librerie YAC, BAC, PAC o P1), alcune delle quali sono disponibili anche commercialmente. Per la specie suina sono state costruite inizialmente diverse librerie YAC (Leeb et al., 1995; Alexander et al., 1997; Rogel-Gaillard et al., 1997) e successivamente gli sforzi sono stati rivolti verso la costruzione di librerie BAC (Rogel-Gaillard et al., 1999; Anderson et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Fahrenkrug et al., 2001) che presentano minori problemi di chimerismo e riarrangiamento rispetto alle librerie YAC e una maggiore facilità di isolamento del DNA clonato.

Grazie all'identificazione e al mappaggio di geni a funzione nota è emerso che per gruppi di geni vi è una conservazione di sintenia nei cromosomi tra diverse specie da cui nasce il concetto di mappaggio comparativo che ha come obiettivo il trasferimento e il confronto delle informazioni relative alla posizione di geni tra le varie specie, con particolare riferimento al confronto tra uomo/topo e gli animali di interesse zootecnico (Gellin et al., 2000). Un metodo alternativo di mappaggio comparativo, detto Zoo-FISH o *chromosome painting* (Chowdhary et al., 1998), che prevede l'ibridazione di cromosomi di una specie al cariotipo di un'altra specie, ha permesso, anche in assenza di informazioni sul mappaggio di geni, di stabilire regioni cromosomiche in cui vi è conservazione di sintenia. I cromosomi umani sono stati in genere utilizzati come riferimento per ottenere informazioni sulla conservazione di sintenia nelle specie di interesse zootecnico. Questo metodo è stato utilizzato anche per il suino (Rettenberger et al., 1995; Goureau et al., 1996; Fronicke et al., 1996) ottenendo informazioni che sono state utilizzate come riferimento nel mappaggio comparativo di geni omeologhi.

Anche per il suino, come è già stato per l'uomo, il topo e altre specie, è in corso la costruzione della mappa genetica definitiva che corrisponderebbe alla sequenza completa del genoma e all'identificazione di tutti i geni, lavoro quest'ultimo ancora comunque da completare nelle specie per le quali da alcuni anni è disponibile la sequenza completa del genoma.

Come primo passaggio al sequenziamento del genoma del suino, sull'esempio di quanto è stato fatto per l'uomo, sono state e si stanno caratterizzando le regioni trascritte grazie al sequenziamento di *expressed sequence tags* (EST). Le EST sono brevi sequenze di cDNA e rappresentano l'attività trascrizionale dei diversi tessuti e quindi i geni, spesso a funzione non nota, che pur costituendo una minima percentuale del DNA di un genoma rappresentano la parte più importante. Nel suino sono state costruite alcune librerie a cDNA tessuto specifiche tra le quali si possono ricordare alcune da intestino (Wintero et al., 1996; Dvorak et al., 2005), da vari tessuti riprodut-

tivi femminili (Tosser-Klopp et al., 1997; Fahrenkrug et al., 2002; Caetano et al., 2003), da cervello (Nobis et al., 2003), da tessuti collegati alla risposta immunitaria (Rink et al., 2002) o specifici dello stadio embrionale (Smith et al., 2001; Fahrenkrug et al., 2002) dalle quali sono state isolate una buona parte delle EST disponibili in banca dati per questa specie. In particolare, per quanto riguarda i tessuti direttamente correlabili con la qualità della carne, l'Università di Bologna ha costruito una libreria a cDNA da tessuto muscolare scheletrico di suino adulto dalla quale ha isolato più di 1000 EST (Davoli et al., 1999; Davoli et al., 2002). Successivamente anche altri gruppi di ricerca hanno contribuito ad aumentare il numero di EST depositate in banca dati derivanti dal tessuto muscolare o da un altro tessuto importante per la qualità della carne, il tessuto adiposo (Yao et al., 2002; Mikawa et al., 2004; Pan et al., 2005). Attualmente (dati aggiornati al 21 Gennaio 2006) sono presenti in banca dati le sequenze di 536925 EST su un totale di 1147434 entry di suino depositate in GenBank.

Iniziative specifiche per il completamento sistematico del sequenziamento del genoma suino sono attualmente in corso grazie alla costituzione di consorzi internazionali. Tra questi, la cooperazione sino-danese è quella che ha contribuito maggiormente in termini di *trace records* depositati in banca dati. La copertura ottenuta di 0.66X del genoma suino è derivata da circa 3,84 milioni di sequenze ottenute utilizzando la strategia di sequenziamento denominata di *shot-gun* (Wernersson et al., 2005) per un totale di 2 miliardi di basi sequenziate. Da questa enorme mole di sequenze sono iniziate alcune valutazioni relative alla struttura del genoma suino che si conferma più simile a quella dell'uomo rispetto a quella di topo. Un'altra strategia per arrivare al completamento del sequenziamento del genoma suino è utilizzata da altri gruppi coordinati dall'University of Illinois. Il loro approccio mira a generare mappe RH ad alta risoluzione ed ancorarle a cloni BAC per facilitarne la costruzione di contig e l'integrazione con la mappa di linkage (Meyers et al., 2005). Inoltre, per la costruzione della mappa fisica completa del genoma suino, è in corso un'intensa attività di fingerprinting di cloni BAC derivanti da librerie sviluppate o distribuite dal Children's Hospital Oakland Research Institute, dall'INRA e dal Roslin Institute. È prevedibile che nel giro di pochi anni il sequenziamento del genoma suino venga completato.

Diverse banche dati riportano e organizzano i dati relativi alle attività di sequenziamento, di mappaggio e di mappaggio comparativo del genoma suino. Alcune di queste (TIGR database e UniGene), utilizzando procedure di clusterizzazione delle sequenze costituite prevalentemente da EST, hanno come obiettivo la costruzione di sequenze consenso per i geni del genoma suino. At-

tualmente nel TIGR database sono presenti 38781 sequenze consenso (*Tentative Consensus*) mentre nella banca dati UniGene sono elencati 24236 clusters.

Sebbene le conoscenze del genoma suino siano ancora incomplete, già a partire dalla costruzione delle prime mappe genetiche e successivamente integrando queste con le mappe fisiche e le mappe RH, è iniziato un intenso lavoro per il mappaggio e l'isolamento dei QTL per i principali caratteri produttivi.

QTL

Insieme allo sviluppo dei marcatori del DNA e alla costruzione delle mappe genetiche sono stati sviluppati anche disegni sperimentali e metodi statistici efficienti per determinare associazioni tra marcatori e QTL (Soller, 1991). In particolare nel suino le strategie utilizzate per il mappaggio e l'identificazione di QTL possono essere raggruppate nel *genome scanning* e nell'approccio del gene candidato. Il *genome scanning*, effettuato in genere con marcatori microsatelliti, distribuiti in modo da coprire tutto il genoma o solo alcuni cromosomi e tipizzati in popolazioni artificiali (back-cross e incroci a tre generazioni), è stato utilizzato in molti esperimenti. Gli animali parentali di queste popolazioni in genere appartengono a razze divergenti per molti caratteri produttivi (Large White X Meishan, Landrace X Meishan, Large White X cinghiale, cinghiale X Pietrain, Meishan X Pietrain, Large White X Pietrain, Yorkshire X Berkshire, ecc.) in modo da massimizzare la potenza statistica di identificare regioni cromosomiche contenenti QTL.

Recentemente è stata costituita una banca dati in cui sono riportati la maggior parte dei QTL identificati nel suino (Hu et al., 2005). Complessivamente in questa banca dati sono stati inclusi, fino ad ora, 1263 QTL per 236 diversi caratteri le cui informazioni derivano da 93 pubblicazioni. L'elevato numero deriva dal fatto che sono riportati studi successivi effettuati utilizzando le stesse popolazioni sperimentali o perché differenti studi condotti analizzando popolazioni diverse identificano i QTL nelle stesse regioni genomiche, confermando quindi l'importanza di alcuni di questi in linee o razze diverse. Inoltre è da tener presente che in realtà, alcune regioni QTL hanno un effetto su più caratteri correlati tra di loro.

Tutti i cromosomi del suino contengono QTL (fig. 1). In particolare i cromosomi 4, 7, 1, 6 e 2 sono quelli per i quali sono stati effettuati più studi e per i quali, di conseguenza, sono stati riportati il numero più elevato di QTL (rispettivamente, 189, 156, 152, 146 e 115).

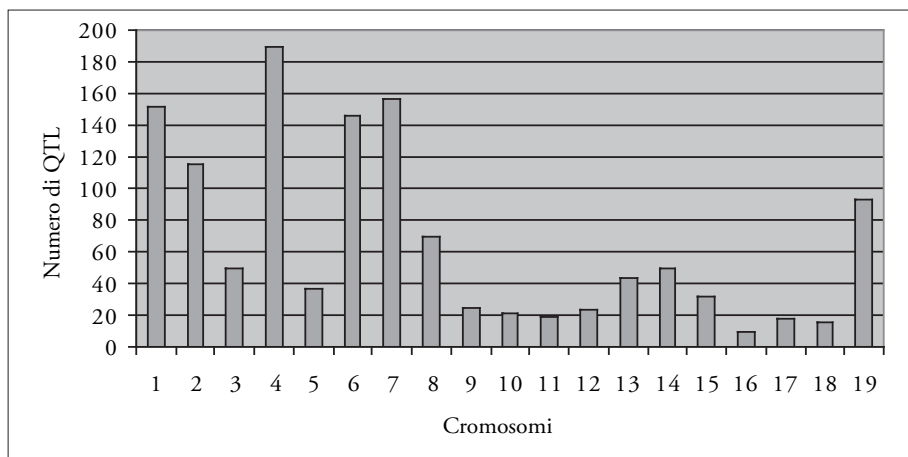


Fig. 1 *Distribuzione dei QTL per cromosoma*

Il maggior numero di QTL segnalati in questi cromosomi riflette principalmente il fatto che alcune importanti regioni o geni, con notevoli effetti sulle produzioni, sono localizzati in questi cromosomi e che quindi, questi sono stati oggetto di intensi studi. In particolare, sul cromosoma 4, il primo studio effettuato nel suino (Andersson et al., 1994) ha permesso di identificare il primo importante QTL che influenza prevalentemente lo spessore del grasso dorsale. La presenza di questo QTL, denominato *FAT1*, è stata confermata in successivi studi effettuati sulle stesse popolazioni sperimentali (Knott et al., 1998; Marklund et al., 1999). Altri studi tendono ad avvalorare l'ipotesi che più QTL con effetto sullo spessore del grasso dorsale e sull'accrescimento sono localizzati abbastanza vicini su questo cromosoma (Cepica et al., 2003; Mercadé et al., 2005). Un altro importante QTL con effetto sullo spessore del grasso dorsale, identificato tramite diversi incroci sperimentali tra Meishan e altre razze commerciali, è stato localizzato sul cromosoma 7, in un'ampia regione che include anche il complesso maggiore di istocompatibilità o SLA (Bidanel et al., 2001). Questo QTL potrebbe essere di particolare interesse per la selezione nelle razze commerciali in quanto l'allele associato ad un maggiore spessore del lardo è quello che segrega nelle razze europee, a differenza di quanto ci si potrebbe aspettare dalle caratteristiche di maggiore adiposità della razza cinese Meishan (Bidanel et al., 2001). Sul cromosoma 1 sono stati studiati QTL per molti caratteri ed anche alcuni geni candidati per l'accrescimento (*MC4R*) e per le caratteristiche riproduttive (*ESR*) che saranno illustrati in breve successivamente. Il cromosoma 6 di suino è stato uno dei primi ad essere intensamente studiato perché su questo, già utilizzando

CROMOSOMA	CARATTERE	VARIANZA SPIEGATA DAL QTL	BIBLIOGRAFIA
2	Capacità di ritenzione idrica (2 QTL)	5,85; 2,94	Malek et al., 2001
2	Tenerezza	3,08	Malek et al., 2001
4	Percentuale di grasso intramuscolare	-	de Koning et al., 1999
6	Capacità di ritenzione idrica	6,14	Malek et al., 2001
6	Percentuale di grasso intramuscolare	-	Ovilo et al., 2002
7	Percentuale di grasso intramuscolare (2 QTL)	-	de Koning et al., 2000
15	pH; potenziale glicolitico	5,61; 6,21	Malek et al., 2001; Ciobanu et al., 2001
18	Drip loss	-	de Koning et al., 2001
X	Percentuale di grasso intramuscolare	-	Harlizius et al., 2000

Tab. 6 *Principali QTL per la qualità della carne suina*

marcatori proteici, è stato localizzato il locus per la sensibilità all'alotano che determina anche importanti effetti sulla qualità e sulla quantità della produzione di carne. Alcuni studi, tuttavia, tendono ad avvalorare l'ipotesi che molto vicino al locus alotano siano presenti altri geni con effetto importante sui caratteri legati alla produzione di carne e perciò a questa regione del cromosoma 6 è stata data priorità nelle attività di costruzione di mappe comparative, sequenziamento ed assemblaggio delle sequenze.

Un altro cromosoma oggetto di intensi studi per l'identificazione di QTL è il cromosoma 2 sul quale, nella regione telomerica del braccio p in cui mappa il gene *IGF2*, è stato identificato un QTL con effetti sul deposito di grasso e l'accrescimento muscolare che manifesta imprinting paterno (Jeon et al., 1999; Nezer et al., 1999). In altre regioni di questo cromosoma sono stati identificati QTL per lo spessore del lardo dorsale e la tenerezza della carne.

I 1263 QTL identificati nel suino possono essere raggruppati anche per tipo di carattere. Quelli che sono riconducibili alle caratteristiche qualitative della carne sono i più numerosi (937), seguiti da quelli relativi all'efficienza produttiva (216) e riproduttiva (63). Solo 14 sono i QTL fino ad ora identificati relativi alla resistenza alle malattie. La tabella 6 riporta i principali QTL relativi a caratteri di qualità della carne e della carcassa che rivestono un ruolo importante anche per la produzione di prodotti trasformati di alta qualità che costituiscono la specificità della produzione suinicola italiana. Per alcuni di

CROMOSOMA	CARATTERE	BIBLIOGRAFIA
1	Numero di mammelle	Cassady et al., 2001
4	Numero di suinetti nati morti	Wilkie et al., 1999
5	Numero di suinetti nati morti	Cassady et al., 2001
7	Età al primo estro	Cassady et al., 2001
8	Numerosità della nidiata	King et al., 2003
8	Età al primo estro	Cassady et al., 2001
8	Numero di uova liberate	Rathje et al., 1997
8	Numero di corpi lutei	Wilkie et al., 1999
8	Peso delle ovaie; peso e lunghezza delle corna uterine	Rohrer et al., 1999
8	Livello plasmatico dell'FSH	Rohrer et al., 2001
9	Livello plasmatico dell'FSH	Rohrer et al., 2001
9	Numero di uova liberate	Rohrer et al., 1999
10	Numero di uova liberate	Rohrer et al., 1999
10	Età al primo estro	Rohrer et al., 1999
11	Numero di mammelle	Cassady et al., 2001
12	Età al primo estro	Cassady et al., 2001
13	Numero di suinetti nati morti	Cassady et al., 2001
15	Numero di uova liberate	Rohrer et al., 1999
X	Livello plasmatico dell'FSH	Rohrer et al., 2001

Tab. 7 *Principali QTL per i caratteri riproduttivi femminili*

questi QTL sono in corso attività per ottenere un mappaggio fine per passare successivamente all'identificazione delle mutazioni che lo determinano.

Per quanto riguarda i caratteri riproduttivi i principali QTL sono riportati in tabella 7. Diversi studi hanno confermato la presenza sul cromosoma 8 di uno o più QTL per alcune caratteristiche riproduttive quali numerosità della nidiata, numero di embrioni, numero di corpi lutei, numero di uova liberate, età al primo estro, peso delle ovaie, peso e lunghezza delle corna uterine, livello plasmatico dell'FSH e numero di mammelle. Sono in corso ricerche per effettuare un mappaggio fine e identificare le mutazioni responsabili di questi QTL (Campbell et al., 2003).

QTG

Fino ad ora nel suino sono stati identificati e caratterizzati dal punto di vista molecolare solo pochi loci ad effetto maggiore tra i quali ricordiamo il gene per la sensibilità all'Alotano di cui si è già parlato, il gene responsabile del di-

fetto della carne acida o della resa Napole, il gene *IGF2* responsabile del QTL con imprinting paterno identificato sul cromosoma 2, alcuni altri geni riportati in tabella 8 con effetto su alcune caratteristiche produttive della carne e della carcassa o associati a caratteristiche riproduttive o a resistenza alle malattie. Un aspetto importante da sottolineare è che l'utilizzo delle mutazioni, ai fini della selezione, in tutti i geni con effetto importante è coperto da brevetti.

Il gene responsabile del difetto della carne acida o della resa Napole

Questo gene, chiamato anche gene RN (Rendement Napole o resa Napole) (Naveau et al., 1985) è stato identificato inizialmente in due linee francesi che includevano sangue della razza Hampshire (Naveau, 1986; Le Roy et al., 1990). I suini portatori dell'allele dominante (RN^+), rispetto ai suini normali omozigoti recessivi rn^+rn^+ , presentano un più alto contenuto di glicogeno muscolare (più del 70%) che causa un basso pH_u il quale a sua volta determina minore capacità di ritenzione idrica, maggiori perdite di cottura e colorazione pallida della carne. Tuttavia, correlazioni statisticamente significative tra potenziale glicolitico e alcune caratteristiche tecnologiche della carne sono state evidenziate anche in suini pesanti che non presentano l'allele negativo a questo locus (Nanni Costa et al., 2000). I suini portatori dell'allele RN^+ presentano una maggiore percentuale di carne magra. Per identificare il genotipo dei suini a questo locus è stata utilizzata la misura della resa Napole, la misura del potenziale glicolitico e il contenuto di glicogeno del muscolo *post mortem*. La resa Napole viene determinata come la differenza di peso tra il muscolo prima e dopo la cottura effettuata con procedure particolari. Il potenziale glicolitico esprime la quantità di composti glucidici presenti nel muscolo suscettibili di essere trasformati in acido lattico e si determina con la formula di Monin e Sellier (1985): $\text{potenziale glicolitico} = ([\text{glicogeno}] + [\text{glucosio-6-fosfato}] + [\text{glucosio}]) \times 2 + [\text{acido lattico}]$. I suini con potenziale glicolitico superiore a 180 $\mu\text{mol/g}$ di lattato equivalente venivano classificati come portatori dell'allele RN^+ . Una elevata correlazione è stata identificata tra il potenziale glicolitico e il contenuto di glicogeno del muscolo a 24 ore dalla morte e di conseguenza, anche quest'ultima misura è stata utilizzata per identificare i suini portatori dell'allele RN^+ .

Tutti questi metodi di analisi non sono precisi al 100%, richiedono analisi di laboratorio costose e devono essere effettuati sul muscolo *post mortem* (sebbene la misura del potenziale glicolitico possa essere determinata anche su materiale muscolare prelevato *in vivo* mediante biopsia). Utilizzando famiglie

CROMOSOMA	GENE	EFFETTO	BIBLIOGRAFIA
1	ESR	Numero suinetti nati	Rothschild et al., 1996
1	MC4R	Accrescimento, caratteristiche della carcassa	Kim et al., 2000
2	IGF2	Deposito grasso e muscolo	Van Laere et al., 2003
2	CAST	Tenerezza carne	Ciobanu et al., 2004
6	RYS1	Qualità carne, sensibilità allo stress	Fuji et al., 1991
6	FUT1	Resistenza malattie	Meijerink et al., 1997
15	PRKAG3	Qualità carne	Milan et al., 2000; Ciobanu et al., 2001

Tab. 8 *Elenco dei principali geni associati ad alcune caratteristiche produttive, riproduttive o di resistenza alle malattie*

di suini e questi parametri per classificare gli animali sulla base del genotipo al locus RN, è stato possibile mappare questo gene sul cromosoma 15 di suino mediante la tipizzazione di marcatori del DNA che cosegregavano con l'allele RN⁻ (Mariani et al., 1996; Milan et al., 1996; Looft et al., 1996).

Successivamente, dopo aver effettuato un mappaggio fine che ha permesso di restringere la regione contenente il locus RN a pochi cM, grazie ad un particolare procedimento di genetica molecolare chiamato *positional cloning* il gene è stato caratterizzato dal punto di vista molecolare e denominato *PRKAG3*. Una mutazione in questo gene, una adenina al posto di una guanina che cambia l'aminoacido arginina in acido glutammico in posizione 200 della proteina, è risultata essere la responsabile del difetto causato dall'allele RN⁻ (Milan et al., 2000). Anche in questo caso è stato messo a punto un metodo di analisi PCR-RFLP per identificare i suini portatori dell'allele negativo (Fontanesi et al., 2003). Questa mutazione, fino ad ora, è stata trovata solo in suini di razza Hampshire o in linee con sangue di questa razza e, per questo motivo, non dovrebbe essere di particolare interesse per la suinicoltura italiana.

Recentemente, nel gene *PRKAG3* sono state identificate altre tre mutazioni che determinano, ciascuna, un cambiamento di un aminoacido (T30N, G52S, I199V). Queste mutazioni influenzerebbero il pH_u e il colore della carne nelle razze Landrace, Large White, Duroc e Berkshire e in una linea sintetica di Duroc (Ciobanu et al., 2001). L'effetto di queste mutazioni sulle caratteristiche qualitative della carne che influenzano la qualità dei prosciutti crudi è in corso di valutazione presso il Laboratorio di Genetica Molecolare della Sezione di Allevamenti Zootecnici del DIPROVAL presso l'Università

di Bologna.

PROSPETTIVE DELLA SELEZIONE

I programmi di selezione in corso, come discusso precedentemente, hanno raggiunto notevoli risultati. Tuttavia rimangono alcuni problemi irrisolti come già in parte accennato fra i quali possiamo richiamare l'antagonismo quantità e qualità della carne e il miglioramento dei caratteri a bassa ereditabilità o di difficile o costosa rilevazione come ad esempio i caratteri riproduttivi e quelli di resistenza alle malattie. L'applicazione della genetica molecolare e l'integrazione delle informazioni che derivano dallo studio del genoma suino con i sistemi di selezione tradizionali potranno nel medio periodo portare ad alcune innovazioni nel settore con vantaggi sul piano dell'efficienza della selezione. Alcuni aspetti e possibilità dell'applicazione e dell'integrazione delle informazioni molecolari per il miglioramento genetico nel suino sono di seguito illustrate nelle linee generali.

Introgresione assistita da marcatori («Marker Assisted Introgresion»: MAI)

Il principio generale di un programma di introgresione consiste nell'introdurre nel genoma di una razza o linea, complessivamente considerata migliore, un gene o una regione cromosomica associata a un QTL, presente in un'altra razza o linea che è considerata inferiore dal punto di vista produttivo e commerciale. Lo scopo dell'introgresione è quello di fissare l'allele favorevole nella popolazione complessivamente migliore, introducendo in essa il meno possibile della restante parte del genoma della razza inferiore. Lo schema di un programma di introgresione prevede: l'incrocio tra animali della razza inferiore (donatrice) con animali di quella migliore (ricevente); gli animali F1, eterozigoti per l'allele favorevole sono reincrociati con animali della razza ricevente; dalla generazione F2 vengono selezionati gli animali eterozigoti che verranno reincrociati con animali della popolazione ricevente e questo schema si ripete fino a quando la proporzione teorica del genoma della razza donatrice può essere considerato trascurabile (fase di reincrocio). Alla fine della fase di reincrocio si effettuano accoppiamenti tra soggetti eterozigoti per ottenere individui omozigoti per l'allele favorevole in modo da poterlo fissare nella popolazione (fase di fissazione).

In questo processo i marcatori possono essere utilizzati in due modi:

- 1) per aiutare ad identificare il gene o la regione cromosomica che è oggetto dell'introgressione (selezione diretta);
- 2) per selezionare in favore o contro un particolare *background* genetico (selezione sul resto del genoma).

L'uso dei marcatori per la selezione diretta è particolarmente utile quando l'identificazione fenotipica dell'allele oggetto di introgressione presenta qualche difficoltà o è troppo onerosa, come nei casi in cui l'allele è recessivo, si esprime in un solo sesso o si manifesta tardi nella vita dell'animale. Teoricamente si assume che la frequenza dell'allele favorevole nella fase di reincrocio rimanga uguale al 50%. Questo è possibile quando l'allele favorevole può essere direttamente identificato dal marcatore. Nel caso in cui si debbano utilizzare marcatori in *linkage* con il QTL, la frequenza potrebbe scendere al di sotto del 50% a seguito della ricombinazione tra il marcatore ed il QTL durante il reincrocio. Questa possibilità si può verificare soprattutto se si utilizza un solo marcatore. Con l'utilizzo di due marcatori che fiancheggiano il QTL, solo eventi molto rari di doppia ricombinazione potrebbero far perdere l'allele favorevole in alcuni animali e ridurre l'efficienza della MAI. Il problema del mantenimento dell'allele è più difficile quando il QTL non è mappato in modo preciso. In questo caso si può avere una significativa riduzione del numero di animali portatori dell'allele favorevole a seconda del numero di marcatori utilizzati per tracciare il QTL (Haley e Visscher, 1998).

In genere un carattere produttivo non è influenzato in modo rilevante da un solo QTL e la linea inferiore può presentare alleli favorevoli in più QTL. Un programma di MAI potrebbe essere studiato per introdurre contemporaneamente nella popolazione commerciale più di un QTL (Hospital e Charcosset, 1997). Con più QTL da seguire nei reincroci, la frequenza dei soggetti portatori di tutti gli alleli desiderati sarà inferiore al 50% e, di conseguenza, per rendere possibile l'introgressione nella popolazione si dovrà aumentare il numero degli animali da tipizzare nei reincroci. Strategie alternative rispetto al classico processo di introgressione sono state studiate da Koudandé e coll. (2000) per ottimizzare l'introgressione di QTL multipli non associati.

Durante le fasi di reincrocio e fissazione degli alleli desiderati, la proporzione del genoma che deriva dalla linea donatrice o dalla linea ricevente può variare negli animali da selezionare per le successive fasi. Per esempio, la percentuale media del genoma che deriva dalla razza ricevente è dell'87,5% nella seconda generazione di reincrocio, ma l'intervallo di variazione può andare dall'81 al 94% (Hill, 1993). Per accelerare il recupero del genoma della razza ricevente è possibile selezionare gli animali che ne presentano una maggiore proporzione utilizzando marcatori genetici. Grazie all'utilizzo della selezione

sul resto del genoma è possibile evitare una o due generazioni di reincrocio aumentando l'efficienza del programma di introgressione (Hospital e Charcosset, 1997).

Per verificare l'efficienza della MAI dal punto di vista genetico il primo criterio proposto è stato quello di confrontare il valore medio delle prestazioni produttive degli animali alla fine dell'introggressione con quello iniziale della razza ricevente. Tuttavia, poiché durante le fasi di introgressione la linea ricevente è sottoposta a selezione, è più corretto effettuare il confronto utilizzando, anche per quest'ultima, le prestazioni produttive ottenute nello stesso momento temporale. Utilizzando quest'ultimo criterio è stato stimato che l'introggressione si può considerare efficiente se l'effetto economico dell'allele favorevole del QTL è equivalente o superiore a 1-2 generazioni di selezione nella popolazione ricevente (Haley e Visscher, 1998). Dal punto di vista genetico, tuttavia, il *gap* maggiore tra la popolazione commerciale e quella introgressa deriva dalla fase di fissazione necessaria per rendere gli animali omozigoti per l'allele favorevole (Visscher e Haley, 1998). Per ridurre questa differenza nelle popolazioni in cui è in atto l'introggressione si dovrebbe effettuare, durante le diverse fasi della MAI, lo stesso programma di selezione che si attua nella razza ricevente.

La selezione assistita da marcatori («Marker Assisted Selection»: MAS) e sua integrazione nei piani di selezione tradizionali

L'individuazione di associazione tra marcatori e QTL permette di frazionare un carattere quantitativo a variazione continua in un certo numero di *loci* mendeliani a variazione discontinua, chiaramente identificabili, e di attuare una selezione assistita da marcatori. Infatti, se un allele di un *locus* ad effetto quantitativo e un marcatore sono geneticamente associati, saranno trasmessi dai genitori ai figli in modo congiunto. Di conseguenza, utilizzando gli alleli dei marcatori per il carattere in selezione si potranno scegliere gli animali portatori delle varianti più favorevoli. Da ciò la selezione può trarre vantaggio, integrando gli attuali metodi matematico-statistici di valutazione genetica dei riproduttori con le informazioni sui geni maggiori o su marcatori associati a QTL. La selezione assistita da marcatori può influire favorevolmente su tutti i fattori che determinano il progresso genetico (accuratezza della selezione, intensità della selezione e intervallo di generazione) e può aumentare l'efficacia di quella attuata esclusivamente sulla base delle *performance*, soprattutto per caratteristiche che si esprimono in un solo sesso, come ad esempio la produ-

zione del latte e il numero di nati per parto, o difficilmente misurabili sugli animali vivi, come le caratteristiche della carcassa e della carne. Inoltre, essa, potendo essere indirizzata verso specifici geni, consente di superare più facilmente i problemi posti dalle correlazioni sfavorevoli tra i caratteri obiettivi della selezione. Tuttavia a questo proposito dovranno essere tenuti presenti gli eventuali effetti pleiotropici imputabili ad un medesimo locus e l'eventuale presenza di un elevato *linkage disequilibrium* tra alleli di più geni, aventi effetti opposti sui caratteri produttivi.

A seconda del tipo di informazioni disponibili è possibile utilizzare diversi approcci (Haley e Visscher, 2000):

- a) *test diretti*: utilizzano marcatori che identificano direttamente la mutazione funzionale. I test di questo tipo sono pochi perché richiedono la previa identificazione del gene e della mutazione responsabile della variazione. Tuttavia, essi caratterizzano in modo certo i singoli animali senza bisogno di altre informazioni sulla popolazione di origine e sulla famiglia, perché marcatori e QTL sono in completo *linkage disequilibrium*. Un esempio è costituito dal test per il gene *CRC* nel suino.
- b) *test di associazione con marcatori in linkage disequilibrium*: utilizzano un polimorfismo molto vicino alla mutazione funzionale e in *linkage disequilibrium* con questa. Si presuppone che il *linkage disequilibrium* sia molto forte e che ci sia una associazione generale tra marcatore e QTL nella popolazione. Questo tipo di associazione si può trovare più facilmente e più frequentemente, ma essa non è mai completa e diminuisce nel corso del tempo a causa della ricombinazione. Perciò l'efficacia del test deve essere confermata in ciascuna popolazione e nelle varie generazioni. Un esempio è costituito dal test per il gene *ESR* nel suino.
- c) *test di associazione con marcatori in equilibrio da linkage*: utilizzano marcatori delle regioni cromosomiche in cui si trova il QTL. In questo caso l'associazione esiste, ma varia entro famiglie. Perciò il test richiede la determinazione della fase di *linkage* in tutte le famiglie. Queste associazioni sono relativamente facili da trovare, ma il *linkage disequilibrium* diminuisce col tempo anche entro famiglie e per questo sono difficili da utilizzare nella MAS. Molti test per i QTL identificati mediante *genome scanning* hanno queste caratteristiche.

Queste tre diverse tipologie di marcatori differiscono non solo in relazione ai metodi utilizzati per la loro individuazione, ma anche in relazione al loro impiego in ambito selettivo. Poiché i marcatori diretti e, in misura minore, anche i marcatori in *linkage disequilibrium* sono caratterizzati da una stretta associazione tra fenotipo e genotipo, essi consentono approcci selettivi fina-

lizzati ad accrescere la frequenza di specifici alleli nella popolazione. Marcatori in *linkage equilibrium* sono caratterizzati da possibili diverse fasi di *linkage* in famiglie diverse appartenenti alla medesima popolazione animale. D'altra parte, per le diverse tipologie di marcatori, vi è una relazione diretta tra difficoltà di individuazione (alta per i marcatori diretti, intermedia per i marcatori in *linkage disequilibrium*, bassa per i marcatori in *linkage equilibrium*) e possibilità di utilizzo in ambito selettivo in programmi di MAS (alta per i primi, intermedia per i secondi e bassa per i terzi).

Quindi, la situazione ideale per la MAS è l'utilizzo dei test diretti o, in alternativa, di marcatori in *linkage disequilibrium*. Tuttavia l'ottenimento di tali marcatori può richiedere diversi anni di ricerche e grossi investimenti dal punto di vista finanziario. Per sfruttare nel miglioramento genetico le potenzialità di alcuni importanti QTL già localizzati, ma non ancora caratterizzati dal punto di vista molecolare, possono essere utilizzati gli altri tipi di test, ma prima è opportuno avere una conferma del fatto che l'effetto a loro associato sia reale. Spelman e van Arendonk (1997) hanno infatti dimostrato che l'utilizzo della MAS per un falso QTL causa una riduzione del progresso genetico rispetto ai metodi tradizionali. Per ottenere la conferma dell'associazione è opportuno ripetere l'esperimento in modo indipendente dal primo. La conferma può essere effettuata nelle famiglie o linee già utilizzate oppure attraverso il monitoraggio della popolazione oggetto di selezione. È possibile che nelle popolazioni sottoposte da tempo a selezione fenotipica per un carattere quantitativo gli alleli favorevoli per determinati QTL siano già fissati. Perciò, un'altra informazione di particolare interesse per valutare il possibile utilizzo dei QTL nella MAS è la frequenza dei diversi alleli nella popolazione.

I primi esempi di applicazione dei *test diretti* nelle specie di interesse zootecnico si sono avuti nel campo del controllo o eliminazione di alleli dannosi. Nella specie suina il gene Alotano responsabile della sindrome da stress del suino (PSS) e del difetto PSE della carne, rappresenta un esempio di tale applicazione.

La selezione basata sul *locus ESR (Estrogen Receptor)* nel suino rappresenta un esempio di utilizzo dei *test di associazione con marcatori in linkage disequilibrium*. Rothschild et al. (1996) hanno trovato che questo *locus* è associato al numero di suinetti nati vivi. Nella razza cinese iperprolifica Meishan l'effetto dell'allele favorevole (allele B) è risultato pari ad 1,4 suinetti in più al primo parto e 0,5 in più nei parti successivi. Questi risultati non hanno trovato piena conferma nella razza Large White: infatti mentre Rothschild et al. (1996) hanno trovato un effetto di 0,4-0,5 suinetti in più per l'allele favorevole, Southwood et al. (1995) hanno osservato in alcuni casi un effetto

positivo, in altri un effetto negativo. Questi risultati contraddittori nella Large White suggeriscono che probabilmente il *locus ESR* è soltanto un marcatore di un QTL che influisce sulla prolificità, di conseguenza l'effetto dell'allele B deve essere stimato di nuovo per ogni popolazione.

L'utilizzazione dei marcatori molecolari in ambito selettivo consente di incrementare l'efficienza della selezione praticata entro razza o linea. In linea generale è possibile distinguere le seguenti strategie di utilizzazione dell'informazione genomica:

- a) selezione sequenziale: selezione dei candidati basata sull'informazione dei marcatori seguita dalla selezione basata sul valore stimato dei riproduttori (EBV);
- b) selezione basata su un indice definito attribuendo pesi differenziati all'informazione dei marcatori e dell'EBV: $I = b_1 \text{Marcatori} + b_2 \text{EBV}$;
- c) preselezione in età giovanile basata sull'informazione dei marcatori o di un indice come in b) e successiva selezione basata su EBV più accurati ottenibili a età avanzate.

Si noti la costante presenza, in tutti gli approcci, di una stima (EBV) degli effetti del complesso poligenico ad azione additiva che quantifica l'effetto di tutti quei loci, non specificatamente considerati nell'informazione apportata dai marcatori considerati, che sottintendono all'espressione fenotipica del carattere quantitativo.

L'incremento atteso di progresso genetico conseguibile con la MAS dipende dall'effetto che la selezione diretta per specifici loci o regioni cromosomiche esercita sulla risposta evidenziata dalla componente poligenica del carattere e sulla risposta ottenibile da altri caratteri inclusi nell'obiettivo selettivo generale. A questo proposito è opportuno sottolineare che la selezione sequenziale, pur rappresentando l'approccio selettivo più efficace in relazione alla fissazione di specifici alleli e genotipi ai loci cui l'informazione dei marcatori fa riferimento, determina risposte, a livello di complesso poligenico del carattere o di altri caratteri inclusi nell'obiettivo selettivo generale, nettamente più modeste rispetto a strategie selettive alternative. È pertanto possibile che la selezione sequenziale, essendo, di fatto, una forma selettiva a soglie, conduca all'ottenimento di risposte selettive per il carattere e/o per l'obiettivo selettivo generale meno favorevoli rispetto a quelle garantite da approcci selettivi classici che non utilizzano informazioni su marcatori genetici. In linea generale, approcci selettivi basati su indici che combinano l'informazione dei marcatori con quella relativa alla componente poligenica risultano più efficienti. La riduzione di efficienza che interventi selettivi di tipo sequenziale evidenziano rispetto ad approcci basati sull'utilizzazione di indici è funzione

della dimensione degli effetti esercitati dai QTL cui l'informazione genomica fa riferimento. Se l'effetto aggregato dei QTL è molto grande in rapporto alla variabilità genetico-additiva del carattere oggetto di selezione, i due approcci presentano efficienze paragonabili.

Allo stato attuale delle conoscenze e per la maggior parte dei caratteri di interesse selettivo nell'ambito della specie suina, l'informazione dei marcatori genetici disponibile è relativa a un numero limitato di QTL i cui effetti risultano essere di entità moderata. Tali considerazioni giustificano pertanto la preferenza accordata a forme selettive basate su indici, in grado di integrare l'informazione dei marcatori con quella relativa al complesso poligenico, rispetto a selezioni di tipo sequenziale. Una possibile eccezione a quanto sopra discusso è rappresentata da situazioni in cui non esiste contemporaneità in relazione alla disponibilità dell'informazione sui marcatori e quella fenotipica necessaria alla stima degli effetti additivi del complesso poligenico. In questi casi, l'effetto depressivo che l'uso dell'informazione sui marcatori esercita sulla risposta selettiva evidenziata dagli altri loci del complesso poligenico del carattere e dagli altri caratteri facenti parte dell'obiettivo selettivo generale, è ridotto ai minimi termini. Un esempio concreto per la specie suina, in seguito all'ampia diffusione delle procedure di valutazione genetica basate sul *sib testing*, è rappresentato dalla preselezione, effettuata nell'ambito di famiglie di fratelli pieni, dei candidati da inserire nei programmi di test. L'informazione genomica è in questo caso l'unico criterio disponibile per differenziare gli aspetti genetici individuali nell'ambito di famiglie di fratelli pieni. La valutazione genetica, operata mediante *sib test*, dei soggetti preselezionati fornisce successivamente il criterio sulla cui base operare la selezione tra famiglie.

L'informazione dei marcatori genetici è in grado di fornire benefici all'attività di miglioramento genetico anche quando i marcatori non evidenziano associazioni significative con QTL a effetto sufficientemente ampio sui caratteri quantitativi di interesse (Villanueva et al., 2005). In tali casi, l'informazione sui marcatori genetici può essere utilizzata per incrementare l'accuratezza nella stima dei rapporti di parentela additiva utilizzati nell'ambito delle procedure BLUP Animal Model. La matrice dei rapporti di parentela additiva, utilizzata in tali procedure, viene comunemente determinata utilizzando esclusivamente le informazioni genealogiche disponibili e contiene le proporzioni attese di alleli identici per origine in comune tra individui diversi. L'utilizzazione dell'informazione genomica consente la stima delle proporzioni esatte in modo più preciso. In uno studio di simulazione, Villanueva et al. (2005) evidenziano che l'entità dei benefici, conseguenti all'utilizzazione dei marcatori genetici per la stima della matrice dei rapporti di parentela additiva, dipende dalla dimensione

del genoma (maggiore per genomi di dimensione contenuta) e dal numero di marcatori considerati (maggiore per numeri elevati di marcatori). L'utilizzazione di marcatori distribuiti secondo intervalli di mappa pari a 10 cM lungo il genoma garantisce il raggiungimento dei massimi benefici in termini di risposta alla selezione. L'impiego di routine dell'informazione genomica per la stima dei rapporti di parentela additiva nelle procedure BLUP è tuttavia condizionato a una riduzione dei costi delle tecnologie di analisi dei marcatori.

CONCLUSIONI

La selezione in Italia, in particolare per quanto riguarda il suino pesante, ha raggiunto notevoli livelli mantenendo una sua tipica specificità legata alle esigenze della filiera orientata alla produzione di prosciutti DOP e in generale di prodotti di salumeria di alta qualità. Alcuni problemi, quali l'antagonismo tra quantità e qualità della carne, elemento chiave per l'economicità dell'allevamento da una parte e la possibilità di utilizzo della materia prima da destinare a prodotti di alta qualità dall'altra, potranno nel futuro essere risolti, almeno in parte, con l'applicazione delle informazioni che derivano dallo studio del genoma suino. Oltre a queste sfide, nel prossimo futuro, sulla base delle esigenze dell'industria suinicola, dovranno essere considerati possibili nuovi obiettivi della selezione. L'attenzione dovrà essere sicuramente rivolta agli aspetti qualitativi della carne e della carcassa identificando eventuali ulteriori parametri da considerare. Fra questi, l'attività catepsinica del tessuto muscolare delle cosce destinate alla stagionatura, il cui studio è in corso da diversi anni, il potenziale glicolitico del tessuto muscolare, o altri parametri qualitativi della carne ed eventualmente del tessuto adiposo, potranno essere parametri utilizzabili per il miglioramento delle caratteristiche qualitative della carne. Oltre a questi, particolare rilievo rivestono i caratteri legati alla resistenza alle malattie che presentano elevata difficoltà di rilevamento. Per questi caratteri, oltre che per quelli legati alle caratteristiche qualitative della carne, l'utilizzo della MAS potrebbe risultare particolarmente vantaggioso in quanto permetterebbe di superare le difficoltà insite nella rilevazione e nell'analisi del fenotipo.

Infine, è sicuramente da evidenziare che le innovazioni che derivano dal fronte della genomica avranno un impatto sempre più importante nella selezione suinicola. A questo scopo, la ricerca dovrà saper salvaguardare, valorizzare e difendere le specificità della selezione italiana nell'ambito delle innovazioni che saranno introdotte con l'applicazione delle nuove conoscenze.

RIASSUNTO

La selezione in Italia, in particolare per quanto riguarda il suino pesante, ha raggiunto notevoli livelli mantenendo una sua tipica specificità legata alle esigenze dell'industria suinicola nazionale orientata alla produzione di prosciutti DOP e, in generale, di prodotti di salumeria di alta qualità. La relazione, partendo dai primi passi della selezione italiana, illustra gli attuali schemi della selezione portata avanti a livello pubblico, illustra i suoi obiettivi e i suoi criteri indicando i diversi caratteri oggetto di selezione. Inoltre, viene fatto il punto sulle conoscenze del genoma suino, che negli ultimi anni, grazie allo sviluppo della genetica molecolare, stanno aprendo nuove prospettive al miglioramento genetico. Numerosi sono gli studi che hanno già permesso di identificare QTL e geni maggiori che hanno un effetto sulle principali caratteristiche produttive. L'introggressione assistita da marcatori (MAI) e la selezione assistita da marcatori (MAS) offrono, inoltre, gli strumenti teorici per l'integrazione delle nuove conoscenze del genoma nei tradizionali schemi di selezione. Nel prossimo futuro si prospetta sempre più l'impiego delle informazioni che derivano dall'analisi del genoma al fine di migliorare l'efficienza dei processi selettivi.

ABSTRACT

In Italy, the traditional selection schemes of heavy pigs have been operated considering the specific needs of the national pig industry that produces mainly high quality dry cured hams and, in general, other high quality cured products. This lecture illustrates the current public selection schemes, starting from an historical perspective, its objectives, its criteria as well as the recorded traits. Moreover, the tremendous amount of information that is emerging from the study of the pig genome is opening new opportunities for the genetic selection of this species. A large number of QTL as well as major genes affecting economic traits have been identified and mapped. These data can be used in marker assisted introgression (MAI) and marker assisted selection (MAS) programs, integrating these new approaches with the traditional methods based on phenotypic selection. In the near future, the traditional selection schemes will be more and more complemented with the molecular data having as final aim the improvement of its efficiency.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER L.J., SMITH T.P., BEATTIE C.W., BROOM M.F. (1997): *Construction and characterization of a large insert porcine YAC library*, «Mammalian Genome», 8, pp. 50-51.
- ANDERSSON S.I., LOPEZ-CORRALES N.L., GORICK B., ARCHIBALD A.L. (2000): *A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector*, «Mammalian Genome», 11, pp. 811-814.
- ANDERSSON L., ARCHIBALD A.L., GELLIN J., SCHOOK L.B. (1993): *1st Pig Gene Mapping Workshop (PGM1), 7 August 1992, Interlaken, Switzerland*, «Animal Genetics», 24, pp. 205-216.
- ANDERSSON L., HALEY C.S., ELLEGREN H., KNOTT S.A., JOHANSSON M., ANDERSSON K., ANDERSSON-EKLUND L., EDFORS-LILJA I., FREDHOLM M., HANSSON I., HÅKANSSON J.,

- LUNDSTÖM K. (1994): *Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs*, «Science», 263, pp. 1771-1774.
- ARCHIBALD A.L., HALEY C.S., BROWN J.F., COUPERWHITE S., MCQUEEN H.A., NICHOLSON D., COPPIETERS W., VAN DE WEGHE A., STRATIL A., WINTERØ A.K., FREDHOLM M., LARSEN N.J., NIELSEN V.H., MILAN D., WOLOSZYN N., ROBIC A., DALENS M., RIQUET J., GELLIN J., CARITEZ J.-C., BURGAUD G., OLLIVIER L., BIDANEL J.-P., VAIMAN M., RENARD C., GELDERMANN H., DAVOLI R., RUYTER D., VERSTEGE E.J.M., GROENEN M.A.M., DAVIES W., HØYHEIM B., KEISERUD A., ANDERSSON L., ELLEGREN H., JOHANSSON M., MARKLUND L., MILLER J.R., ANDERSON DEAR D.V., SIGNER E., JEFFREYS A.J., MORAN C., LE TISSIER P., MULADNO, ROTHSCHILD M.F., TUGGLE C.K., VASKE D., HELM J., LIU H.-C., RAHMAN A., YU T.-P., LARSON R.G., SCHMITZ C.B. (1995): *The PiGMaP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa)*, «Mammalian Genome», 6, pp. 157-175.
- BIDANEL J.-P., MILAN D., IANNUCELLI N., AMIGUES Y., BOSCHER M.-Y., BOURGEOIS F., CARITEZ J.-C., GRUAND J., LE ROY P., LAGANT H., QUINTANILLA R., RENARD C., GELLIN J., OLLIVIER L., CHEVALET C. (2001): *Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs*, «Genetics, Selection, Evolution», 33, pp. 289-309.
- BUIATTI P. G. (1978): *Stato attuale della suinicoltura in Italia*. In Atti Conv. Inter. Rassegna suinicola Internazionale: *Il miglioramento genetico della produzione suinicola per selezione e per incrocio*. Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Reggio Emilia.
- BUTTAZZONI L., GALLO M., BAIOTTO C., CARCHEDI C. (1993): *La selezione per la qualità della carne suina destinata alla trasformazione*, «Rivista di Suinicoltura», 34, (4), pp. 139-145.
- CAETANO A.R., JOHNSON R.K., POMP D. (2003): *Generation and sequence characterization of a normalized cDNA library from swine ovarian follicles*, «Mammalian Genome», 14, pp. 65-70.
- CAMPBELL E.M.G., NONNEMAN D., ROHRER G.A. (2003): *Fine mapping a quantitative trait locus affecting ovulation rate in swine on chromosome 8*, «Journal of Animal Science», 81, pp. 1706-1714.
- CARNIER P., CASSANDRO M., KNOL E., PADOAN D. (1999): *Genetic parameters for some carcass and fresh ham traits of crossbred Goland pigs*, in *Recent Progress in Animal Science*, 1, a cura di G. Piva, G. Bertoni, F. Masoero, P. Bani e L. Calamari, FrancoAngeli, Milano, pp. 221-223.
- CASSADY J.P., JOHNSON R.K., POMP D., ROHRER G.A., VAN VLECK L.D., SPIEGEL E.K., GILSON K.M. (2001): *Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs*, «Journal of Animal Science», 79, pp. 623-633.
- CEPICA S., STRATIL A., KOPECNY M., BLAZKOVA P., SCHRÖFFEL JR. J., DAVOLI R., FONTANESI L., REINER G., BARTENSLAGER H., MOSER G., GELDERMANN H. (2003): *Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 4*, «Journal of Animal Breeding and Genetics», 120, Suppl. 1., pp. 28-37.
- CHOWDHARY B.P. (1998): *Cytogenetics and physical chromosome maps*, in *Genetics of the Pig* a cura di M.F. Rothschild e A. Ruvinsky, CAB Publishing, pp. 199-264.
- CIOBANU D., BASTIAANSEN J., MALEK M., HELM J., WOOLLARD J., PLASTOW G., ROTHSCHILD M. (2001): *Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate activated γ_3 -subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality*, «Genetics», 159, pp. 1151-1162.
- CIOBANU D.C., BASTIAANSEN J.W.M., LONERGAN S.M., THOMSEN H., DEKKERS J.C.M., PLASTOW G.S., ROTHSCHILD M.F. (2004): *New alleles in calpastatin gene are associated*

- with meat quality traits in pigs, «Journal of Animal Science», 82, 2829-2839.
- COMMITTEE FOR THE STANDARDIZED KARYOTYPE OF THE DOMESTIC PIG (1988): *Standard karyotype of the domestic pig*, «Hereditas», 109, pp. 151-157.
- DAVOLI R., ZAMBONELLI P., BIGI D., FONTANESI L., RUSSO V. (1999): *Analysis of expressed sequence tags of porcine skeletal muscle*, «Gene», 233, pp. 181-188.
- DAVOLI R., FONTANESI L., ZAMBONELLI P., BIGI D., GELLIN J., YERLE M., MILC J., BRAGLIA S., CENCI V., CAGNAZZO M., RUSSO V. (2002): *Isolation of porcine expressed sequence tags for the construction of a first genomic transcript map of the skeletal muscle in pig*, «Animal Genetics», 33, pp. 3-18.
- DE KONING D.J., JANSSE L.L.G., RATTINK A.P., VAN OERS P.A.M., DE VRIES B.J., GROENEN M.A.M., VAN DER POEL J.J., DE GROOT P.N., BRASCAMP E.W.(P.), VAN ARENDONK J.A.M. (1999): *Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (Sus scrofa)*, «Genetics», 152, pp. 1679-1690.
- DE KONING D.-J., RATTINK A.P., HARLIZIUS B., VAN ARENDONK J.A.M., BRASCAMP E.W., GROENEN M.A.M. (2000): *Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting*, «Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA», 97, pp. 7947-7950.
- DE KONING D.J., HARLIZIUS B., RATTINK A.P., GROENEN M.A.M., BRASCAMP E.W., VAN ARENDONK J.A.M. (2001): *Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs*, «Journal of Animal Science», 79, pp. 2812-2819.
- DVORAK C.M., HYLAND K.A., MACHADO J.G., ZHANG Y., FAHRENKRUG S.C., MURTAUGH M.P. (2005): *Gene discovery and expression profiling in porcine Peyer's patch*, «Veterinary Immunology and Immunopathology», 105, pp. 301-315.
- ECHARD G., MILAN D., YERLE M., LAHBIB-MANSAIS Y., GELLIN J. (1992): *The gene map of the pig (Sus scrofa domestica L.): a review*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 61, pp. 146-151.
- ELLEGREN H., CHOWDHARY B., JOHANSSON M., ANDERSSON L. (1994): *A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of recombination*, «Genetics», 137, pp. 1089-1100.
- FAHRENKRUG S.C., ROHRER G.A., FREKING B.A., SMITH T.P., OSOEGAWA K., SHU C.L., CATANESE J.J., DE JONG P.J. (2001): *A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration*, «Mammalian Genome», 12, pp. 472-474.
- FAHRENKRUG S.C., FREKING B.A., SMITH T.P.L., ROHRER G.A., KEELE J.W. (2002): *Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in porcine expressed genes*, «Animal Genetics», 33, pp. 186-195.
- FONTANESI L., DAVOLI R., NANNI COSTA L., SCOTTI E., RUSSO V. (2003): *Study of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: identification and analysis of mutations, linkage and physical mapping and association with meat quality traits in pigs*, «Cytogenetics and Genome Research», 102, pp. 145-151.
- FRONICKE L., CHOWDHARY B.P., SCHERTHAN H., GUSTAVSSON I. (1996): *A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies*, «Mammalian Genome», 7, pp. 285-290.
- FUJII J., OTSU K., ZORZATO F., DE LEON S., KHANNA V.K., WEILER J.E., O'BRIEN P.J., MACLENNAN D.H. (1991): *Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia*, «Science», 253, pp. 448-451.
- GELLIN J., BROWN S., MARSHALL GRAVES J.A., ROTHSCHILD M., SCHOOK L., WOMACK J., YERLE M. (2000): *Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally im-*

- portant animals*, «Mammalian Genome», 11, pp. 140-144.
- GIMENEZ-MARTIN G., LOPEZ-SAEZ J.F., MONGE F.G. (1962): *Somatic chromosomes of the pig*, «Journal of Heredity», 53, pp. 281-290.
- GOUREAU A., YERLE M., SCHMITZ A., RIQUET J., MILAN D., PINTON P., FRELAT G., GELLIN J. (1996): *Human and porcine correspondence of chromosome segments using bi-directional chromosome painting*, «Genomics», 36, pp. 252-262.
- GUSTAVSSON I. (1990): *Chromosomes of the pig*, «Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine», 34, pp. 73-107.
- HALEY C.S., VISSCHER P.M. (1998): *Strategies to utilize marker-quantitative trait loci associations*, «Journal of Dairy Science», 81, (Suppl. 2), pp. 85-97.
- HALEY C.S., VISSHER P.M. (2000): *DNA markers and genetic testing in farm animal improvement: current applications and future prospects*, «Roslin Institute Annual Report», 98-99, pp. 28-39.
- HAMASIMA N., SUZUKI H., MIKAWA A., MOROZUMI T., PLASTOW G., MITSUHASHI T. (2003): *Construction of a new porcine whole-genome framework map using a radiation hybrid panel*, «Animal Genetics», 34, pp. 216-220.
- HARLIZIUS B., RATTINK A.P., DE KONING D.J., FAIVRE M., JOOSTEN R.G., VAN ARENDONK J.A.M., GROENEN M.A.M. (2000): *The X Chromosome harbors quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs*, «Mammalian Genome», 11, pp. 800-802.
- HAWKEN R.J., MURTAUGH J., FLICKINGER G.H., YERLE M., ROBIC A., MILAN D., GELLIN J., BEATTIE C.W., SCHOOK L.B., ALEXANDER L.J. (1999): *A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map*, «Mammalian Genome», 10, pp. 824-830.
- HILL W.G. (1993): *Variation in genetic composition in backcrossing programs*, «Journal of Heredity», 84, pp. 212-213.
- HOSPITAL F., CHARCOSSET A. (1997): *Marker-assisted introgression of quantitative trait loci*, «Genetics», 147, pp. 1469-1485.
- HU Z. L., DRACHEVA S., JANG W., MAGLOTT D., BASTIAANSEN J., ROTHSCHILD M. F., REECY J. M. (2005): *A QTL resource and comparative tool for pigs: PigQTLDB*, «Mammalian Genome», 16, pp. 792-800.
- JEON J.-T., CARLBORG Ö., TÖRNSTEN A., GIUFFRÀ E., AMARGER V., CHARDON P., ANDERSSON-EKLUND L., ANDERSSON K., HANSSON I., LUNDSTÖM K., ANDERSSON L. (1999): *A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus*. «Nature Genetics», 21, pp. 157-158.
- JUNGERIUS B.J., RATTINK A.P., CROOIJMANS R.P., VAN DER POEL J.J., VAN OOST B.A., TE PAS M.F., GROENEN M.A. (2003): *Development of a single nucleotide polymorphism map of porcine chromosome 2*, «Animal Genetics», 34, pp. 429-437.
- KIM K.S., LARSEN N., SHORT T., PLASTOW G., ROTHSCHILD M.F. (2000): *A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits*, «Mammalian Genome», 11, pp. 131-135.
- KING A.H., JIANG Z., GIBSON J.P., HALEY C.S., ARCHIBALD A.L. (2003): *Mapping quantitative trait loci affecting female reproductive traits on porcine chromosome 8*, «Biology of Reproduction», 68, pp. 2172-2179.
- KNOTT S.A., MARKLUND L., HALEY C.S., ANDERSSON K., DAVIES W., ELLEGREN H., FREDHOLM M., HANSSON I., HOYHEIM B., LUNDSTRÖM K., MOLLER M., ANDERSSON L. (1998): *Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred Wild Boar and Large White pigs*, «Genetics», 149, pp. 1069-1080.

- KOUDANDÉ O.D., IRAQI F., THOMSON P.C., TEALE A.J., VAN ARENDONK J.A.M. (2000): *Strategies to optimize marker-assisted introgression of multiple unlinked QTL*, «Mammalian Genome», 11, pp. 145-150.
- LALLEY P. e McKUSICK V. (1985): *Report of the committee on comparative mapping. Eighth International Workshop on Human Gene Mapping*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 40, pp. 536-566.
- LALLEY P., DAVIDSSON M., GRAVES J., O'BRIEN S., WOMACK J., RODERICK T., CRE-GOLDBERG M., HILLYARD A., DOOLITTLE D., ROGERS J. (1989): *Report of the committee on comparative mapping. Tenth International Workshop on Human Gene Mapping*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 51, pp. 503-532.
- LEEB T., RETTENBERGER G., HAMEISTER H., BREM G., BREINIG B. (1995): *Construction of a porcine YAC library and mapping of the cardiac muscle ryanodine receptor gene to chromosome 14q22-q23*, «Mammalian Genome», 6, pp. 37-41.
- LE ROY P., NAVEAU J., ELSÉN J.M., SELLIER P. (1990): *Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs*, «Genetical Research (Camb.) », 55, pp. 33-40.
- LIU W.S., EYER K., YASUE H., ROELOFS B., HIRAIWA H., SHIMOGIRI T., LANDRITO E., EKSTRAND J., TREAT M., RINK A., YERLE M., MILAN D., BEATTIE C.W. (2005): *A 12,000-rad porcine radiation hybrid (IMNpRH2) panel refines the conserved synteny between SSC12 and HSA17*, «Genomics», 86, pp. 731-738.
- LOOFT C., REINSCH N., RUDAT I., KALM E. (1996): *Mapping the porcine RN gene to chromosome 15*, «Genetics, Selection, Evolution», 28, pp. 437-442.
- MALEK M., DEKKERS J.C.M., LEE H.K., BAAS T.J., PRUSA K., HUFF-LONERGAN E., ROTHSCHILD M.F. (2001): *A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition*, «Mammalian Genome», 12, pp. 637-645.
- MARIANI P., LUNDSTRÖM K., GUSTAFSSON U., ENFÄLT A.-C., JUNEJA R.K., ANDERSSON L. (1996): *A major locus (RN) affecting muscle glycogen content is located on pig Chromosome 15*, «Mammalian Genome», 7, pp. 52-54.
- MARKLUND L., NYSTRÖM P.-E., STERN S., ANDERSSON-EKLUND L., ANDERSSON L. (1999): *Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4*, «Heredity», 82, pp. 134-141.
- MARTINS-WESS F., MILAN D., DRÖGEMÜLLER C., VOSS-NEMITZ R., BREINIG B., ROBIC A., YERLE M., LEEB T. (2003): *A high resolution physical and RH map of pig chromosome 6q1.2 and comparative analysis with human chromosome 19q13.1*, «BMC Genomics», 4, e-pp. 20.
- MEIJERINK E., FRIES R., VÖGELI P., MASABANDA J., WIGGER G., STRICKER C., NEUENSCHWANDER S., BERTSCHINGER H.U., STRANZIGER G. (1997): *Two $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci*, «Mammalian Genome», 8, pp. 736-741.
- MERCADÉ A., ESTELLÉ J., NOGUERA J.L., FOLCH J.M., VARONA L., SILLÓ L., SÁNCHEZ A., PÉREZ-ENCISO M. (2005): *On growth, fatness, and form: a further look at porcine Chromosome 4 in an Iberian x Landrace cross*, «Mammalian Genome», 16, pp. 374-382.
- MEYERS S. N., ROGATCHEVA M. B., LARKIN D. M., YERLE M., MILAN D., HAWKEN R. J., SCHOOK L. B., BEEVER J. E. (2005): *Piggy-BACing the human genome II. A high-resolution, physically anchored, comparative map of the porcine autosomes*, «Genomics», 86, pp. 739-752.
- MIKAWA A., SUZUKI H., SUZUKI K., TOKI D., UENISHI H., AWATA T., HAMASIMA N. (2004): *Characterization of 298 ESTs from porcine back fat tissue and their assignment to*

- the SSRH radiation hybrid map*, «Mammalian Genome», 15, pp. 315-322.
- MILAN D., WOLOSZYN N., YERLE M., LE ROY P., BONNET M., RIQUET J., LAHBIB-MANSAIS Y., CARITEZ J.-C., ROBIC A., SELLIER P., ELSSEN J.-M., GELLIN J. (1996): *Accurate mapping of the "acid meat" RN gene on genetic and physical maps of pig Chromosome 15*, «Mammalian Genome», 7, pp. 47-51.
- MILAN D., JEON J.-T., LOOFT C., AMARGER V., ROBIC A., THELANDER M., ROGEL-GAILLARD C., PAUL S., IANNUCELLI N., RASK L., RONNE H., LUNDSTÖM K., REINSCH N., GELLIN J., KALM E., LE ROY P., CHARDON P., ANDERSSON L. (2000): *A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle*, «Science», 288, pp. 1248-1251.
- MONIN G., SELLIER P. (1985): *Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: the case of the Hampshire breed*, «Meat Science», 13, pp. 49-63.
- NANNI COSTA L., LO FIEGO D.P., PANTANO A., RUSSO V. (2000): *Relationship between glycolytic potential and technological quality of meat and dry-cured Parma ham in the Italian heavy pig*, in *Tradition and Innovation in Mediterranean Pig Production*, a cura di J.A. Afonso de Almeida e J.L. Nunes Tirapicos, CIHEAM, Zaragoza, Spain, pp. 227-231.
- NAVEAU J., POMMERET P., LECHAUX P. (1985): *Proposition d'une méthode de mesure du rendement technologique: la méthode Napole*, «Techni-Porc», 8, pp. 6-13.
- NAVEAU J. (1986): *Contribution à l'étude du déterminisme génétique de la qualité de viande porcine: Héritabilité du Rendement Technologique Napole*, «Journée Recherche Porcine en France», 18, pp. 265-275.
- NEZER C., MOREAU L., BROUWERS B., COPPIETERS W., DETILLEUX J., HANSET R., KARIM L., KVASZ A., LEROY P., GEORGES M. (1999): *An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs*, «Nature Genetics», 21, pp. 155-156.
- NOBIS W., REN X., SUCHYTA S.P., SUCHYTA T.R., ZANELLA A.J., COUSSENS P.M. (2003): *Development of a porcine brain cDNA library, EST database, and microarray resource*, «Physiological Genomics», 16, pp. 153-159.
- ÓVILO C., OLIVER A., NOGUERA J.L., CLOP A., BARRAGÁN C., VARONA L., RODRÍGUEZ C., TORO M., SÁNCHEZ A., PÉREZ-ENCISO M., SILIÓ L. (2002): *Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6*, «Genetics, Selection, Evolution», 34, pp. 465-479.
- PAN Z.X., CHEN J., HUANG R.H., XU D., XU Y.X., XIE Z., JIANG Z.H., LIU H.L., ZHAO R.Q. (2005): *Analysis of gene expression information in the fat and muscle tissues of pig*, «Yi Chuan Xue Bao», 32, pp. 264-274.
- RATHJE T.A., ROHRER G.A., JOHNSON R.K. (1997): *Evidence for quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs*, «Journal of Animal Science», 75, pp. 1486-1494.
- RATTINK A.P., FAIVRE M., JUNGERIUS B.J., GROENEN M.A., HARLIZIUS B. (2001): *A high-resolution comparative RH map of porcine chromosome (SSC) 2*, «Mammalian Genome», 12, pp. 366-370.
- RETTEBERGER G., KLETT C., ZECHNER U., KUNZ J., VOGEL W., HAMEISTER H. (1995): *Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting*, «Genomics», 26, pp. 372-378.
- RINK A., SANTSCHI E.M., EYER K.M., ROELOFS B., HESS M., GODFREY M., KARAJUSUF E.K., YERLE M., MILAN D., BEATTIE C.W. (2002): *A first-generation EST RH comparative map of the porcine and human genome*, «Mammalian Genome», 13, pp. 578-587.

- ROGEL-GAILLARD C., BOURGEOUX N., SAVE J.C., RENARD C., COULLIN P., PINTON P., YERLE M., VAIMAN M., CHARDON P. (1997): *Construction of a swine YAC library allowing an efficient recovery of unique and centromeric repeated sequences*, «Mammalian Genome», 8, pp. 186-192.
- ROGEL-GAILLARD C., BOURGEOUX N., BILLAULT A., VAIMAN M., CHARDON P. (1999): *Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 85, pp. 205-211.
- ROHRER G.A., ALEXANDER L.J., KEELE J.W., SMITH T.P.L., BEATTIE C.W. (1994): *A microsatellite linkage map of the porcine genome*, «Genetics», 136, pp. 231-245.
- ROHRER G.A., ALEXANDER L.J., HU Z., SMITH T.P.L., KEELE J.W., BEATTIE C.W. (1996): *A comprehensive map of the porcine genome*, «Genome Research», 6, pp. 371-391.
- ROHRER G.A., FORD J.J., WISE T.H., VALLET J.L., CHRISTENSON R.K. (1999): *Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a multigeneration Meishan-White Composite swine population*, «Journal of Animal Science», 77, pp. 1385-1391.
- ROHRER G.A., WISE T.H., LUNSTRA D.D., FORD J.J. (2001): *Identification of genomic regions controlling plasma FSH concentrations in Meishan-White composite boars*, «Physiological Genomics», 6, 145-151.
- ROTHSCHILD M., JACOBSON C., VASKE D., TUGGLE C., WANG L., SHORT T., ECKARDT G., SASAKI S., VINCENT A., MCLAREN D., SOUTHWOOD O., VAN DER STEEN H., MILEHAM A., PLASTOW G. (1996): *The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs*, «Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA», 93, 201-205.
- RUSSO V. (1988): *Pig carcass and meat quality: requirements of industry and consumers*. In Proc. Meet: *Pig Carcass and meat quality*. Università di Bologna.
- RUSSO V., NANNI COSTA L., LO FIEGO D.P., DE GROSSI A. (1991): *Early estimation of seasoning loss in Parma ham production*, «Proceedings of the 37th Int. Congr. of Meat Science and Technology», Kulmbach, Germany, pp. 926-929.
- RUSSO V., DAVOLI R., TAGLIAVINI J., DALL'OLIO S., BIGI D., COSTOSI E., COSCELLI M. B., FONTANESI L. (1993): *Identificazione del genotipo dei suini per la sensibilità all'alotano a livello di DNA mediante PCR*, «Zootecnica e Nutrizione Animale», 19, pp. 89-93.
- RUSSO V., DAVOLI R., DALL'OLIO S., ZAMBONELLI P. (1994): *Individuazione del genotipo Alotano nei suini mediante PCR di diversi tipi di tessuto*, «Atti 48° Convegno Nazionale SISVet», pp. 1715-1719.
- RUSSO V. e NANNI COSTA L. (1995): *Suitability of pig meat for salting and the production of quality processed products*, «Pig News and Information», 16, pp. 17N-26N.
- RUSSO V., DALL'OLIO S., DAVOLI R., COSCELLI M.B., BIGI D. (1996): *Studio del locus Alotano nelle razze suine allevate in Italia mediante test PCR*, «Zootecnica e Nutrizione Animale», 22, pp. 33-38.
- SMITH T.P., FAHRENKRUG S.C., ROHRER G.A., SIMMEN F.A., REXROAD C.E., KEELE J.W. (2001): *Mapping of expressed sequence tags from a porcine early embryonic cDNA library*, «Animal Genetics», 32, pp. 66-72.
- SOLLER M. (1991): *Mapping quantitative trait loci affecting traits of economic importance in animal populations using molecular markers*, in *Gene-Mapping Techniques and Applications*, a cura di L.B. Schook, H.A. Lewin, D.G. McLaren, Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 21-49.
- SOUTHWOOD O.I., VAN DER STEEN H.A.M., MILEHAM A.J., CUTHBERT-HEAVENS D. (1995): *Evaluation of the oestrogen receptor (ESR) gene in Meishan syntetic and Lar-*

- ge White pigs*, Book of Abstracts No 1 of the 46th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 53 (Abstr.). Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.
- SPELMAN R.J., VAN ARENDONK J.A.M. (1997): *Effect of inaccurate parameter estimates on genetic response to marker assisted selection in an outbred population*, «Journal of Dairy Science», 80, pp. 3399-3410.
- SUZUKI K., ASAKAWA S., IIDA M., SHIMANUKI S., FUJISHIMA N., HIRAIWA H., MURAKAMI Y., SHIMIZU N., YASUE H. (2000): *Construction and evaluation of a porcine bacterial artificial chromosome library*, «Animal Genetics», 31, pp. 8-12.
- TOSSEK-KLOPP G., BENNE F., BONNET A., MULSANT P., GASSER F., HATEY F. (1997): *A first catalog of gene involved in pig ovarian follicular differentiation*, «Mammalian Genome», 8, pp. 250-254.
- UFFICIO TECNICO ANAS (2003): *Il contributo della selezione italiana alla filiera del suino pesante*. «Informatore Agrario», 59, (suppl. 13), pp. 7-8.
- VAN LAERE A.-S., NGUYEN M., BRAUNSCHWEIG M., NEZER C., COLLETTE C., MOREAU L., ARCHIBALD A.L., HALEY C.S., BUYS N., TALLY M., ANDERSSON G., GEORGES M., ANDERSSON L. (2003): *A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig*, «Nature», 425, pp. 832-836.
- VILLANUEVA B., PONG-WONG R., FERNANDEZ J., TORO M.A. (2005): *Benefits from marker-assisted selection under an additive polygenic genetic model*, «Journal of Animal Science», 83, pp. 1747-1752.
- VISSCHER P.M., HALEY C.S. (1998): *Strategies for marker-assisted selection in pig breeding programmes*, Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 23, pp. 503-510. University of New England, Armidale, Australia.
- WERNERSSON R., SCHIERUP M. H., JØRGENSEN F. G., GORODKIN J., PANITZ F., STÆRFELDT H.-H., CHRISTENSEN O. F., MAILUND. T., HORNSHØJ H., KLEIN A., WANG J., LIU B., HU S., DONG W., LI W., WONG G. K. S., YU J., WANG J., BENDIXEN C., FREDHOLM M., BRUNAK S., YANG H., BOLUND L. (2005): *Pigs in sequence space: A 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing*, «BMC Genomics», 6, e-p. 70.
- WILKIE P.J., PASZEK A.A., BEATTIE C.W., ALEXANDER L.J., WHEELER M.B., SCHOOK L.B. (1999): *A genome scan of porcine reproductive traits reveals possible quantitative trait loci (QTLs) for number of corpora lutea*, «Mammalian Genome», 10, pp. 573-578.
- WINTERO A.K., FREDHOLM M., DAVIES W. (1996): *Evaluation and characterization of a porcine small intestine cDNA library*, «Mammalian Genome», 7, pp. 509-517.
- WØDSEDALEK J.E. (1913): *Spermatogenesis of the pig with special reference to the accessory chromosomes*, «Biological Bulletin», 25, pp. 8-32.
- YAO J., COUSSENS P.M., SAAMA P., SUCHYTA S., ERNST C.W. (2002): *Generation of expressed sequence tags from a normalized porcine skeletal muscle cDNA library*, «Animal Biotechnology», 13, pp. 211-222.
- YERLE M., LAHBIB-MANSAIS Y., MELLINK C., GOUREAU A., PINTON P., ECHARD G., GELLIN J., ZIJLSTRA C., HAAN N., BOSMA A. A., CHOWDHARY B., GU F., GUSTAVSSON I., THOMSEN P. D., CHRISTENSEN K., RETTENBERGER G., HAMEISTER H., SCHMITTZ A., CHAPUT B., FRELAT G. (1995): *The PiGMap consortium cytogenetic map of the domestic pig (Sus scrofa domestica)*, 6, pp. 176-186.
- YERLE M., ECHARD G., ROBIC A., MIRAL A., DUBUT-FONTANAT C., RIQUET J., PINTON P., MILAN D., LAHBIB-MANSAIS Y., GELLIN J. (1996): *A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 73, pp. 194-202.

- YERLE, M., PINTON. P., ROBIC A., ALFONSO A., PALVADEAU Y., DELCROS C., HAWKEN R., ALEXANDER L., BEATTIE C., SCHOOK L., MILAN D., GELLIN J., (1998): *Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 82, pp. 182-188.
- YERLE M., PINTON P., DELCROS C., ARNAL N., MILAN D., ROBIC A. (2002): *Generation and characterization of a 12,000-rad radiation hybrid panel for fine mapping in pig*, «Cytogenetics and Genome Research», 97, pp. 219-228.
- ZIJLSTRA C., BOSMA A.A., DE HAAN N.A., MELLINK C. (1996): *Construction of a cytogenetically characterized porcine somatic cell hybrid panel and its use as a mapping tool*, «Mammalian Genome», 7, pp. 280-284.

Selezione tradizionale e assistita da marcatori per la produzione di carne nei bovini**

PREMESSA

L'obiettivo della presente relazione non è di fare una rassegna bibliografica completa sull'argomento, ma è di relazionare in modo schematico e necessariamente limitato, partendo dalla situazione presente della selezione delle popolazioni bovine da carne in Italia, in termini di obiettivi perseguiti, di metodi applicati e di risultati raggiunti, per affrontare poi sommariamente i temi di nuovi obiettivi di selezione e nuovi metodi che le conoscenze e le tecnologie recenti rendono possibile oggi.

L'ultima parte della relazione delinea alcune opportunità che conoscenze e tecnologie rendono disponibili nel campo della genetica e della riproduzione animale per il miglioramento della efficienza del settore con metodologie diverse, ma complementari, rispetto alla selezione.

È superfluo ricordare che tanto la politica agricola europea che quella nazionale sono sempre più condizionate da un processo di globalizzazione dei mercati. In tale scenario i prezzi delle *commodities* per l'industria agroalimentare tenderanno inevitabilmente ad allinearsi verso il basso ai prezzi dei mercati mondiali.

Il settore della produzione della carne bovina del nostro Paese non sarà

* Dipartimento di Scienze animali, Università degli Studi di Padova

** Gruppo di lavoro: Andrea Albera, ANABoRaPi - Carrù; Dario Cianci, Università di Bari; Adalberto Falaschini, Università di Bologna; Sergio Gigli, CRA - Tormancina, Roma; Francesco Pannela, Università di Perugia; Daniele Vicario, ANAPRI - Udine.

Hanno collaborato: Marco Bona, ANABoRaPi - Carrù; Paolo Carnier, Università di Padova; Martino Cassandro, Università di Padova; Roberta Ciampolini, LBG di Pisa; Riccardo Dal Zotto, Università di Padova; Lorenzo Degano, ANAPRI - Udine; Italo Gilmozzi, ANARE - Trento; Francesco Filippini, ANABIC - Perugia; Flavio Forabosco, Interbull - Uppsala; Roberto Mantovani, Università di Padova; Cristina Muller, ANAGA - Bolzano; Mario Vevey, ANABoRaVa - Aosta; Emanuele Villa, ALA - Roma.

mai competitivo, in termini di costi di produzione, con quello di altri continenti a zootecnia estensiva e a basso costo dei fattori produttivi e, probabilmente, nemmeno con quello di alcuni Paesi nordeuropei, soprattutto se finalizzato alla produzione di carni anonime, sane e di qualità standardizzata, come quelle richieste da molte industrie e da numerose catene della grande distribuzione organizzata e, sempre più frequentemente, anche dalla piccola distribuzione specializzata (macellerie, salumerie, ecc.).

Lo spazio che la produzione nazionale di carne bovina può ritagliarsi in questo contesto non può che essere quello ottenibile in un'ottica di filiera *"from farm to fork"* che sappia assicurare e far pagare non solo livelli qualitativi di eccellenza, ma anche valori intangibili quali le specificità dei diversi ambienti di produzione, il significato delle tradizioni locali e la ricchezza culturale delle enogastronomie italiane. In questa ottica assume un valore aggiunto essenziale l'identificabilità delle carni prodotte in termini qualitativi, di origine, di tecniche di produzione, di modalità di cottura e di presentazione e la loro rintracciabilità *"from fork to farm"*.

RISULTATI DELLA SELEZIONE

Gli obiettivi perseguiti

Tralascieremo, per ragioni di tempo e di spazio, di ricordare la storia delle organizzazioni degli allevatori, della creazione e tenuta dei Libri genealogici, dell'attuazione dei controlli funzionali e della evoluzione degli schemi di selezione e dei sistemi di valutazione genetica di riproduttori delle razze bovine da carne in Italia, anche se un confronto con la situazione di due decenni fa (Bittante et al., 1987; Bittante et al., 1990) evidenzia chiaramente l'evoluzione intervenuta. Faremo invece riferimento alla situazione attuale delle varie razze, cominciando dagli obiettivi perseguiti nella selezione e tralasciando quelli, pure importanti, di caratterizzazione e valorizzazione commerciale.

Parlando di obiettivi di selezione occorre distinguere almeno tre livelli diversi di definizione. Il primo è quello dei caratteri per i quali le diverse associazioni nazionali allevatori delle varie razze raccolgono ed elaborano le informazioni e forniscono i valori genetici stimati o i genotipi dei riproduttori. Il secondo livello è quello dei caratteri, una parte dei precedenti, che vengono inclusi con un peso economico ben definito nell'indice di selezione globale della razza. Il terzo livello è quello degli obiettivi perseguiti dai singoli

	IPG	MUSCOLOSITÀ	TAGLIA	ARTI	FACILITÀ NASCITA	FACILITÀ DI PARTO	PROD. LATTE	ALTRO
Piemontese "Carne"	14	20	-	6	40	20	-	-
Piemontese "Allevamento"	14	20	-	6	20	40	-	-
Chianina	50	50	-	-	-	-	-	-
Marchigiana	50	50	-	-	-	-	-	-
Romagnola	50	50	-	-	-	-	-	-
Maremmana	50	-	-	-	-	-	-	50
Podolica	50	-	-	-	-	-	-	50
Charolais	-	-	-	-	-	-	-	-
Limousin	24	41	19	-	16	-	-	-
Pezzata Rossa	6	18	1	6	-	-	44	25
Valdostana P.R.	12	18	-	-	-	-	70	-
Valdostana Cast.+P.N.	20	30	-	-	-	-	50	-
Rendena	5	20	-	-	-	-	65	10

Tab. 1 *Peso percentuale dei diversi caratteri inclusi nell'indice di selezione toro delle principali razze bovine da carne e a duplice attitudine allevate in Italia (IPG: incremento ponderale giornaliero)*

allevatori e che spesso sono diversi tra di loro e non coincidenti con quelli rappresentati dall'indice di selezione.

Ci occuperemo di seguito soprattutto del secondo livello, che identifica le reali volontà selettive delle associazioni. Il terzo livello, quello degli allevatori, non è misurabile con precisione ma influenza non poco i risultati conseguiti in una razza e spiega, assieme alle eventuali inefficienze organizzative e errori di impostazione, la differenza tra il progresso genetico realizzabile teoricamente e quello effettivamente ottenuto.

In tabella 1 è riportato il peso percentuale attribuito ai principali caratteri inclusi negli IGT (indice genetico toro) adottati dalle varie associazioni di razza.

Come si può osservare, l'ANABoRaPi utilizza per la Piemontese due diversi indici di selezione: l'indice "carne" e l'indice "allevamento". A seguito delle più recenti modifiche, i due indici sono ora molto simili. Entrambi riservano il 40% del peso ai caratteri valutati direttamente sui torelli durante la prova di performance condotta presso il Centro genetico di Carrù (Cuneo): in particolare viene riservato il 20% del peso al valore genetico del torello per la muscolosità, il 14% per quello della velocità di crescita ed il 6% per gli arti e piedi.

Ben il 60% del peso complessivo è riservato ai parti.

D'altra parte la fissazione della mutazione al locus della miostatina che induce l'ipertrofia muscolare, studiata a lungo dal gruppo di ricerca guidato da Liliana Di Stasio (Di Stasio et al., 2002; Di Stasio et al., 2003; Di Stasio et al., 2005), ha causato in questa razza, oltre agli indubbi effetti favorevoli sulla conformazione della carcassa e sulla qualità della carne, anche un netto aumento delle difficoltà di parto e della conseguente mortalità dei vitelli.

Come noto l'andamento di un parto dipende contemporaneamente da due fattori: la facilità con cui un vitello nasce (che a sua volta dipende soprattutto da peso e conformazione del feto) e la facilità con cui la bovina lo partorisce (taglia, muscolosità, pelvimetria interna, preparazione al parto, ecc.). Questi due caratteri sono normalmente correlati negativamente dal punto di vista genetico, per cui selezionare per vitelli piccoli che nascono facilmente porterà poi ad ottenere vacche che partoriranno con più difficoltà e viceversa. Questi due caratteri vengono indicizzati separatamente e indicati come facilità di nascita e facilità di parto, oppure come effetto diretto e materno sulle difficoltà di parto, oppure, meno correttamente, anche come facilità di parto toro e facilità di parto vacca e richiedono l'effettuazione delle prove di progenie di campo.

Nel caso dell'indice "carne", utilizzato in una specie di incrocio intrarazziale per produrre vitelli da macello, l'obiettivo fondamentale è di aumentare la facilità di nascita, cui è riservato il 40% del peso complessivo, mentre il 20% dedicato alla facilità di parto serve sostanzialmente a compensare l'effetto negativo sulla facilità di parto delle vacche impedendo che peggiori, dato che comunque molte vitelle nate da tori ad alto indice "carne" vengono allevate lo stesso per la rimonta. Questo indice è generalmente utilizzato anche per la fecondazione delle manze e per l'incrocio su vacche da latte.

Nel caso dell'indice "allevamento", invece, l'obiettivo principale (40%) è di migliorare la capacità della vacca di partorire facilmente anche vitelli pesanti e l'inclusione (20%) della facilità di nascita serve a impedirne un peggioramento, stante le correlazioni genetiche negative.

Nel caso delle tre razze stalline dell'ANABIC, Chianina, Marchigiana e Romagnola, l'IGT è basato unicamente sui caratteri controllabili sui torelli durante la prova di performance condotta presso il Centro genetico di San Martino in Colle (Perugia): in particolare viene riservato il 50% del peso economico alla velocità di crescita (inclusa anche quella realizzata nell'allevamento di origine fino all'arrivo al Centro genetico) e il rimanente 50% alla muscolosità, rilevata in 9 diverse regioni dell'animale.

D'altra parte l'andamento dei parti in queste razze è meno difficoltoso che nella Piemontese, anche se le preoccupazioni per questo carattere stanno aumentando in parallelo con il miglioramento, in tutte tre le razze, della musco-

losità degli animali e con la diffusione, fin troppo rapida e poco controllata, di una mutazione del locus della miostatina, simile ma non uguale a quella della Piemontese, nella razza Marchigiana.

Anche nel caso delle due razze rustiche dell'ANABIC, la Maremmana e la Podolica, i torelli vengono selezionati solamente in base a caratteri rilevati su di essi ed in particolare la velocità di crescita (50%) e il punteggio finale della valutazione morfologica (50%).

L'ANACLI gestisce la valutazione dei tori di razza Charolais e di razza Limousin, ma, mentre le valutazioni della prima sono state sospese alcuni anni fa a causa dei problemi sanitari (*blue tongue*) che hanno colpito il Centro genetico in Sardegna, quelle della seconda proseguono presso il Centro genetico di Piacenza.

L'indice di selezione della Limousin include i caratteri rilevati sui torelli per l'84% del totale: il 24% è riservato alla velocità di crescita, il 41% alla muscolosità degli animali ed il 19% al loro "sviluppo scheletrico".

Solo il 16% del peso complessivo è riservato ai parti ed in particolare alla facilità di nascita dei vitelli. Stupisce un po' questa scelta perché indica che, tenuto conto delle probabili correlazioni genetiche tra i caratteri inclusi nell'indice, l'obiettivo vero di selezione della Limousin è di migliorare al massimo le caratteristiche dei torelli senza peggiorare, ma nemmeno migliorare, la facilità di nascita dei suoi vitelli (è noto che la Limousin è caratterizzata da una buona facilità di nascita, anche nell'incrocio con vacche da carne) ed accettando un probabile peggioramento delle non eccelse attitudini al parto delle sue vacche.

Passando ad esaminare brevemente le razze a duplice attitudine, non stupisce il fatto che da metà a tre quarti del peso complessivo degli indici di selezione dei tori sia riservato ai caratteri legati alla produzione lattifera o a quelli morfologici e funzionali.

Nella Pezzata rossa italiana, l'ANAPRI riserva il 25% del peso complessivo ai caratteri da carne: l'1% alla taglia, il 6% alla velocità di crescita ed il 18% alla muscolosità. È da considerare che la muscolosità include sia il dato rilevato alla fine della prova di performance dei torelli candidati alla inseminazione artificiale presso il Centro genetico di Fiume veneto (Pordenone), che il dato di campo, frutto della valutazione morfologica delle primipare.

Anche nel caso dell'ANABoRaVa, alla muscolosità è riservato un peso superiore della metà di quello attribuito alla velocità di crescita dei torelli durante la prova di performance condotta presso il Centro Genetico di Gressan (Aosta), ma la loro somma è pari al 30% dell'indice complessivo nel caso della Valdostana Pezzata rossa, mentre sale al 50% in quelli della Valdostana

	IPG	MUSC.	TAGLIA	ARTI	FACILITÀ NASCITA	FACILITÀ DI PARTO	PROD. LATTE	ALTRO
Piemontese "carne"	14	20	-	6	40	20	-	-
Piemontese "allev."	14	20	-	6	20	40	-	-
Chianina	25	40	30	5	-	-	-	-
Marchigiana	25	45	15	5	-	-	-	10
Romagnola	25	50	20	5	-	-	-	-
Maremmana	-	-	-	-	-	-	-	-
Podolica	-	-	-	-	-	-	-	-
Charolais	-	-	-	-	-	-	-	-
Limousin	-	-	-	-	-	-	-	-
Pezzata Rossa	6	18	1	6	-	-	44	25
Valdostana P.R.	-	15	-	-	-	-	70	15
Valdostana Castana+P.N.	-	50	-	-	-	-	50	-
Rendena	5	20	-	-	-	-	65	10

Tab. 2 *Peso percentuale dei diversi caratteri inclusi nell'indice di selezione vacca delle principali razze bovine da carne e a duplice attitudine allevate in Italia*

Castana e della Valdostana Pezzata nera.

Nel caso dell'ANARE, la valutazione dei torelli di razza Rendena include i caratteri rilevati nel corso della prova di performance condotta presso il Centro Genetico di Bassano del Grappa (Venezia), assegnando alla velocità di crescita un peso economico pari ad un quarto di quello del prodotto tra muscolosità e resa stimata al macello (quantità e valore delle carcasse prodotte).

Infine l'ANAGA non include nell'indice di selezione complessivo caratteri da carne, anche se procede comunque alla raccolta in un centro dei vitelli di razza Grigia alpina candidati alla inseminazione strumentale e all'eliminazione di quelli con velocità di crescita insufficiente e/o che presentano gravi difetti morfologici.

In tabella 2 sono invece riportati i pesi economici attribuiti ai caratteri inclusi negli indici genetici vacca (IGV).

Come si può vedere, la situazione è molto variegata: le bovine di razza Piemontese, Pezzata rossa e Rendena sono valutate e selezionate utilizzando lo stesso indice impiegato per i tori, le bovine di razza Maremmana, Podolica, Charolais e Limousin e Grigia alpina sono selezionate su base fenotipica senza impiego di un genotipo aggregato, per le altre razze, infine, si adotta un indice specifico diverso da quello usato per i tori.

Nel caso delle vacche delle tre razze stalline dell'ANABIC, infatti, si usano indici IGV non solo diversi da quelli dei tori ma anche diversi tra le tre razze. Per tutte tre le razze il 65-75% del peso complessivo è riservato

	ACCOPIAMENTI PROGRAMMATI	PROVA DI PERFORMANCE	PROVA DI PROGENIE:			
			carne	morfologia	parti	latte
Piemontese	SI	SI	-	(SI)	SI	-
Chianina	SI	SI	(SI)	SI	-	-
Marchigiana	SI	SI	(SI)	SI	-	-
Romagnola	SI	SI	(SI)	SI	-	-
Maremmana	-	SI	-	-	-	-
Podolica	-	SI	-	-	-	-
Charolais	-	NO	(SI)	-	(SI)	-
Limousin	-	SI	(SI)	-	(SI)	-
Pezzata Rossa	SI	SI	-	SI	-	SI
Valdostana	SI	SI	-	SI	-	SI
Rendena	SI	SI	-	SI	-	SI

Tab. 3 *Metodi di valutazione genetica dei riproduttori delle principali razze bovine da carne e a duplice attitudine allevate in Italia*

al valore genetico delle bovine per i caratteri rilevati al Centro genetico sui torelli loro parenti: in particolare la velocità di crescita incide per il 25% in tutte le razze e la muscolosità per il 40% nella Chianina, per il 45% nella Marchigiana e per 50% nella Romagnola. Il resto del peso nell'IGV è attribuito al valore genetico delle bovine per alcuni caratteri rilevati tramite valutazione morfologica quando le stesse sono ancora manze. In particolare la taglia delle bovine, con un peso del 30% nella Chianina, del 15% nella Marchigiana e del 20% nella Romagnola, assorbe la maggior parte del minor peso economico riservato alla capacità di crescita nell'IGV rispetto all'IGT. A questo si aggiunge un 5% riservato in tutte le razze agli arti e, ma solo nel caso della Marchigiana, un 10% riservato alla finezza. Pur dando risultati selettivi abbastanza simili, anche per il gioco delle correlazioni genetiche tra i singoli caratteri, i tre IGV si contraddistinguono per un maggior peso di circa il 10% attribuito al carattere più distintivo della razza e cioè alla taglia nella Chianina, alla finezza nella Marchigiana e alla muscolosità nella Romagnola.

Nel caso della Valdostana, infine, viene mantenuto il peso riservato all'indice Fontina nell'IGT (rispettivamente pari al 70% nella Pezzata rossa e al 50% nella Pezzata nera e nella Castana) ma il resto non è attribuito ai dati ottenuti nel performance test ma nella valutazione morfologica delle bovine. Nel caso della Valdostana Pezzata rossa il 30% rimanente è diviso tra il 15% della muscolosità ed il 15% della mammella mentre nelle altre due varietà di mantello il 50% è tutto attribuito alla muscolosità delle bovine.

I metodi applicati

In tabella 3 sono riassunti i principali metodi di valutazione genetica impiegati nella selezione delle razze da carne o a duplice attitudine italiane.

In tutte le razze da carne o a duplice attitudine italiane, con le eccezioni delle due razze rustiche e delle due francesi, le associazioni nazionali di razza predispongono gli accoppiamenti programmati tra le potenziali madri di toro ed i potenziali padri di toro (ed in qualche caso anche sulle rimanenti bovine a richiesta degli allevatori o delle loro associazioni provinciali). In questo modo si “costruiscono” gli indici pedigree dei futuri candidati riproduttori che, in un qualche modo, sono stati preselezionati già prima di nascere.

Come già detto, in tutte le razze, con l'eccezione della Charolais per i citati motivi sanitari, le ANA raccolgono i vitelli candidati ad essere impiegati nella inseminazione strumentale e li testano in un Centro genetico tramite prova di performance.

In tabella 4 sono riassunte le principali caratteristiche delle prove di performance effettuate in Italia sulle razze da carne e a duplice attitudine.

Il performance test è fatto a partire da vitelli scostrati di 1-4 mesi nel caso di vitelli delle razze a duplice attitudine e della Piemontese (che in alcuni allevamenti viene ancora munta), mentre si parte da vitelli svezzati sotto la madre di 7-10 mesi nel caso delle altre razze da carne.

In tutti i casi la prova è preceduta da una quarantena sanitaria e si svolge in box multipli con molti turni successivi, generalmente mensili, durante l'anno per le razze più diffuse e destagionalizzate, con pochi turni concentrati nel periodo invernale per le razze alpine e per la Limousin e in un solo turno annuale per le due razze rustiche dell'Italia centro-meridionale.

L'alimentazione è in genere abbastanza concentrata e somministrata razionata in misura tale da permettere l'estrinsecazione del diverso potenziale di crescita degli animali, senza però correre il rischio di determinare un eccessivo ingrassamento dei candidati riproduttori o comprometterne lo stato di salute e la funzionalità ruminale, epatica, locomotoria o genitale.

Nel caso di ANABoRaPi, ANABIC e ANAPRI, il controllo giornaliero individuale dei concentrati è assicurato dall'uso degli autoalimentatori elettronici (mentre i foraggi sono distribuiti liberamente in mangiatoia). Nelle altre razze si utilizza invece un unifeed in mangiatoia senza controlli individuali. Con la prima tipologia di alimentazione l'impiego della velocità di crescita come criterio di selezione ha anche il significato di selezionare gli animali con il migliore indice di conversione dei concentrati, mentre con la seconda tipologia si favoriscono i soggetti caratterizzati da maggior capacità e/o rapidità di ingestione. Una terza tipologia alimentare è quella dei torelli delle due razze rustiche che, per un periodo, utilizzano anche il pascolo.

	TORI/ANNO N°	SELEZIONATI PER LA FA (N°)	ETÀ INIZIALE (MESI)	ETÀ FINALE (MESI)	AUTO. ALIMENTATORE	IPG FA (G/D)
Piemontese	215	33	1	11	SI	1350
Chianina	64	20	7	12	SI	1750
Marchigiana	64	20	7	12	SI	1650
Romagnola	64	20	7	12	SI	1650
Maremmiana	30	-	10	16	NO	1400
Podolica	35	-	10	16	NO	1250
Charolais	(40)	(6)	-	-	NO	-
Limousin	37	5	8	12	NO	1250
Pezzata Rossa	200	40	4	12	SI	1200
Valdostana	70	24	2	11	NO	1000
Rendena	60	24	1	11	NO	1100

Tab. 4 *Principali caratteristiche della prova di performance utilizzata per la valutazione genetica dei torelli destinati alla inseminazione strumentale*

Durante la prova di performance i torelli vengono pesati regolarmente e il test termina a 11-12 mesi, con l'eccezione delle due razze rustiche che finiscono il testaggio a 16 mesi. La velocità di crescita media realizzata dai torelli selezionati è piuttosto alta e variabile a seconda delle potenzialità della razza, del livello nutritivo, della fascia di età, delle dimensioni del box e degli altri fattori ambientali e va dal chilo al giorno dei torelli valdostani ai 1,75 kg/d dei chianini.

Alla fine del test i torelli vengono sottoposti a valutazione morfologica, specie della muscolosità e, nel caso della Rendena, anche della resa al macello stimata *in vivo*.

In tutte le razze, con l'eccezione della Limousin per la quale i dati vengono inviati all'INRA in Francia, alla fine di ciascun turno le ANA provvedono a rielaborare i dati di tutti i torelli testati fino ad allora e a stimarne il valore genetico per i singoli caratteri controllati e per l'indice di selezione adottato per ciascuna razza utilizzando il metodo BLUP *animal model*. Sulla base di tali elaborazioni vengono quindi scelti i torelli approvati per la inseminazione strumentale, quelli destinati alla monta naturale e quelli destinati alla macellazione.

I torelli approvati per la FA variano dal 15% circa della Piemontese e della Limousin al 40% della Rendena. A proposito di quest'ultima razza si deve dire che la modesta pressione di selezione realizzata alla fine del performance test è giustificata dal fatto che tutti i torelli approvati verranno impiegati sia per la FA che per la monta naturale, che non esistono altri torelli destinati

alla monta naturale e che è indispensabile, in una razza a diffusione tanto limitata, mantenere una elevata variabilità genetica. Inoltre, nel caso della Rendena, come delle altre razze a duplice attitudine, la prova di performance è una preselezione applicata per identificare i candidati riproduttori da sottoporre poi alla prova di progenie per la valutazione della produzione del latte, della morfologia e dei caratteri funzionali (tab. 3). Anche nel caso della Piemontese la prova di performance è una preselezione prima della prova di progenie finalizzata, in questo caso, alla valutazione genetica dei riproduttori per l'andamento dei parti. Nel caso delle razze rustiche, invece, non si utilizza la inseminazione strumentale e i torelli approvati vengono tutti utilizzati in monta naturale. Per le razze stalline dell'ANABIC, l'indice elaborato alla fine del performance è l'IGT del toro e non include altri caratteri per cui i torelli approvati per la FA possono essere destinati direttamente alla riproduzione senza nessun altro vincolo o passaggio. In realtà solo una frazione dei torelli approvati per queste tre razze viene effettivamente impiegato in fecondazione artificiale.

I dati dei controlli funzionali del peso dei vitelli effettuati nelle aziende non sono inclusi in nessun indice di selezione e, nei pochi casi in cui sono stati utilizzati per stimare il valore genetico dei riproduttori tramite prova di progenie per la carne, la loro utilizzazione è stata finalizzata solo ad una verifica, generalmente positiva dell'efficacia della selezione impostata sulle prove di performance (tab. 3).

La scelta fatta da tutte le associazioni italiane degli allevatori di razze bovine da carne e a duplice attitudine di favorire una valutazione genetica basata sulla prova di performance invece che sulle prove di progenie (teoricamente più accurate) è pienamente giustificata dai seguenti fattori: maggior numero di candidati valutabili e quindi maggior pressione di selezione, grande riduzione dell'età alla valutazione genetica del maschio e quindi riduzione dell'intervallo di generazione in linea paterna e sicurezza di non utilizzare dati meno precisi e genealogie non verificate. Tutto ciò porta ad un aumento teorico considerevole del progresso genetico acquisibile.

Alla fine della prova i torelli destinati alla inseminazione strumentale vengono sottoposti, presso il Centro genetico o presso il Centro tori di destinazione, all'addestramento alla monta e alla valutazione delle caratteristiche del liquido seminale prima del loro impiego effettivo.

Le verifiche dell'ereditabilità dei caratteri inclusi negli indici globali di selezione hanno fornito in genere valori in linea con le attese (tab. 5).

L'accrescimento e la muscolosità registrati nei Centri genetici hanno evidenziato una ereditabilità compresa tra il 30 ed il 50%, con l'eccezione

	IPG	MUSC.	TAGLIA	ARTI	FACILITÀ NASCITA	FACILITÀ DI PARTO	PROD. DI LATTE	ALTRO
Piemontese	60	45	-	32	8	9	-	-
Chianina	34	42	29	10	-	-	-	-
Marchigiana	29	31	29	10	-	-	-	10
Romagnola	32	22	29	10	-	-	-	-
Maremmiana	34	-	-	-	-	-	-	25
Podolica	34	-	-	-	-	-	-	25
Limousin	(28)	(30)	(30)	-	(30)	-	-	-
Pezzata Rossa	35	60	35	24	-	-	18	-
Valdostana	51	33	-	-	-	-	30	-
Rendena	40	49	-	-	-	-	31	-

Tab. 5 *Ereditabilità dei diversi caratteri inclusi negli indici di selezione delle principali razze bovine da carne e a duplice attitudine allevate in Italia*

dell'incremento di crescita giornaliero che, nella Piemontese, ha presentato una ereditabilità molto alta (60%). I dati desunti dalle valutazioni morfologiche (taglia, punteggio finale, arti) hanno presentato ereditabilità oscillanti tra il 24 ed il 35% con l'eccezione degli arti e della finezza nelle razze stalline dell'ANABIC che hanno presentato una ereditabilità del 10%. L'ereditabilità della produzione del latte è risultata del 18% nella Pezzata rossa italiana e del 30-31% nelle due razze alpine: bisogna però ricordare che tale differenza è giustificata dal fatto che nella prima si utilizza un test day model (e quindi la ereditabilità riguarda la produzione di un singolo giorno) mentre nelle seconde due razze si utilizza ancora un modello a lattazione, risultante dalla media ponderata di numerosi controlli.

I risultati raggiunti

Chianina, Marchigiana e Romagnola hanno evidenziato, da quando è attivo il Centro genetico, un sensibile miglioramento del valore genetico per la velocità di accrescimento e per la muscolosità dei torelli destinati alla FA.

I dati di tabella 6 sull'indice genetico toro, che li combina, evidenziano un miglioramento complessivo di circa due unità di deviazione standard genetica, realizzato soprattutto nell'ultimo decennio.

Pur essendo discreto, il trend genetico realizzato è inferiore al valore teoricamente ottenuto a causa di due fenomeni congiunti: i torelli avviati ai Centri tori per la FA sono solo una parte di quelli approvati, e non sempre i migliori, e il loro seme viene impiegato per troppi anni con poco ricambio del parco riproduttori. La conseguenza è che l'intervallo di generazione maschile

	CHIANINA		MARCHIGIANA		ROMAGNOLA	
	TUTTI	FA	TUTTI	FA	TUTTI	FA
1985-1989	101	102	99	100	100	105
1990-1994	106	110	102	104	101	102
1995-1999	111	116	112	116	108	115
2000-2003	121	123	117	120	113	117

Tab. 6 Valore genetico medio dei torelli di razza Chianina, Marchigiana e Romagnola testati al Centro genetico ANABIC di Perugia –San Martino in Colle (IGT espresso con base genetica pari a 100 e deviazione standard genetica pari a 10)

	CHIANINA		MARCHIGIANA		ROMAGNOLA	
	TUTTI	FA	TUTTI	FA	TUTTI	FA
Padri di toro						
1985-1989	4,9	5,0	5,0	5,6	5,4	4,7
1990-1994	4,5	4,6	4,2	4,2	4,5	4,7
1995-1999	4,4	4,5	4,3	4,3	4,6	4,9
2000-2003	5,1	5,0	4,6	4,7	6,2	6,6
Madri di toro						
1985-1989	6,3	6,3	5,9	6,0	5,6	5,8
1990-1994	6,3	6,8	5,8	6,3	6,0	6,0
1995-1999	6,6	6,5	6,1	6,4	6,5	6,4
2000-2003	6,9	6,9	6,5	6,6	6,9	7,1

Tab. 7 Intervallo di generazione medio dei padri e madri dei torelli di razza Chianina, Marchigiana e Romagnola testati al Centro genetico ANABIC di Perugia –San Martino in Colle (in anni)

si allunga, specie quello della linea “padri di toro” (tab. 7).

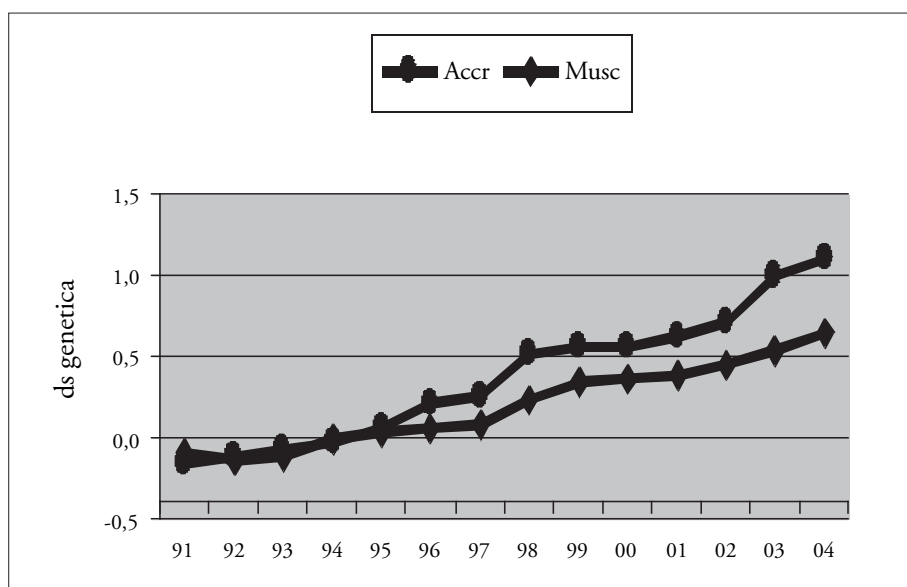
In questo modo si perde il maggior vantaggio offerto dall’impiego delle prove di performance: l’intervallo di generazione dei padri di toro è compatibile con la prova di progenie ed è più che doppio di quello acquisibile con il solo performance test.

A ciò si aggiunga che anche l’intervallo di generazione delle “madri di toro” è particolarmente lungo a causa del fatto che generalmente non si avviano al Centro genetico i vitelli nati dal primo e dal secondo parto, ma solo quelli delle vacche più mature i cui padri abbiano confermato pienamente il loro valore.

Le due razze rustiche dell’ANABIC, la Maremmana e la Podolica, non presentano, ovviamente, trend genetici significativi dato che quello adottato per queste razze non è un vero e proprio piano di miglioramento genetico ma di salvaguardia della variabilità genetica: le ridotte dimensioni delle due popolazioni, il ricorso alla monta naturale e il difficile ambiente di allevamento

CARATTERI	RG
Accrescimento giornaliero con:	
Muscolosità	-25%
Facilità di nascita	-50%
Facilità di parto	+23%
Muscolosità con:	
Facilità di nascita	-7%
Facilità di parto	-26%
Facilità di nascita con:	
Facilità di parto	-50%

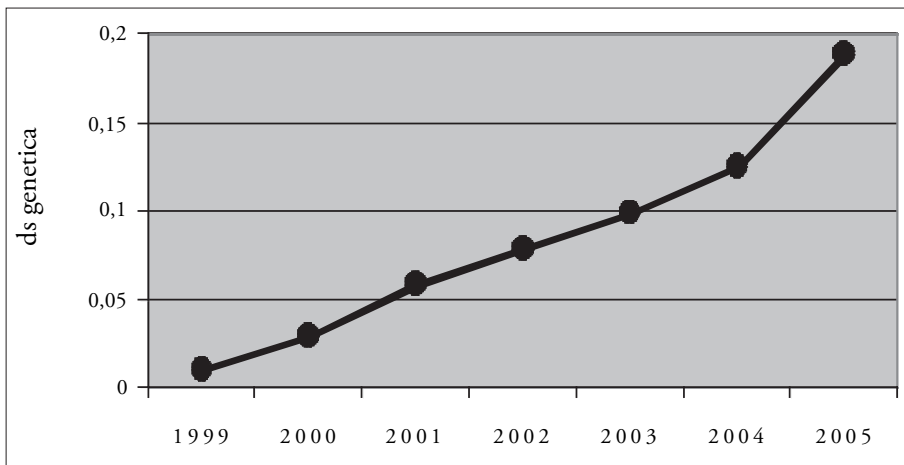
Tab. 8 *Correlazioni genetiche tra i caratteri inclusi nell'indice di selezione della razza Piemontese*



Graf. 1 *Valore genetico medio dei torelli di razza Piemontese testati presso il Centro genetico ANABORaPi di Carrù – Cuneo per la velocità di crescita e per la muscolosità (espressi in unità di deviazione standard genetica)*

fanno infatti ritenere più dannoso che utile, oltre che difficile e costoso da implementare, un programma selettivo tradizionale.

Prima di analizzare brevemente i risultati raggiunti dalla razza Piemontese, bisogna considerare che già lo studio delle difficoltà di parto evidenzia non poche difficoltà, che vengono poi aumentate ulteriormente dalla necessità di studiare e mettere assieme in un indice di selezione dati desunti da torelli in un Centro genetico e dati rilevati sulle vacche della popolazione negli alle-



Graf. 2 Valore genetico medio dei torelli di razza Piemontese testati presso il Centro genetico ANABORaPi di Carrù – Cuneo per la facilità di nascita (espressi in unità di deviazione standard genetica)

vamenti controllati. Su questi temi è stato condotto un proficuo lavoro, ad opera principalmente di Paolo Carnier e Andrea Albera (Carnier et al., 2000; Albera et al., 2001; Albera et al., 2004).

I risultati di questi lavori hanno confermato che i quattro obbiettivi di selezione della razza Piemontese presentano tra di loro correlazioni genetiche negative, con una sola eccezione (tab. 8). Questo rende particolarmente delicato lo schema di selezione e richiede grande attenzione nella fissazione dei pesi economici dei caratteri dato che, in queste condizioni, differenze anche modeste nei pesi possono portare a risultati molto differenti.

I risultati ottenuti nell'ultimo decennio per i caratteri oggetto della prova di performance sono stati lusinghieri. Come si vede dal grafico 1 si è ottenuto un aumento del valore medio dei torelli pari a oltre una deviazione standard genetica per la velocità di crescita e mezza per la muscolosità.

Il trend genetico della facilità di nascita dei vitelli, pur positivo, ha assunto una entità molto più limitata (graf. 2) mentre per la facilità di parto delle bovine si dovrà aspettare ancora qualche anno per poter stimare un trend significativo, dato che la sua valutazione richiede una prova di progenie sul parto delle figlie dei tori.

La diversa entità dei risultati ottenuti sui due gruppi di caratteri, oltre che per la elevata ereditabilità e precoce età di valutazione del primo (dati del performance test) dipende anche dal fatto che gli allevatori di Piemontesi, anche per la linea allevamento, tendono ad usare tori sempre più giovani

	IPG	MUSCOLOSITÀ PERFORMANCE	MUSCOLOSITÀ PROGENY
Muscolosità in PT	-	-	+72
Accrescimento (IPG)	-	+49	+14
Produzione di latte	-8	-10	-34
Percentuale di grasso	-3	-7	-2
Percentuale di proteina	+21	+8	+15
Arti e piedi in PT	+19	+65	+12
Arti e piedi nella VM	-33	-40	-21
Mammella	-21	-44	-28
Mungibilità	-21	-32	-19

Tab. 9 *Correlazioni genetiche tra i principali caratteri inclusi nell'indice di selezione (IDA: indice duplice attitudine) della razza Pezzata rossa italiana con la velocità di crescita e la muscolosità rilevati durante il performance test dei torelli presso il Centro genetico ANAPRI di Fiume veneto – Pordenone e la muscolosità rilevata sulle primipare tramite la valutazione morfologica*

senza aspettare la conclusione delle prove di progenie. In questo caso l'indice complessivo del toro per la parte relativa ai parti è composto da un indice pedigree che, come noto, ha una accuratezza minore.

Nel caso delle popolazioni italiane di Charolais e Limousin, i dati vengono elaborati in Francia assieme ai dati delle rispettive popolazioni francesi e non sono disponibili risultati specifici sui trend genetici realizzati in Italia.

Anche nel caso della razza Pezzata rossa italiana l'analisi dei risultati richiede qualche considerazione preventiva sulle correlazioni genetiche tra i caratteri inclusi nell'indice di selezione (tab. 9).

È necessario infatti approfondire i rapporti esistenti tra caratteri legati alla produzione del latte e quelli specifici della carne.

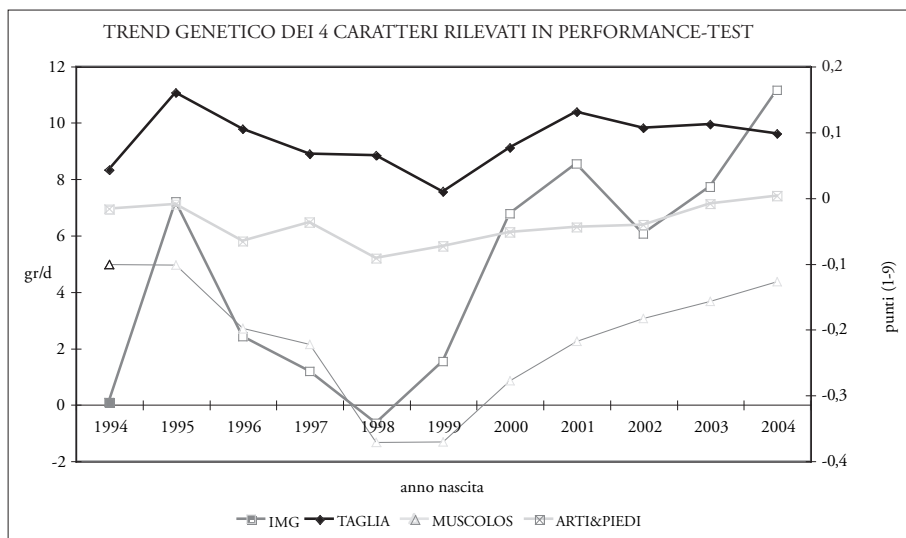
La velocità di crescita, come si può notare, presenta correlazioni tutto sommato modeste e in qualche caso controverse (come nella valutazione degli arti e dei piedi) con gli altri caratteri.

Non così la muscolosità.

Questo carattere viene infatti valutato in due momenti diversi su due sottopopolazioni differenti: nei torelli candidati alla FA alla fine della prova di performance nel centro genetico e negli allevamenti comuni sulle vacche primipare sottoposte alla valutazione morfologica.

Questi due caratteri presentano una correlazione genetica positiva ed elevata (72%), ma molto inferiore a quella massima, dimostrando così di non essere lo stesso carattere ma di rispondere, almeno in parte, a geni diversi.

Le correlazioni tra queste due valutazioni della muscolosità e tutti gli altri caratteri sono sempre dello stesso segno anche se di entità spesso molto diver-



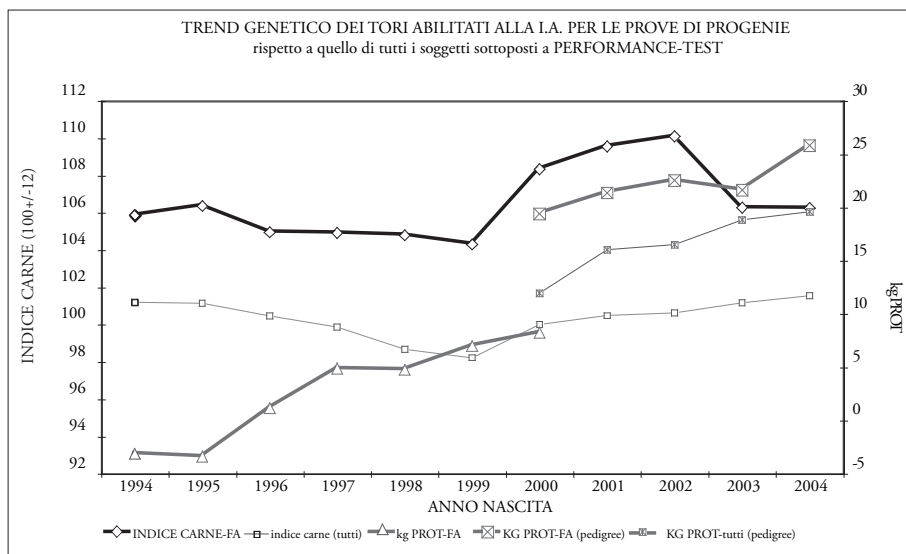
Graf. 3 Valore genetico medio dei torelli di razza Pezzata rossa italiana testati presso il Centro genetico ANAPRI di Fiume veneto – Pordenone per i 4 caratteri controllati durante la prova di performance e inclusi nell'indice di selezione (espressi in unità di deviazione standard genetica)

sa. La correlazione più importante è, ovviamente, quella con la produzione di latte. Come si può vedere, nelle vacche la correlazione genetica è negativa (32%). Ciò viene spesso interpretato come una impossibilità, o almeno una difficoltà, di selezionare contemporaneamente per queste due caratteristiche.

In realtà la correlazione osservata nei torelli in prova di performance è molto modesta. È evidente, quindi, che mentre negli animali che non producono latte le due attitudini appaiono geneticamente compatibili, nelle bovine in lattazione l'alto valore genetico per il latte si associa ad una muscolosità ridotta. Ciò è però il frutto del forte fabbisogno energetico delle vacche in lattazione che le porta ad utilizzare pesantemente anche le riserve corporee. Nelle razze a duplice attitudine, molto più che in quelle specializzate da latte, infatti, oltre alla utilizzazione delle riserve adipose, le bovine ricorrono anche alla mobilitazione delle masse muscolari che, pur apportando un contributo modesto al bilancio energetico, determinano un significativo calo di peso e un aumento dell'“angolosità” dell'animale.

È quindi possibile che da bovine poco muscolose perché nel pieno della lattazione si ottengano torelli (e verosimilmente anche manze e vacche a fine carriera) di buona muscolosità.

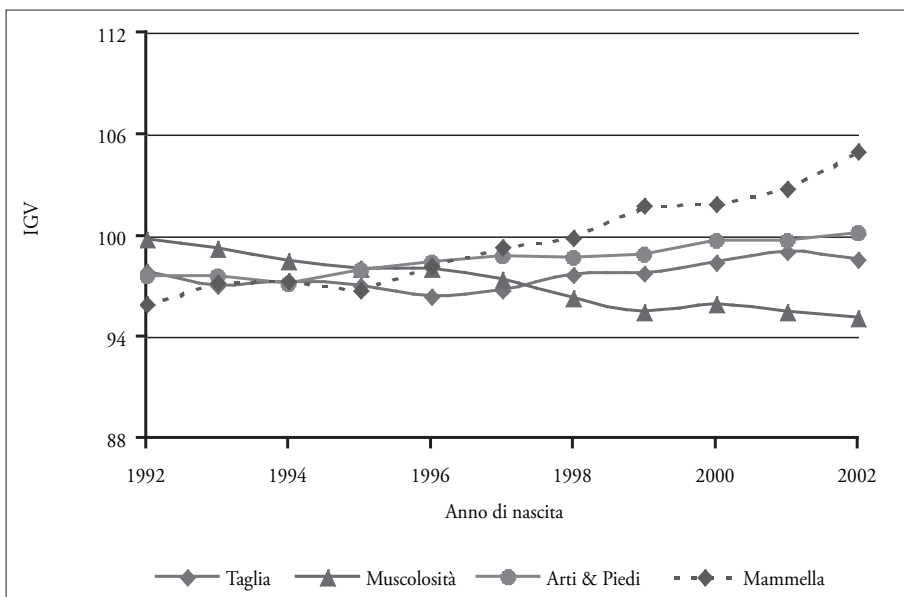
Il grafico 3 riporta il valore genetico medio dei torelli di razza Pezzata rossa testati mediante prova di performance in funzione dell'anno di nascita.



Come si può vedere il trend genetico è sostanzialmente stabile per quanto Graf. 4 Valore genetico medio dei tori e dei torelli di razza Pezzata rossa italiana impiegati nella inseminazione strumentale per l'indice carne e per i kg di proteina per lattazione

concerne la taglia e gli arti e piedi, è tendenzialmente positivo per la velocità di crescita ed è prima negativo (fino al 1999) e poi positivo per la muscolosità in prova. Il peggioramento riscontrato alla fine del secolo scorso non è legato ad una inefficienza dello schema di selezione ma all'ampio ricorso da parte degli allevatori all'uso di seme di tori Montbeliarde che, come noto, appartengono alla razza più "lattifera" ma anche meno "carnaiola" tra tutti i ceppi di derivazione Simmental. In quel periodo, inoltre, alla fine della prova di performance i torelli venivano selezionati unicamente in base ai risultati del test per poi essere destinati, se approvati, alla prova di progenie da cui venivano scelti unicamente in base all'attitudine lattifera (selezione per soglie successive). Il risultato era che il crescente numero di mezzi sangue Montbeliarde inviati a Fiume Veneto per l'elevatissimo indice pedigree del latte venivano quasi tutti scartati a fine prova, con il risultato che gli allevatori continuavano a utilizzare seme di tori Montbeliarde puri. Successivamente si è passati a selezionare i torelli alla fine del performance test utilizzando l'IDA per cui i migliori derivati Montbeliarde venivano approvati, dato che l'ottimo indice latte poteva compensare un indice carne buono ma non ottimo. In questo modo gli allevatori hanno avuto a disposizione seme di derivati Montbeliarde con ottimo indice pedigree per il latte e un valore genetico per la carne nettamente superiore a quello dei tori francesi.

Il grafico 4 evidenzia che dall'inizio di questo secolo il trend dell'indice



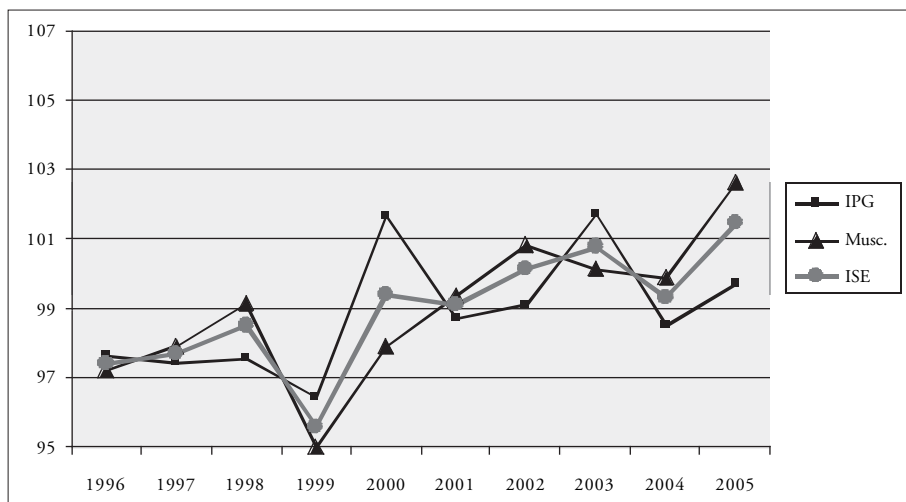
Graf. 5 Valore fenotipico medio delle primipare di razza Pezzata rossa italiana per i principali caratteri rilevati durante la valutazione morfologica

carne dei torrelli testati a ripreso un andamento positivo, pur continuando la notevole ascesa del valore genetico per la produzione del latte.

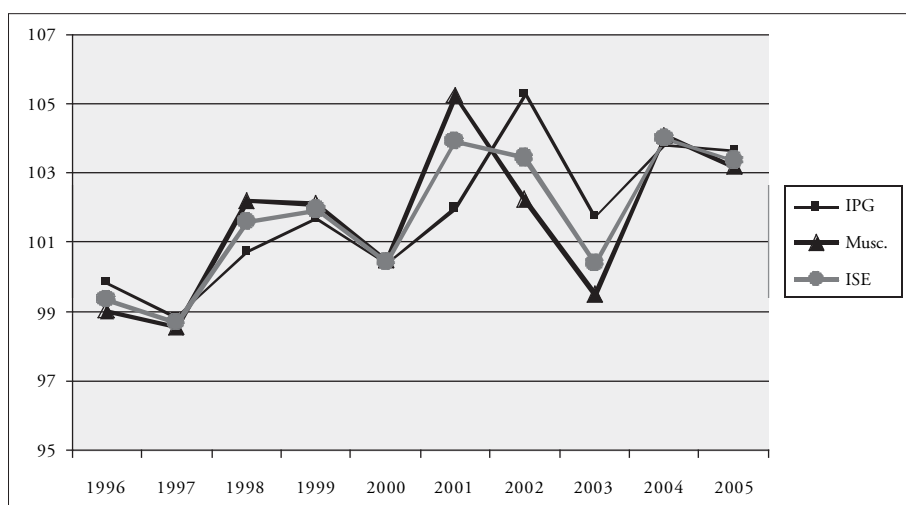
Pur essendo ancora presto veder consolidato un andamento simile nel fenotipo delle figlie di questi tori, il grafico 5 evidenzia che il continuo peggioramento della muscolosità delle vacche pezzate rosse sembra essersi arrestato per quelle nate a partire dal 2000.

Per la struttura delle correlazioni genetiche analizzate in precedenza, è tuttavia da ricordare che, in presenza di un significativo aumento della produzione di latte, un peggioramento della muscolosità delle bovine in piena lattazione è da attribuire soprattutto alla mobilitazione anche proteica a sostegno della galattogenesi e può essere recuperato a fine lattazione e non implica un peggioramento della muscolosità dei loro figli.

Anche i torrelli Valdostani pezzati rossi, alla fine della prova di performance, hanno evidenziato nel tempo una tendenza al miglioramento del loro valore genetico per la velocità di crescita e la muscolosità. L'entità di questo miglioramento è tuttavia ancora modesto per il più recente inizio dello schema di selezione, per la più modesta pressione di selezione esercitata, per il maggior ricorso ai torrelli in monta naturale e per la maggior enfasi giustamente data al mantenimento della variabilità genetica in una razza autoctona



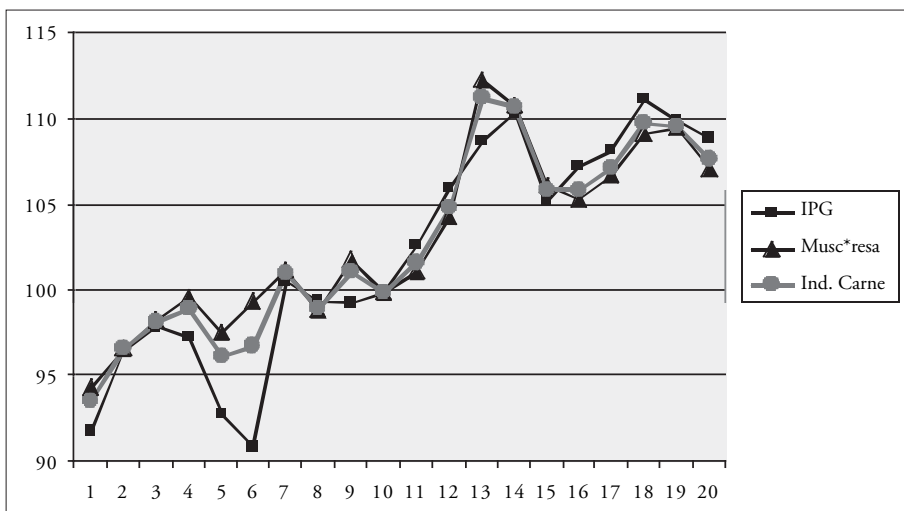
Graf. 6 Valore genetico medio dei torelli di razza Valdostana pezzata rossa testati al Centro genetico ANABoRaVa di Gressan - Aosta (IGT espresso con base genetica pari a 100 e deviazione standard genetica pari a 10)



Graf. 7 Valore genetico medio dei torelli di razza Valdostana pezzata nera e Valdostana castana testati al Centro genetico ANABoRaVa di Gressan - Aosta (IGT espresso con base genetica pari a 100 e deviazione standard genetica pari a 10)

che è presente solo nell'area di origine.

Anche nel caso dei torelli Valdostani castani e pezzati neri il trend è simile, anche se i caratteri da carne pesano di più nell'indice complessivo di selezione a causa delle dimensioni ancora minori delle due popolazioni e del ricorso



Graf. 8 Valore genetico medio dei torelli di razza Rendena testati al Centro genetico ANARE di Bassano del Grappa – Vicenza (IGT espresso con base genetica pari a 100 e deviazione standard genetica pari a 10)

ancora più elevato alla FA (graf. 7).

Nel caso della Rendena, invece, il trend di miglioramento è nettamente superiore a quello delle altre razze a duplice attitudine e si avvicina a quello delle razze specializzate da carne (graf. 8).

Le ragioni di tale eccellente risultato sono nella specificità dello schema di selezione di questa razza autoctona.

Pur essendo la più piccola tra le popolazioni bovine dotate di libro genealogico, la Rendena è la razza con la più alta pressione di selezione relativa testando in media un torello all'anno ogni 60 vacche presenti. La Rendena, inoltre, pur avviando alle prove di progenie per il latte il miglior 40% dei torelli testati, non aspetta l'esito di tali prove per selezionare i migliori tori come padri di vacche e come padri di tori, ma impiega direttamente e subito tutti i torelli selezionati come padri di vacche e contemporaneamente circa metà degli stessi anche come padri di tori tramite gli accoppiamenti programmati delle madri di toro. In questo modo l'intervallo di generazione in linea maschile è più che dimezzato ed è addirittura inferiore a quello delle razze specializzate da carne. Il ruolo delle prove di progenie non è quindi quello di strumento di selezione dei tori da usare ma quello di aumento dell'accuratezza dell'indice pedigree dei loro figli e nipoti, che è il vero strumento di selezione della razza per l'attitudine lattifera. Anche per questi caratteri i risultati sono soddisfacenti dato che la minor accuratezza di questo indice è

compensata dalla riduzione dell'intervallo di generazione maschile.

Un ulteriore fattore di aumento dell'efficienza dello schema di selezione della Rendena è il fatto che, unica razza al mondo, fecondazione artificiale e monta naturale sono perfettamente integrate e la seconda contribuisce pienamente ai risultati ottenuti. Alla fine della prova di performance, infatti, tutti i torelli selezionati vengono sottoposti a prelievo di materiale seminale e le dosi ottenute vengono subito distribuite per le prove di progenie (madri di vacche) e per la fecondazione delle madri di toro. Il poco seme stoccato ha solo la funzione di spermoteca per futuri usi o studi o per qualche ulteriore accoppiamento programmato con madri di toro, nel caso quelli effettuati non abbiano dato un numero di candidati maschi sufficienti. Dopo il prelievo seminale, tutti i torelli selezionati, e solo loro, sono destinati contemporaneamente alla monta naturale ed i loro utilizzatori si impegnano comunque a fecondare artificialmente almeno un terzo delle vacche con il seme degli altri torelli in prova in modo da garantire la connessione genetica di tutti gli allevamenti della razza e la utilizzazione della quasi totalità delle vitelle nate nella razza in un anno per le prove di progenie.

La Rendena rende evidente come anche una piccola popolazione, teoricamente destinata ad avere risultati selettivi modesti, possa invece ottenere prestazioni di tutto rispetto, compensando i limiti strutturali con una grande efficienza organizzativa, una celerità in tutti i passaggi e una notevole disciplina e cooperazione degli allevatori.

NUOVI OBIETTIVI DI SELEZIONE

I caratteri funzionali

Tra i caratteri funzionali, solo le difficoltà di parto e di nascita nella razza Piemontese, come si è già detto, sono oggetto di valutazione genetica e forte pressione di selezione.

In realtà questo carattere dovrà essere studiato, valutato e implementato nell'indice di selezione di tutte le nostre razze da carne e a duplice attitudine, se non altro per i negativi effetti indiretti attesi dal miglioramento della muscolosità. Nel caso della Marchigiana, poi, abbiamo già citato l'aggravante della diffusione in atto della mutazione del gene della miostatina che causa la groppa doppia.

In alcune razze una selezione indiretta, con pesi molto bassi, della *fitness* degli animali è demandata, con risultati tutti da verificare, alla inclusion

CLASSE	GARRESE	SPALLA	DORSO	LOMBI	GROPPA	COSCIA	NATICA DI DIETRO	NATICA DI LATO
1	1.62	1.92	1.39	1.20	1.43	1.80	1.44	2.01
2	1.15	1.06	1.11	1.12	1.27	1.34	1.15	1.08
3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4	0.95	0.87	0.88	0.91	0.83	1.00	0.99	0.88
5	0.62	0.23	0.64	0.47	0.31	0.37	0.72	0.56

Tab. 10 *Rischio relativo di eliminazione delle bovine di razza Chianina in funzione della loro muscolosità (da classe 1: bovine molto meno muscolose della media fino a classe 5: bovine molto più muscolose della media)*

alcuni caratteri morfologici, specie gli arti e i piedi, negli indici delle vacche.

La longevità ha, nelle razze da carne e a duplice attitudine, un peso economico che, in valore assoluto, è inferiore a quello delle razze da latte (dato che il recupero monetario assicurato dalla vendita della vacca a fine carriera è decisamente maggiore mentre il costo di allevamento delle manze da rimonta è simile) ma, in misura relativa, incide altrettanto se non più, data l'entità molto più limitata degli introiti per vacca.

Un primo studio sulla longevità nelle nostre razze da carne è quello condotto da Flavio Forabosco all'ANABIC sulla Chianina in collaborazione con il gruppo della Università di Agricoltura di Wageningen nei Paesi Bassi (Forabosco et al., 2003; Forabosco et al., 2004; Forabosco et al., 2005; Forabosco et al., 2006; Forabosco et al., 2007).

In questo studio, oltre a determinare i parametri genetici della longevità si sono studiate le correlazioni con la morfologia delle manze al fine di valutare la possibilità di un indice selettivo indiretto precoce. I risultati sono molto promettenti e, in qualche caso, diversi da quanto riscontrato nelle razze da latte.

I dati di tabella 10 dimostrano come, nella Chianina, si assista a un progressivo aumento del rischio di eliminazione delle vacche a mano a mano che diminuisce la muscolosità che le caratterizzava da manze. Rischio che per la muscolosità di alcune regioni (spalla, groppa, coscia) può anche essere 5-8 volte superiore per una manza valutata 1 (minimo valore possibile) rispetto ad una valutata 5 (massimo valore possibile).

Ovviamente bisogna considerare che in zootecnia la longevità non è solo un carattere biologico, che riflette una condizione organica dell'animale, ma anche un carattere economico, che rispecchia una decisione di convenienza da parte dell'allevatore. Allevatore che, a differenza di quanto fa il suo collega che alleva vacche da latte, sicuramente preferisce mantenere il più lungo possibile le bovine più muscolose, mentre elimina alla prima occasione quelle più angolose.

CLASSE	STATURA	TRONCO LUNGHEZZA	TORACE ALTEZZA	TORACE LARGHEZZA	ILEI	ISCHI	GROPPA
1	1.49	1.15	1.09	1.66	1.14	2.57	1.03
2	1.04	1.26	1.09	1.16	1.18	1.15	1.24
3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4	0.89	0.97	0.88	0.83	0.93	0.83	0.95
5	1.00	0.83	0.40	0.67	0.69	0.52	0.99

Tab. 11 *Rischio relativo di eliminazione delle bovine di razza Chianina in funzione della loro taglia*

CLASSE	GROPPA INCLINAZ.	LINEA SUPERIORE	ARTI ANT DI FRONTE	ARTI ANT. DI LATO	ARTI POST. DI LATO	SCHELETRO	PELLE
1	1.05	0.91	0.97	N.V.	1.32	1.46	1.09
2	0.99	1.03	1.27	1.77	1.03	1.21	1.02
3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4	0.82	0.95	1.36	0.86	1.59	0.84	0.82
5	0.97	1.09	1.08	1.04	1.23	1.01	1.05

Tab. 12 *Rischio relativo di eliminazione delle bovine di razza Chianina in funzione della loro correttezza morfologica*

In tabella 11 sono invece riportate le relazioni tra longevità e caratteri dimensionali.

Come si può vedere i trend sono favorevoli alle bovine di maggiori dimensioni anche se l'entità della variazione del rischio, e quindi il significato economico del carattere, è molto inferiore a quella della muscolosità.

Fanno eccezione i forti aumenti del rischio della classe estrema della statura, della larghezza del torace e degli ischi. Ai fini dell'interpretazione dei dati bisogna però tener conto che le due classi estreme sono caratterizzate da numerosità di animali molto basse e quindi la significatività dei coefficienti di rischio ottenuti è modesta. Inoltre, ai fini della valutazione della possibilità offerta dalla selezione è opportuno considerare gli spostamenti dalla classe centrale (media di popolazione) verso le due classi contermini dato che la selezione non può che determinare, sulla popolazione, spostamenti limitati in una direzione o nella direzione opposta.

Infine, in tabella 12, possiamo esaminare le relazioni tra correttezza morfologica della manza e il suo rischio di eliminazione da vacca.

Come si vede, l'inclinazione della groppa, la linea superiore e lo spessore della pelle, contrariamente alle attese di molti allevatori, non sembrano influenzare significativamente il rischio di eliminazione delle vacche. Per quanto concerne arti e piedi si osserva in genere un *optimum* intermedio e, escludendo le due classi estreme, si notano aumenti sensibili dei rischi di eli-

minazioni solo per le manze stangate e mancine. Infine, per lo scheletro, un apprezzabile aumento del rischio di eliminazione si verifica solo per le manze sotto o molto sotto la media.

La possibile utilizzazione della valutazione morfologica ai fini di una selezione per la longevità dovrà essere riverificata ed estesa alle altre razze e appare molto promettente.

Un carattere funzionale ancora più importante, ma ancora più difficile da selezionare è la fertilità, e ciò per due fattori, la bassa ereditabilità e la scarsa affidabilità delle registrazioni delle fecondazioni. Le possibilità di implementazione di un miglioramento genetico, o almeno un non peggioramento, di questo importante carattere risiedono quindi solo su una selezione indiretta e il carattere più importante, a questi fini, è dato dalle condizioni corporee della bovina, almeno per quanto risulta dagli studi condotti sulle vacche da latte.

La qualità della carne

Un altro obbiettivo di selezione fondamentale per le nostre razze da carne e a duplice attitudine sarà il miglioramento, o almeno il non peggioramento, della qualità della carne.

Il primo passo è, ovviamente, la determinazione di parametri affidabili di ereditabilità e correlazioni genetiche dei e tra i caratteri relativi, al fine di identificare il possibile ruolo della genetica in questo campo.

Il passo successivo è dato dallo studio delle correlazioni genetiche tra i caratteri della qualità della carne e quelli inclusi nell'indice di selezione delle diverse razze. È evidente infatti che in caso di correlazioni favorevoli non risulterebbe necessario implementare alcuno schema di selezione specifico dato che quello attualmente in vigore determinerebbe già un miglioramento genetico indiretto anche della qualità della carne.

Se le correlazioni fossero tendenzialmente nulle, la decisione sull'attivazione o meno di un programma di valutazione e selezione per i caratteri qualitativi sarebbe sostanzialmente condizionata dal suo rapporto costi:ricavi, includendo tra i costi, non solo quelli diretti per i controlli funzionali e le elaborazioni dei valori genetici per i nuovi caratteri, ma anche quelli indiretti di un rallentamento della selezione per i caratteri oggi inclusi negli indici di selezione a causa dalla verosimile diminuzione della pressione di selezione sugli stessi e l'eventuale allungamento degli intervalli di generazione.

Se, infine, le correlazioni dovessero risultare sfavorevoli, è evidente che sarebbe essenziale cercare di contrastare l'inevitabile trend verso il peggiora-

FINANZIAMENTO E ORGANIZZAZIONE:	
Finanziamento	MIPAF
Organizzazione	ANABoRaPi
Coordinamento scientifico	DSA-Padova
CAMPIONI ANALIZZATI:	
Raccolta campioni	2 macelli e GDO
Numero di vitelloni campionati	1.500
Durata	2005-07
ANALISI PREVISTE:	
– pH a 1 e 8 d	
– colore	
– perdite di sgocciolamento	
– perdite di cottura	
– tenerezza	
– collagene	
– colesterolo	
– estrazione del DNA	

Tab. 13 *Caratteristiche della sperimentazione in atto su vitelloni di razza Piemontese per lo studio del determinismo genetico della qualità della carne*

mento qualitativo delle carni, pena la perdita nel medio periodo di elementi importantissimi di tipicità e desiderabilità da parte dei consumatori e, in definitiva, l'uscita dal mercato dei nostri produttori.

Una prima importante ricerca è in fase di realizzazione sulla razza Piemontese ad opera del Dipartimento di Scienze animali dell'Università di Padova (tab. 13).

I primi risultati parziali sembrano essere molto incoraggianti.

È da notare anche che tale sperimentazione è collegata ad un'altra che prevede l'estrazione del DNA dei soggetti analizzati per la ricerca di alcuni geni candidati, oltre che per la verifica delle genealogie degli animali.

NUOVI METODI DI SELEZIONE

La selezione vincolata alla biodiversità

Le crescenti preoccupazioni per l'aumento dell'imparentamento medio nella popolazione e la conseguente difficoltà di mantenere basso il coefficiente di consanguineità e la crescente consapevolezza del valore del mantenimento della biodiversità, specie in relazione alle razze autoctone a diffusione limitata, stimolano la ricerca di schemi di selezione che tengono conto anche della

variabilità genetica della popolazione.

Se le tecniche BLUP *animal model* sono le principali responsabili di una accelerazione dell'imparentamento tra gli animali, l'inserimento negli indici di selezione di nuovi caratteri, specie se poco correlati tra loro o, addirittura, se correlati negativamente, favorisce il permanere ai vertici delle graduatorie di merito individui appartenenti a famiglie diverse, caratterizzate da combinazioni di pregi e difetti molto diversi tra di loro, ma che ugualmente possono raggiungere elevati valori economici.

Anche l'impiego della prova di performance è molto più favorevole delle prove di progenie ai fini del mantenimento della variabilità genetica dato che si privilegia l'alto numero di candidati riproduttori testati (appartenenti quindi a più famiglie) rispetto alla elevata accuratezza su pochi tori.

I passi successivi sono le implementazioni di schemi di selezione vincolati al mantenimento di un determinato livello di consanguineità medio prefissato o a un suo aumento a un tasso massimo predeterminato.

La morfologia e i pesi economici

La morfologia degli animali non si vende (a parte qualche allevatore che produce animali da mostra) e non si compra e non incide direttamente se non in misura trascurabile sul risultato economico dell'allevamento.

La morfologia è però sempre stata usata come strumento di selezione indiretto di altre caratteristiche non direttamente misurabili sull'animale vivo (conformazione della carcassa), non valutabili sugli animali giovani (longevità), che non dispongono di registrazioni accurate (fertilità, difficoltà di parto) o che non sono identificate con caratteri facilmente misurabili (rusticità, adattabilità all'ambiente, frugalità, ecc.). Recentemente la morfologia è stata oggetto di numerosi studi e, tra questi, spiccano quelli condotto presso l'Università di Perugia.

Alcune relazioni tra morfologia e caratteri produttivi e funzionali sono state a volte confermate scientificamente (muscolosità, longevità funzionale, ecc.), altre sono state smentite (difficoltà di parto, adattabilità all'ambiente, ecc.) o sono in fase di valutazione (condizione corporea e fertilità). In ogni caso si comincia a disporre di alcune correlazioni genetiche tra caratteri morfologici e caratteri produttivi (ricavi) o funzionali (costi).

Una prima significativa questione è quella posta dalla necessità di condensare le informazioni contenute in decine di caratteri morfologici diversi,

spesso molto correlati tra loro, in un numero di caratteri molto più limitato e più indipendenti. Un approccio originale a queste problematiche è quello condotto presso il Dipartimento di Scienze animali dell'Università di Padova, principalmente ad opera di Roberto Mantovani (Mantovani et al., 2005; Forabosco et al., 2005; Mantovani et al., 2006) con l'analisi delle componenti principali.

È evidente che, ai fini della definizione di indici globali di selezione sempre più efficaci, si apre poi un delicato capitolo sulla necessità di quantificare il peso economico dei caratteri obiettivo della selezione e di quelli (morfologia) potenziali strumenti della stessa.

Un primo gruppo significativo di studi in questo campo è quello portato avanti da Andrea Albera sulla Piemontese (Albera et al., 2004), ma il tema dovrà essere ulteriormente approfondito ed esteso alle altre razze e sistemi di allevamento.

MAS, GAS e qualità della carne

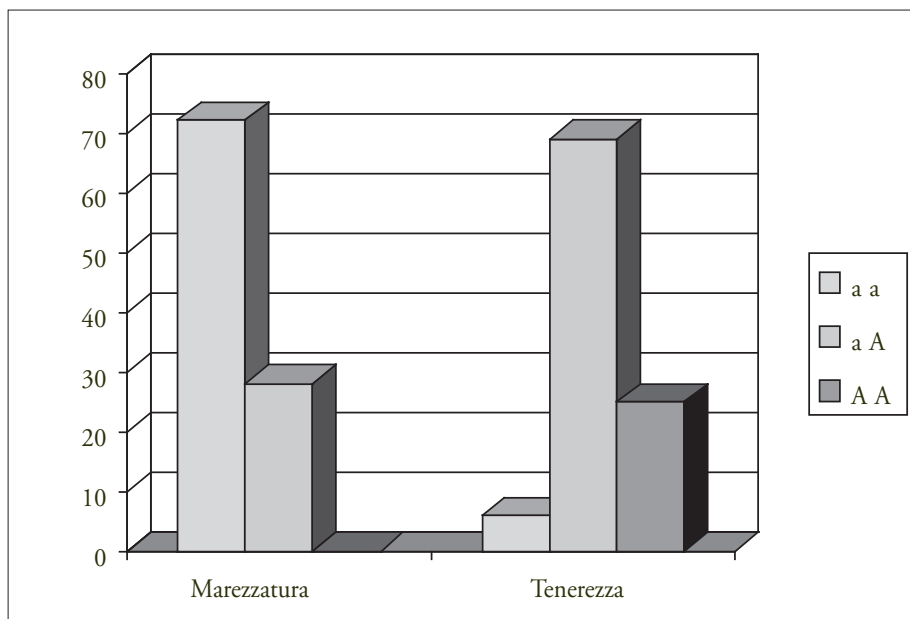
Il campo di ricerca e di applicazione che tende ad integrare i principi ed i metodi della genetica quantitativa, sulla quale sono basati tutti gli schemi di selezione e la valutazione genetica dei riproduttori delle nostre razze, con le informazioni, ormai disponibili in quantità crescenti, fornite dalla genetica molecolare è molto vasto ed i numerosissimi studi condotti nel mondo hanno portato a definire schemi e tecniche di selezione assistita da marcatori (*MAS: Marker assisted selection*) e da geni (*GAS: Gene assisted selection*).

MAS e GAS, pur non avendo pienamente soddisfatto le attese, cominciano ad essere utilizzate a livello operativo, soprattutto nella selezione dei monogastrici ad opera di compagnie multinazionali.

L'argomento è oggetto di specifiche relazioni per cui non ci resta che ribadire da un lato l'importanza che queste tecniche vengano studiate ed approfondite anche sulle nostre razze e dall'altra che le eventuali applicazioni siano ben calibrate e valutate per evitare di ottenere alla fine una riduzione del progresso genetico complessivo della popolazione, invece che un aumento.

È da rilevare che un campo potenzialmente importante per queste tecniche e ancora poco esplorato a livello scientifico è quello della qualità della carne che riveste, come abbiamo detto, una importanza particolare per le razze bovine da carne del nostro Paese.

Un primo esempio delle attività possibili in questo campo è dato dal monitoraggio avviato dall'ANAPRI relativo al locus recentemente identificato



Graf. 9 *Frequenza genotipica di un campione di tori di razza Pezzata rossa italiana per due geni maggiori interessanti la marezzatura e la tenerezza della carne (allele a: poco marezzata / poco tenera, allele A: molto marezzata / molto tenera)*

che influenza la marezzatura delle carni e a quello relativo alla tenerezza.

Come si può vedere dal grafico 9, la Pezzata rossa italiana presenta variabilità genetica per entrambi i caratteri. Nel caso del gene relativo alla marezzatura, questo campione di torelli ha evidenziato una netta prevalenza dei soggetti omozigoti a basso contenuto di grasso di marezzatura, il che va nella direzione richiesta dal nostro mercato, ma comunque oltre un quarto dei soggetti è risultato eterozigote portatore dell'allele delle carni marezzate.

Circa il gene che influenza la tenerezza della carne i dati evidenziano una altissima percentuale di soggetti eterozigoti e, tra quelli omozigoti, una prevalenza di quelli responsabili di un aumento della tenerezza rispetto a quelli con un effetto sfavorevole.

È evidente che si apre la necessità, da un lato di testare tutte le nostre razze e dall'altro di verificare l'effetto di questi geni sulle manifestazioni fenotipiche dei nostri animali, in modo da poter poi pensare ad un eventuale inserimento di questi caratteri nello schema di selezione con cognizione di causa.

OLTRE LA SELEZIONE

Tracciabilità e sicurezza

La ricerca nel campo della genetica ha aperto in questi ultimi anni nuove strade in settori diversi da quelli della selezione, che la tecnologia sempre più avanzata rende praticabili anche a livello operativo.

Uno dei campi più importanti e promettenti è quello della tracciabilità e rintracciabilità delle produzioni animali lungo la filiera e, intimamente legato a questo, quello della sicurezza alimentare.

Altre relazioni affrontano più in dettaglio questo tema per cui in questa sede ricorderemo solo la funzione di apripista, con le ricerche sulla possibilità di identificazione della razza dell'animale a partire da un campione di carne, che ha avuto il gruppo di Pisa (Vainman et al., 1992; Kaukinen et al., 1994; Ciampolini et al., 1994; Ciampolini e Cianci, 1994; Ciampolini et al., 1995; Ciampolini et al., 1996; Ciampolini et al., 2000).

Ruolo dell'incrocio

Nel campo della produzione di carne bovina in Italia l'incrocio è sempre stato studiato e impiegato per il miglioramento della produzione di carne da parte di vacche da latte o di razze rustiche tramite l'incrocio di prima generazione con tori di razze specializzate da carne.

Questa tecnica riproduttiva risponde pienamente a questo scopo, a parte la necessità di tenere sotto controllo le difficoltà di parto, ma la sua importanza nel quadro produttivo nazionale, e anche estero, sta continuamente calando. Ciò soprattutto per il peggioramento dell'efficienza riproduttiva delle vacche da latte (fertilità, longevità) conseguente all'aumento delle potenzialità produttive lattifere che comporta ormai la necessità nella larga maggioranza delle aziende di destinare tutte le vacche presenti alla fecondazione in purezza per la produzione della rimonta.

Nel caso delle razze rustiche, l'incrocio di prima generazione, pur continuando ad essere fatto, ha scarso rilievo per le numerosità ridotte che caratterizzano queste razze e costituisce una minaccia alla loro sopravvivenza per l'abuso fattone da non pochi allevatori che poi, in carenza di manze da rimonta in purezza, impiegano le manze meticcie per la riproduzione con la conseguenza di perdere metà dell'eterosi diretta (anche se sfruttano quella materna), di aumentare i problemi di adattabilità e sanità degli animali e, soprattutto, di ridurre progressivamente il patrimonio bovino in purezza e "inquinarlo" con il meticciamiento.

Il paradosso dei bovini da carne è che, a causa della loro bassissima efficienza riproduttiva, il costo di produzione del neonato all'inizio del ciclo di allevamento e ingrasso è particolarmente elevato e può avvicinarsi anche al 50% del valore finale dell'animale. In queste condizioni l'eterosi materna, specie nelle aree marginali e nelle condizioni più difficili di allevamento, ha la potenzialità di migliorare nettamente l'efficienza riproduttiva delle bovine e di aumentare quindi i loro margini di redditività. Ma proprio la bassa efficienza riproduttiva della specie impone di riservare all'incrocio di seconda generazione un numero molto limitato di fattrici che, di fatto, ne riduce fortemente le potenzialità e ne impedisce la diffusione.

A titolo di esempio basta considerare il ruolo ormai dominante, se non esclusivo, che l'incrocio di seconda generazione ha nelle specie monogastriche, anche se in queste specie l'incidenza del costo dei neonati sul valore finale dell'animale da macello è nettamente inferiore e, quindi, nettamente inferiore è il contributo economico che l'eterosi materna assicura ai bilanci dell'impresa.

Nei bovini da latte l'efficienza riproduttiva è mediamente ancora più bassa di quella dei bovini da carne ma, in questa categoria di animali, il mantenimento delle fattrici è ammortizzato dalla produzione del latte e il valore del vitello maschio non è legato ai costi di produzione ma è in relazione alla redditività, modesta, del suo sfruttamento per la produzione della carne e può arrivare, in certe condizioni (ad esempio per i vitelli Jersey) a sfiorare lo zero. Ciononostante, proprio nelle vacche da latte assistiamo ad un altro paradosso, e cioè che proprio la bassissima efficienza riproduttiva impone un rinnovato interesse per l'impiego di manze meticcie, sia a livello di ricerca che a livello operativo. Questo interesse non è, ovviamente, riconducibile all'obiettivo di ridurre i costi di produzione dei vitelli maschi per la produzione della carne, ma di aumentare il numero di vitelle da destinare alla rimonta, senza le quali la sopravvivenza stessa dell'allevamento da latte è minacciata.

È ovvio che un ricorso massiccio ad un incrocio terminale di seconda generazione non è sostenibile, proprio per la bassa efficienza riproduttiva e l'alta quota di rimonta. L'obiettivo in questo caso è infatti quello dell'incrocio alternato fra due razze o dell'incrocio a rotazione fra tre o più razze. In questo modo tutte le bovine possono essere meticcie e la gestione aziendale è molto semplificata, anche se si deve rinunciare ad un terzo dell'eterosi nel primo caso e ad un settimo o meno nel secondo.

D'altra parte, se ora nei bovini da latte l'incrocio alternato o a rotazione si sta diffondendo, specie negli Stati Uniti, in quelli da carne allevati allo stato

brado fuori dall'Europa è piuttosto diffuso da decenni.

Questa tecnica riproduttiva è avversata dalle nostre Associazioni nazionali di razza, che temono una forte riduzione della popolazione in purezza (che a questo punto diventa un nucleo di selezione per la produzione dei torelli da riproduzione) e una riduzione dell'efficienza dello schema di selezione. In realtà, proprio l'incrocio valorizza e rende ancora più importante la selezione e l'ottenimento di riproduttori puri di elevato valore genetico e potrebbero rappresentare una carta importante per la valorizzazione delle nostre razze da carne e rustiche e per il presidio delle aree marginali del Paese.

L'uso di biotecnologie riproduttive

Due sono le tecnologie riproduttive che possono rivoluzionare la produzione della carne: l'aumento della prolificità e il sessaggio del seme.

Riassunto 1: Ricerca sull'aumento della gemellarità nei bovini da carne

Echternkamp, S.E., Thallman, R.M., Kappes, S.M., Gregory, K.E. *Increased Twinning And Cow Productivity In Beef Cattle Selected For Ovulation And Twinning Rate*. Proceedings Of **7th World Congress Of Genetics Applied In Livestock Production**. 2002. Session 08, Reproduction. Cd-Rom Communication No. 08-12

Since 1981, cattle have been selected for fraternal twin births using estimated breeding values for twinning calculated from repeated measurements of ovulation rate in all heifer progeny starting at about 12 months of age, from twinning rate in the selected females, and from progeny testing and subsequent assortive mating of progeny proven sires. Twinning rate increased from 4% in 1984 to 52% in 2001, an increase of 3% per year, as a result of an increase in the frequency of twin and triplet ovulations. Although a twin/multiple ovulation is the first and limiting prerequisite for multiple births in cattle, fetal mortality was increased ($P < 0.01$) with twin and, especially, triplet fetuses. Single-born calves were heavier ($P < 0.01$) than twin or triplet calves at birth (48.7 ± 0.3 , vs 37.6 ± 0.3 or 30.5 ± 1.3 kg, respectively) and at 200 days of age (256.9 ± 1.4 vs 222.4 ± 1.4 or 210.6 ± 7.0 kg, respectively). Perinatal survival differed ($P < 0.01$) among the three birth groups (94.0 ± 0.6 , 86.0 ± 0.6 and $73.6 \pm 2.6\%$, respectively), but mortality rate postnatally was similar among the three birth groups. Twin and triplet births increased ($P < 0.01$) cow productivity (total weaning weight / cow calving) at weaning 55.6 and 71.3%, respectively, compare with a single birth.

Nel riassunto 1 è riportato l'abstract di una relazione riassuntiva del ventennale lavoro di selezione compiuto negli Stati Uniti presso lo U.S. M.A.R.C. di Clay Center (Nebraska). I risultati strabilianti ottenuti senza trattamenti ormonali, ma con la sola selezione (52% di gemelli in 17 anni) sono ricon-

ducibili a due fattori. Il primo è di aver costituito all'inizio un popolazione sintetica ricorrendo all'importazione di animali, embrioni e seme da linee che avevano evidenziato una prolificità superiore alla media da diversi Paesi del mondo, aumentando così la variabilità genetica del carattere. Il secondo è di aver selezionato i tori sulla base del tasso di ovulazione dei primi calori delle loro figlie (la cui inseminazione veniva un po' ritardata) controllati ecograficamente, in questo modo si è potuto disporre di fenotipi ripetuti e attendibili a un'età giovanile e quindi di una ereditabilità un po' più alta, di una valutazione genetica più precoce ed attendibile e di un intervallo di generazione maschile decisamente più ridotto.

Tra i paradossi della genetica, uno è costituito dal fatto che questa importante ricerca è stata condotta in un Paese, gli Stati Uniti, che, allevando le vacche da carne allo stato brado in condizioni estensive, non si prestano alla valorizzazione dei risultati di questa ricerca dato che l'aumento della gemellarità aumenta le difficoltà di parto e impone una assistenza umana praticamente impraticabile in quelle condizioni. L'Europa, ed in particolare l'Italia, con un allevamenti molto più piccoli, più intensivi, in buona parte stallini o semibradi e con una assistenza ai parti spesso assicurata si presta molto meglio alla valorizzazione di questo tipo di tecnologia.

L'altra tecnologia potenzialmente molto impattante è quella del sessaggio del seme.

Questa tecnica sta uscendo dai laboratori per essere impiegata a livello operativo nel caso delle vacche da latte, ovviamente per produrre più vitelle femmine da destinare alla rimonta.

Riassunto 2: Sessaggio del seme di tori di razza Frisona

Marcomin D., Cassandro M., Bittante G., *Fertility and purity of sexed semen on dairy cows in field conditions* (2005) **Tesi di dottorato di ricerca in Gestione, conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche animali**, Agripolis, Legnaro, Padova

The first analysis, based on **1492 inseminations on virgin heifers in 100 herds, has given a fertility rate of 43.10% with 86.19% of females at birth**. A logistic regression analysis based on this dataset was aimed to study the differences in terms of fertility and purity among the four bulls with available sexed semen (Shaker, Knightingale, Principal, and Courier). This analysis has allowed to estimate that Shaker was the bull which has got the best results in terms of average fertility (52.03%) and of purity (92.41%). On the contrary, using the sexed semen of the bull Knightingale the risk of having a male at birth or not having a pregnant heifer is statistically higher than using Shaker (36,4% pregnant and 80% females).

Come si può vedere dal riassunto 2, che riporta i dati di una ricerca con-

dotta presso il Dipartimento di Scienze animali dell'Università di Padova su circa 1500 vacche da latte, questa tecnologia sta già fornendo risultati di notevole interesse a livello operativo.

La tecnica messa a punto per produrre il seme sessato femminile di tori di razze da latte potrebbe essere utilizzata, con i necessari accorgimenti, anche per la produzione di seme sessato maschile di tori da carne.

L'unico limite, per ora, sembra essere il costo, che è ancora piuttosto elevato e non facilmente ammortizzabile nella produzione di un vitello da carne.

Il sessaggio del seme, tra l'altro, renderebbe applicabile anche alla specie bovina un incrocio terminale di seconda generazione, come avevamo ipotizzato diversi anni fa (Bittante, Gallo, 1990a; Bittante, Gallo, 1990b).

CONCLUSIONI

Questa carrellata, necessariamente poco approfondita e incompleta, ha permesso di sintetizzare e comparare la situazione della selezione delle razze da carne, rustiche e a duplice attitudine allevate in Italia per la produzione della carne.

La velocità di crescita e la muscolosità sono oggetto di una selezione abbastanza intensa ed efficace in quasi tutte le razze, sfruttando le potenzialità delle prove di performance e la disponibilità di idonei Centri genetici e di Uffici ricerca e sviluppo ben dotati dal punto di vista delle competenze umane e delle attrezzature. Più che puntare ad affinare ulteriormente i metodi di valutazione e le procedure di calcolo, si deve avere l'obiettivo di rendere più efficace lo schema di selezione con una distribuzione più rapida e mirata del seme dei migliori tori per un miglioramento della pressione di selezione e per la riduzione dell'intervallo di generazione.

La morfologia è ancora utilizzata poco e in maniera prevalentemente tradizionale e i caratteri funzionali, con l'eccezione dell'andamento dei parti nella Piemontese, non sono ancora oggetto di specifici programmi di selezione, ma solo di studi e ricerche. Longevità e fertilità sono i caratteri funzionali di maggior impatto economico e che, quindi, devono essere oggetto prioritario di studi e di implementazione di idonei programmi selettivi.

Il miglioramento della qualità della carne costituisce poi un argomento che, pur non avendo ancora strumenti di misurazione e classificazione a livello operativo tali da assicurarne un rilevante apprezzamento di mercato, ha una importanza strategica evidente in termini di immagine del prodotto e fidelizzazione del consumatore finale.

La qualità della carne costituisce inoltre una sfida ideale per la ricerca italiana per l'integrazione delle tecniche tipiche della genetica quantitativa con i risultati e le informazioni della genetica molecolare.

Sempre più importante sarà tuttavia garantire, con qualsiasi schema di selezione, il mantenimento della biodiversità assicurando un elevato livello di variabilità genetica.

Oltre la selezione, un ruolo crescente e potenzialmente importantissimo è assicurato dalla tracciabilità e dalla rintracciabilità genetica dei prodotti animali, per la tutela della sicurezza alimentare del consumatore, e dallo studio delle tecniche riproduttive legate all'incrocio alternato o a rotazione, alla selezione per la gemellarità e all'impiego del seme sessato.

Obiettivi molto ambiziosi e di forte impatto potenziale a livello operativo, che potranno essere raggiunti solo grazie ad un deciso impulso della ricerca. Impulso che può essere dato investendo di più nella sperimentazione, in modo più trasparente, con una valutazione attenta dei progetti, dei risultati e delle possibili ricadute.

È inoltre necessaria una più stretta cooperazione tra le associazioni nazionali degli allevatori delle diverse razze, tra le stesse e le imprese e loro organizzazioni che stanno a valle nella filiera produttiva e, infine, tra queste e i ricercatori delle Università e degli altri Enti di ricerca.

ABSTRACT

In the first part the author describes the situation of selection of beef and dual purpose cattle breeds in Italy. The breeds considered are: Piedmontese, Chianina, Marchigiana, Romagnola, Maremmana, Podolica, Charolais, Limousin, Italian Simmental, Valdostana and Rendena. For each breed the objectives of selection, the selection indexes for bulls and cows, the methods of genetic evaluation, the main characteristics of the performance testing, the heritability of the traits evaluated and, for Piedmontese and Italian Simmental, the genetic relationships among them are described. The genetic progress of the main traits is very good for the majority of the breeds even if the generation interval is generally too long.

In the second part new objectives (especially the functional traits and the quality traits of beef) and new methods of selection (the preservation of biodiversity, the economical weighting of type traits and the use of MAS and GAS for meat quality) are discussed.

Lastly, beyond selection, the author discusses the role of molecular genetics for traceability of beef, the use of crossbreeding, the increase of twinning rate and the results of sexed semen describing same application to Italian beef breeds.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERA A., MANTOVANI R., BITTANTE G., GROEN A.F., CARNIER P. (2001): *Genetic parameters for daily live-weight gain, live fleshiness and bone thinness in station-tested Piemontese young bulls*, «Animal Science», 72, pp. 449-456.
- ALBERA A., GROEN A.F., CARNIER P. (2004): *Genetic relationships between calving performance and beef production traits in Piemontese cattle*, «Journal of Animal Science», 82, pp. 3440-3446.
- ALBERA A., CARNIER P., GROEN A.F. (2004): *Definition of a breeding goal for the Piemontese breed. Economic values and their sensitivity to production circumstances*, «Livestock Production Science», 89, pp. 66-77.
- BITTANTE G., ANDRIGHETTO I., RAMANZIN M. (1987): *Tecniche di produzione animale*, Liviana, Padova.
- BITTANTE G., ANDRIGHETTO I., RAMANZIN M. (1990): *Fondamenti di zootecnica*, Liviana, Padova.
- BITTANTE G., GALLO L. (1990): *Impatto potenziale del trapianto embrionale, del sessaggio del seme e degli embrioni sulla produzione di latte e di carne bovina*, «Informatore Agrario», 46 (13), pp. 29-30.
- BITTANTE G., GALLO L. (1990): *Possibili schemi riproduttivi nella produzione di latte e di carne (seconda parte)*, «Informatore Agrario», 46 (13), pp. 29-30.
- CARNIER P., ALBERA A., DAL ZOTTO R., GROEN A.F., BONA M., BITTANTE G. (2000): *Genetic parameters for direct and maternal calving ability over parities in Piedmontese cattle*, «Journal of Animal Science», 78, pp. 2532-2539.
- CIAMPOLINI R., GROHS C., LEOTTA R., LEVEZIEL H., CIANCI D. (1994): *Use of microsatellites to investigate genetic diversity in four italian beef cattle breeds*, XXIV Int. Conf. Anim. Gen. Prague, 23-28 July 1994.
- CIAMPOLINI R., CIANCI D. (1994): *Metodologie genomiche per la individuazione della razza di appartenenza di un soggetto o di un suo tessuto*, Italian beef cattle contest, Perugia 16-18 settembre 1994.
- CIAMPOLINI R., MOAZAMI-GOUDARZI K., VAIMAN D., DILLMANN C., MAZZANTI E., FOULEY J.L., LEVEZIEL H., CIANCI D. (1995): *Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphism permit the analysis of the genetic variability within and between italian beef cattle breeds*, «Journal Animal Science», 73, pp. 3259-3268.
- CIAMPOLINI R., MAZZANTI E., LEVEZIEL H., GROHS C., CIANCI D. (1996): *Analysis of genetic variability within the Piemontese cattle breed using microsatellite polymorphism and research of association between individual multilocus genotypes and quantitative traits* ISAG, Congress Tours, July 1996.
- CIAMPOLINI R., LEVEZIEL H., MAZZANTI E., GROHS C., CIANCI D. (2000): *Genomic Identification of the Breed of an Individual or its Tissue*, «Meat Science Journal», 54, pp. 35-40.
- DI STASIO L., SARTORE S., ALBERA A. (2002): *Lack of association of GH1 and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piemontese cattle*, «Animal Genetics», 33, pp. 61-64.
- DI STASIO L., BRUGIAPAGLIA A., DESTEFANIS G., ALBERA A., SARTORE S. (2003): *GH1 as candidate gene for variability of meat production traits in Piemontese cattle*, «Journal of Animal Breeding and Genetics», 120, pp. 358-361.
- DI STASIO L., DESTEFANIS G., BRUGIAPAGLIA A., ALBERA A., ROLANDO A. (2005): *Polymorphism of GHR locus in cattle and relationships with meat production and quality*, «Animal Genetics», 36, pp. 138-140.
- ECHTERNKAMP S.E., THALLMAN R.M., KAPPES S.M., GREGORY K.E. (2002): *Increased Twinning And Cow Productivity In Beef Cattle Selected For Ovulation And Twinning*

- Rate, Proceedings Of 7th World Congress Of Genetics Applied In Livestock Production. Session 08, Reproduction. Cd-Rom Communication No. 08-12.
- FORABOSCO F., BOZZI R., FRANCI O., GROEN A.F. (2003): *Preliminary study on longevity in Chianina beef cattle*, Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, pp. 2-66.
- FORABOSCO F., GROEN A.F., BOZZI R., VAN ARENDONK J.A.M., FILIPPINI F., BOETTCHER P., BIJMA P. (2004): *Phenotypic relationships between longevity, type traits and production in Chianina beef cattle*, «Journal of Animal Science», 82, pp. 572-1580.
- FORABOSCO F., BOZZI R., BOETTCHER P., FILIPPINI F., BIJMA P., VAN ARENDONK J.A.M. (2005): *Relationship between profitability and type traits and derivation of economic values for reproduction and survival traits in Chianina beef cows*, «Journal of Animal Science», 83, pp. 2043-2051.
- FORABOSCO F., ROSSETTI E., SARTI F.M., PANELLA F., BITTANTE G., MANTOVANI R., FILIPPINI F. (2005): *Morphological factorials for females of the Chianina, Marchigiana and Romagnola Breeds*, Proceedings of the 4th world Italian Beef Cattle Congress, Gubbio (PG), 29th April-1st May, 2005, ANABIC, S. Martino in Colle (PG), Italy, pp. 167-168.
- FORABOSCO F., BOZZI R., FILIPPINI F., BOETTCHER P., VAN ARENDONK J.A.M., BIJMA P. (2006): *Linear model vs survival analysis for genetic evaluation of sires in Chianina beef cattle*, Livestock Production Science.
- FORABOSCO F., BOETTCHER P., BOZZI R., FILIPPINI F., BIJMA P. (in revisione): *Genetic selection strategies to improve longevity in Chianina beef cattle*, «Italian Journal of Animal Science».
- KAUKINEN J., VARVIO S.L., MARTIN P., LEVEZIEL H., GUERIN G. (1994): *A set of 99 cattle microsatellites: characterization, syntenic mapping and polymorphism*, «Mammalian Genome», 5, pp. 288-297.
- MANTOVANI R., CERCHIARO I., CONTIERO B. (2005): *Factor analysis for genetic evaluation of linear type traits in dual purpose breeds*, «Italian Journal of Animal Science», 4, suppl. 2, Proceedings of the ASPA 16th Congress, Torino, June 28-30, pp. 31-33.
- MANTOVANI R., CASSANDRO M., CONTIERO B., BITTANTE G. (2006): *The use of factor analysis for genetic evaluation of muscularity in Piemontese beef heifers*, «Italian Journal of Animal Science», in corso di pubblicazione.
- MARCOMIN D., CASSANDRO M., BITTANTE G. (2005): *Fertility and purity of sexed semen on dairy cows in field conditions*, Tesi di dottorato di ricerca in Gestione, conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche animali, Agripolis, Legnaro, Padova.
- VAIMAN D., GOUDARZI K., OSTA R., GROHS C., CIAMPOLINI R., LEVEZIEL H. (1992): *Characterization of a set of bovine (TG)n microsatellites: Allelic frequencies in French and Italian Breeds*, Animal Genetics - Proceedings of the 23th ISAG Conference, p. 64.

ALESSIO VALENTINI*, GRAZIELLA BONGIONI**, ROBERTA DAVOLI***,
BIANCA MARIA MOIOLI****, FABIO PILLA*****

Carne. Geni singoli nella selezione

Molti caratteri di importanza economica nella produzione della carne sono sotto controllo genetico. Alcuni di loro sono conosciuti e già 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 sono particolarmente necessari nella produzione della carne. La disponibilità di varianti genetiche in loci delle caratteristiche della carne aiuta anche a adattare prontamente gli obiettivi della selezione in un mercato dove consumatori e produttori/distributori richiedono cambiamenti anche molto rapidi dei prodotti.

Strategie diverse per l'identificazione di geni sono state sviluppate per dissezionare caratteri complessi. Ovvero: 1) ricerca di QTL seguita da positional cloning; 2) analisi del gene candidato seguito da validazione.

APPROCCIO QTL

La ricerca per i loci responsabili della variabilità genetica quantitativa, QTL (Quantitative Trait Loci), è stata particolarmente fruttuosa nell'identificare regioni cromosomiche statisticamente associate alle variazioni di un carattere di rilevanza economica in diverse specie domestiche (vedi ad es. tab. 1, fig. 1).

* Dipartimento di Produzioni animali, Università degli Studi della Tuscia

** Istituto Sperimentale Lazzaro Spallanzani, Roma

*** Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agro Alimentare, Università degli Studi di Bologna

**** CRA – Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Roma

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

CROMOSOMA	QTLs TROVATI
X	93
1	152
2	115
3	50
4	189
5	36
6	146
7	156
8	69
9	25
10	21
11	19
12	24
13	44
14	50
15	32
16	9
17	18
18	15

Tab. 1 *Numero di QTLs e localizzazione cromosomica in suino. Fonte: <http://www.animalgenome.org/QTLdb/>, Hu Z. et al., 2005; Hu Z. et al., 2006*

L'identificazione di QTL è fattibile studiando popolazioni ottenute da incroci sperimentali (F2 e reinkroci) o utilizzando popolazioni in selezione in linkage disequilibrium (daughter design, grand-daughter design).

Solamente alcuni casi di ricerca di QTL si sono conclusi con il posizionamento dei geni di interesse e ciò è dovuto principalmente al numero limitato di marcatori genetici disponibili sulle mappe genetiche utilizzate. Solo recentemente sono state rese di dominio pubblico mappe genetiche a maggior densità e interi genomi sono stati sequenziati.

Inoltre i limiti di confidenza delle regioni contenenti QTL sono molto grandi e si estendono per migliaia di basi, rendendo particolarmente difficoltosa e dispendiosa l'identificazione dei polimorfismi responsabili delle variazioni fenotipiche.

In più casi la conoscenza dei geni e della loro funzione in regioni di QTL è stata utile per focalizzare l'attenzione sulla regione più probabilmente causativa.

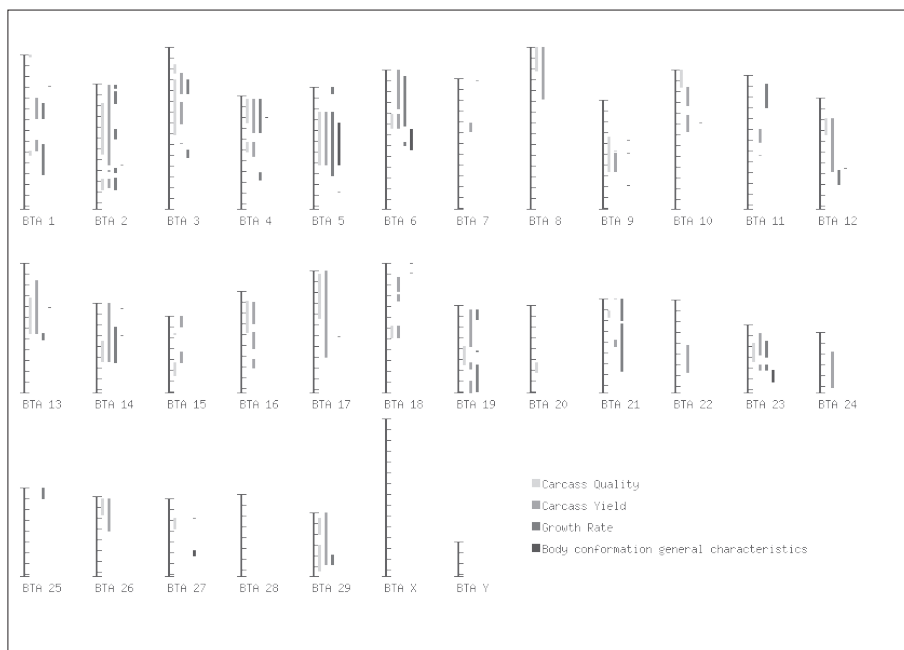


Fig. 1 QTL per caratteri della carne in bovino (*bovineqtl.tamu.edu*)

CAST

Un interessante QTL associato alla tenerezza della carne è stato mappato sul cromosoma 2 del genoma suino analizzando una popolazione ottenuta da tre incroci successivi fra suini di razza Berkshire e Yorkshire (B x Y). Lo studio di questa regione ha evidenziato la presenza di Calpastatina (CAST). La calpastatina è la proteina inibitoria naturale del sistema proteolitico CA++ dipendente, in quanto modula l'attività dell'enzima calpaina ed è considerata la principale causa dell'inizio della degradazione delle proteine miofibrillari nel muscolo in vivo, responsabili dell'intenerimento dei muscoli.

Un'analisi particolareggiata del gene CAST ha rilevato la presenza di differenti polimorfismi che modificano la proteina e che hanno effetti rilevanti sulla tenerezza della carne (Rothschild, Ciobanu, 2004). I risultati di tale ricerca sono riassunti nelle successive figura 2 e tabella 2.

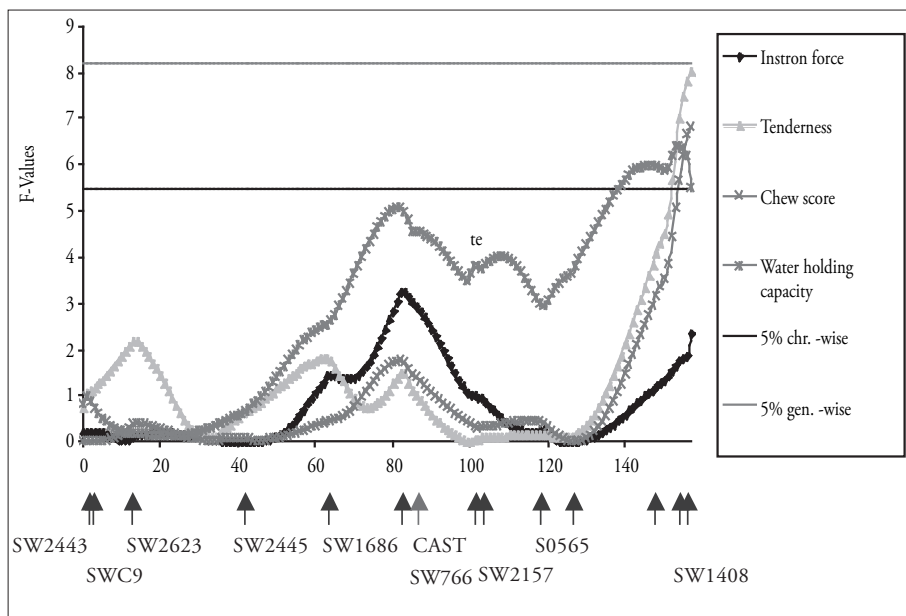


Fig. 2 Probabilità del QTL nell'intorno della posizione di mappa del CAST. Fonte: Malek et al., 2001

TRAIT ^b	HAPLOTYPE CONTRASTS ^a					
	Mean	SD	Pc	1 vs. 2	1 vs. 3	2 vs. 3
FIRMNESS SCORE	3.43	0.63	0.01	-0.23	-0.06	0.17
P				0.006	0.1	0.04
AVG INSTRON FORCE, KG	4.36	0.87	0.009	0.07	-0.14	-0.21
P				0.53	0.006	0.06
SENSORY TENDERNESS SCORE	7.85	1.15	0.17	0.04	0.14	0.1
P				0.81	0.06	0.54
SENSORY CHEWINESS SCORE	2.41	0.92	0.09	-0.1	-0.12	-0.02
P				0.42	0.03	0.87
SENSORY JUICINESS SCORE	6.03	1.47	0.04	0.16	0.22	0.06
P				0.41	0.01	0.74

Tab. 2 Parametri della qualità della carne secondo i genotipi al CAST (Ciobanu et al., 2004)

DGAT1

Grisart et al. (2002) hanno usato un approccio positional cloning identificando una sostituzione non conservativa da lisina ad alanina (K232A) nel gene DGAT1 bovino, che è stato proposto essere lo SNP causativo di un QTL influenzante la percentuale di grasso nel latte, che in precedenza era stato mappato nella regione centromerica del cromosoma 14 bovino. In seguito, usando un approccio del gene candidato, Thaller et al. (2003) hanno investigato sugli effetti dello stesso polimorfismo di DGAT1 sul contenuto grasso di *musculus m. semitendinosus* in 55 bovini (28 Holstein tedesca e 27 Charolais). Il polimorfismo lisina/alanina di DGAT1 sul contenuto di grasso ha mostrato effetti significativi in ambedue razze e l'allele tradotto in lisina ha mostrato di essere la versione più efficiente dell'enzima rispetto alla sintesi dei trigliceridi e di essere associato a un più alto contenuto di lipidi in tessuti diversi.

Nelle razze europee la frequenza del polimorfismo lisina/alanina è molto variabile: in razze varie svedesi di bovini la variante con la lisina ha una frequenza di 0.12 (Naslund et al., 2005); nella Valdostana e Piemontese è estremamente raro (0.03); nella Jersey e Holstein Friesian è 0.48 e 0.41 rispettivamente (Napolitano et al., 2006).

Molti metodi sono disponibili per scoprire il genotipo. Uno dei più potenti è il Transgenomic WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System, uno strumento versatile basato sulla cromatografia liquida denaturante ad alta pressione (DHPLC), che permette la risoluzione di frammenti di DNA sulla base della ritenzione differenziale delle eliche di DNA singole o doppie (Hecker, 2001). A una determinata temperatura la differenza nella denaturazione tra omo- ed eteroduplice è rivelata da differenze nei tempi di ritenzione. La DHPLC (Underhill et al., 1995) è usata sia per identificare nuovi polimorfismi sia per tipizzare alleli noti.

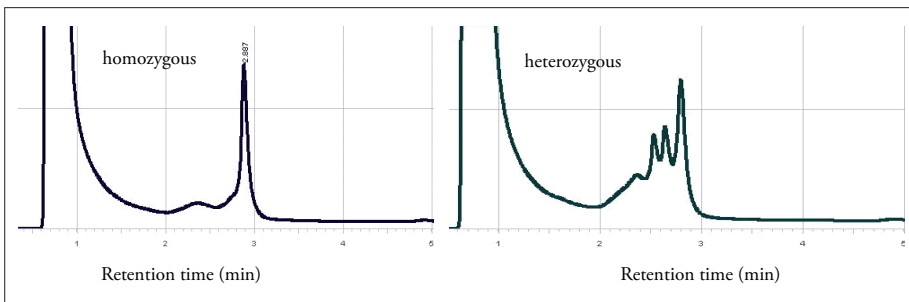


Fig. 3 Profili DHPLC per la variazione k232 allo stato omozigote e eterozigote

CLPG

Il carattere Callipyge è apparso per la prima volta in un ariete nato in Oklahoma nel 1983.

In conseguenza al suo fenotipo, fu chiamato Solid Gold e fu salvato dalla macellazione. Sebbene questo carattere detto “coscia pesante” inizialmente sembrasse una caratteristica positiva, successivamente gli allevatori vollero eliminare tale mutazione perché si evidenziò che la carne degli animali “callipygi” risultava non tenera in quanto presentava un alto contenuto di calpastatina che è un importante inibitore delle calpaine e della degradazione miofibrillare.

Due diversi studi di identificazione della mutazione di CLPG nelle pecore hanno permesso di ridefinirne la posizione del gene sul cromosoma 18 (Fahrenkrug et al., 2000; Berghams et al., 2001). Animali con eventi di ricombinazione genetica vennero utilizzati per ridurre l'intervallo della regione cromosomica candidata a circa 400 Kb, regione contenente i geni plausibilmente candidati per tale carattere, come il DLK1 (detto anche PREF-1) e il gene 3 con fenomeno di *imprinting* materno (MG3, detto anche GTL2). Le regioni omologhe del cromosoma 14 dell'uomo e del cromosoma 12 del topo sono state attentamente studiate in quanto i geni DK1 e MEG3 mappano in questa regione e sono espressi e *imprinted* rispettivamente dagli alleli materni e paterni (Schmidt et al., 2000; Takada et al., 2000; Wylie et al., 2000). Questa regione è stata completamente sequenziata in tutti quei soggetti risultati omozigoti per i marker testati e per quei soggetti eterozigoti per il gene CLPG.

In questo caso, l'ipotesi era che la mutazione era recente e questi soggetti avevano ereditato un grande blocco del cromosoma senza alcuna ricombinazione dall'insorgenza della mutazione, con l'eccezione del locus CLPG. Infine, la mutazione è stata identificata nella porzione omologa all'introne 6 di un presunto gene umano. È stato supposto che lo SNP si trovasse all'interno di una regione regolatrice. Di particolare interesse, nessuno dei geni candidati presenti nella regione era coinvolto nella determinazione del carattere Callipyge.

APPROCCIO DEL GENE CANDIDATO

Questo metodo sfrutta le informazioni raccolte da altre specie, soprattutto dall'uomo e da specie modello. In seguito, il gene è analizzato nella specie tar-

get per cercare i polimorfismi che possono essere associati con la caratteristica di interesse. Una validazione effettuata con metodi diversi e indipendenti è comunque necessaria per dimostrare che lo SNP supposto è realmente causativo.

RYR/HAL

Il gene maggiore più conosciuto e meglio descritto che interessa la qualità della carne nel suino è il gene HAL. Il gene della sensibilità all'Alotano (HAL) è associato al gene della sindrome da stress (PSS) ed è stato studiato e discusso in modo estensivo. Il difetto della carne PSE, caratterizzato da muscoli pallidi, molli ed essudativa, ha la stessa ereditarietà di PSS o del MHS (sindrome maligna di ipertermia). Gli effetti contrari della carne PSE provocano un aspetto della carne che è inaccettabile per il consumatore, abbassa il rendimento di produzione del prosciutto cotto e aumenta la perdita di salagione del prosciutto crudo. La sensibilità all'alotano interessa inoltre le caratteristiche della carcassa ed è ben documentato che suini positivi all'alotano danno carcasse più pesanti, più corte e più magre che i maiali alotano-negativi. Nel complesso il gene migliora decisamente la parte magra della carcassa, ma è di detrimento per pH, colore, perdita di gocciolamento, grasso intramuscolare e riduce la tenerezza e la succosità della carne. I maiali che sono omozigoti per l'allele recessivo di HAL (n) presentano anche la sindrome da stress (PSS) e sono soggetti alla morte improvvisa da stress. Inoltre, quelli che sopravvivono e quelli eterozigoti per il gene hanno carne pallida, soffice ed essudativa, causata dall'andamento e dall'entità di diminuzione *post mortem* del pH. È stato suggerito che fossero presenti geni collegati molto strettamente a HAL con effetto sulle caratteristiche di qualità della carne. Tuttavia i tentativi per distinguere gli effetti di HAL sulla qualità della carne determinando se siano effetti diretti o dovuti al collegamento con altri loci associati a HAL non hanno portato a individuare geni alternativi responsabili degli effetti osservati (Rothschild et al., 2004b). La mutazione che causa sia PSS che PSE ora è conosciuta ed è all'interno del recettore della rianodina (RYR1) che mappa nel cromosoma 6 (Fujii et al., 1991). L'alterazione biochimica è collegata al canale di rilascio del Ca^{2+} (gene CRC1) nel reticolo sarcoplasmatico della cellula del muscolo. Un test del DNA per l'allele difettoso (HAL1843™) è stato brevettato ed è usato ampiamente nel mondo intero. Questa prova permette il test dei suini nel normale (NN), negli individui portatori (Nn) e nei soggetti suscettibili (nn) (Russo et al., 1993). A livello mondiale, la frequenza

di questo allele difettoso è diminuita a quasi zero, benché alcune linee mantengano la variante *n* per aumentata percentuale di carne magra prodotta dai maiali eterozigoti. Il test è utilizzato inoltre dall'Associazione Nazionale degli Allevatori di Suini in Italia all'interno dello schema nazionale di selezione allo scopo di eliminare il gene responsabile della predisposizione a PSE nelle razze suine italiane.

LEP

Il gene della leptina (LEP) è l'omologo del gene murino LEP, noto anche come Obeso o Ob. LEP, e codifica una proteina composta di 146 amminoacidi ed è espresso in tessuto adiposo. Agisce come maggiore regolatore per l'assunzione del cibo e dell'omeostasi dell'energia. Difetti genetici nel gene della leptina in topo e uomo sono associati a obesità estrema e infertilità. A seguito dell'identificazione del gene della leptina con positional cloning in topi obesi (Zhang et al., 1994), sforzi considerevoli sono stati fatti per capire il suo ruolo in obesità, deposizione adiposa, assunzione di cibo e omeostasi dell'energia. La funzione della leptina è stata studiata in specie diverse e una correlazione positiva tra bilancio energetico e livelli circolatori di leptina è stata osservata (Barb et al., 2001).

Il recettore melanocortin-4 ha un ruolo chiave in concerto con la leptina nell'assunzione di cibo e regola il bilancio energetico. L'associazione significativa di mutazioni di MC4R con obesità umana è stata sostenuta tramite l'identificazione di mutazioni non-funzionali (frame-shift). Più di 30 variazioni amminoacidiche nell'uomo sono state trovate in diversi gruppi etnici nel locus MC4R e alcune di loro sono state geneticamente associate con soggetti obesi ed è stato dimostrato che in vitro provocavano danni a funzioni cellulari. Le mutazioni nel gene MC4R rappresentano la causa genetica più comune di obesità umana non-sindromica (Yeo et al., 2003; Kim et al., 2004). Perciò, leptina e recettore melanocortin-4 sono stati considerati geni candidati molto plausibili per molti caratteri economicamente importanti anche in specie di interesse zootecnico. Nel bovino molti polimorfismi LEP (fig. 4) sono stati scoperti sequenziando varie regioni del gene e il promotore, e alcuni di loro sono stati associati a deposizione del grasso nella carcassa, assunzione di cibo e caratteri di performance (Buchanan et al., 2002; Lagonigro et al., 2003; Barendse et al., 2005; Liefers et al., 2005) (fig. 5). Sette polimorfismi sono stati trovati nel gene del leptina del suino e l'analisi di associazione con caratteri della produzione ha prodotto risultati discordanti in dipendenza della

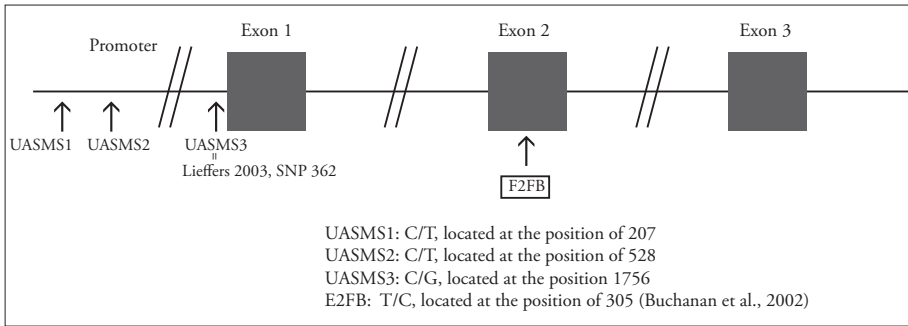


Fig. 4 Alcuni polimorfismi nel gene della leptina

popolazione sperimentale studiata (Jiang et al., 1999; Kennes et al., 2001). Ulteriori polimorfismi nel gene LEP sono oggetto di studio nella razza suina autoctona italiana Casertana (D'Andrea et al., manoscritto in preparazione). Nella specie bovina numerosi polimorfismi associati con caratteri produttivi sono stati identificati nel gene del recettore di melanocortin-4 e nel gene pro-opiomelanocortin (POMC) che è il precursore dell'ormone stimolante gli alfa-melanociti (MSH), un agonista del MC4R (Buchanan et al., 2005). Una mutazione missenso Asp298Asn nel gene suino MC4R è stata riportata associata con crescita, ingrassamento e assunzione di cibo (Kim et al., 2000; Huston et al., 2004). Tuttavia nessun effetto è stato scoperto in altre popolazioni (Park et al., 2002). Risultati promettenti in entrambi i geni sono stati ottenuti anche studiando l'espressione differenziale dei geni LEP e MC4R in Casertana e Large White, due razze suine dal fenotipo divergente (D'Andrea et al., 2005; D'Andrea et al., manoscritto in preparazione).

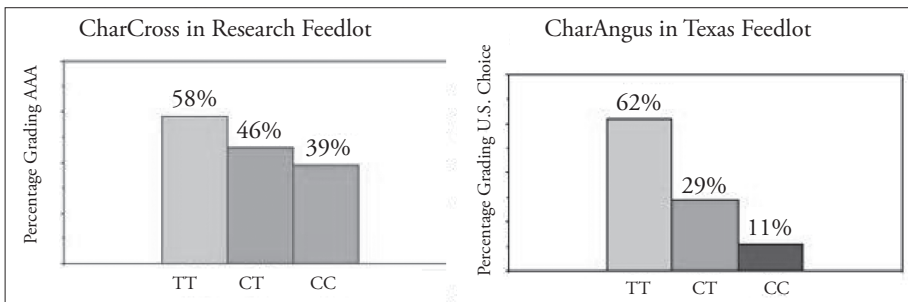


Fig. 5 Punteggio di carcasse bovine in dipendenza del genotipo E2FB in differenti incroci.
 Fonte: <http://sask.usask.ca/~schmutz/meat.html>

EFFICIENZA DELLE STRATEGIE PER L'IDENTIFICAZIONE DI GENI
NEL MIGLIORAMENTO GENETICO DELLE SPECIE DI INTERESSE ZOOTECNICO

Dagli esempi finora citati, si può dedurre che non c'è una chiara divisione tra i due approcci e quello spesso entrambi sono usati per aumentare l'efficienza dell'esperimento. Comunque, in alcuni casi strategie particolari hanno dimostrato di essere più efficienti nella identificazione dei geni causativi della variazione di caratteri economicamente importanti.

Miostatina

La "Doppia Coscia" (DC) è un carattere presente in molte razze bovine. Carcasse DC generalmente hanno una resa alla macellazione più alta, una proporzione maggiore di muscolo e una minore proporzione di grasso e osso (Arturo, 1995), rendendo questo carattere economicamente interessante.

Il carattere DC è quasi fissato in alcune razze come nella Blu Belga e nella Piemontese. Nella seconda razza Bongioni et al. (2003) hanno trovato un'alta incidenza della mutazione con solo 9 eterozigoti (5 femmine e 4 maschi) in confronto con 315 omozigoti per il gene mutato. In altre razze, come nella Marchigiana, la mutazione causativa è presente a frequenza bassa (Marchitelli et al., 2003).

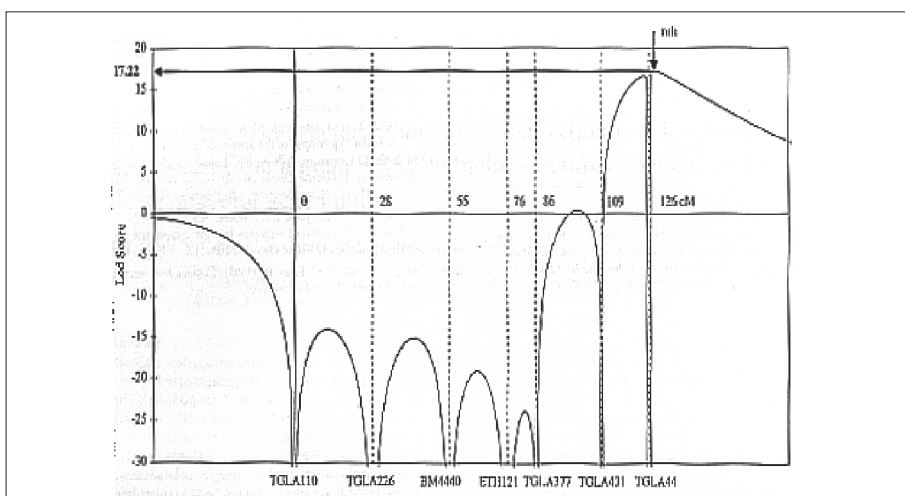


Fig. 6 Probabilità del QTL per la DC in BTA2. Da Dunner et al. 1997

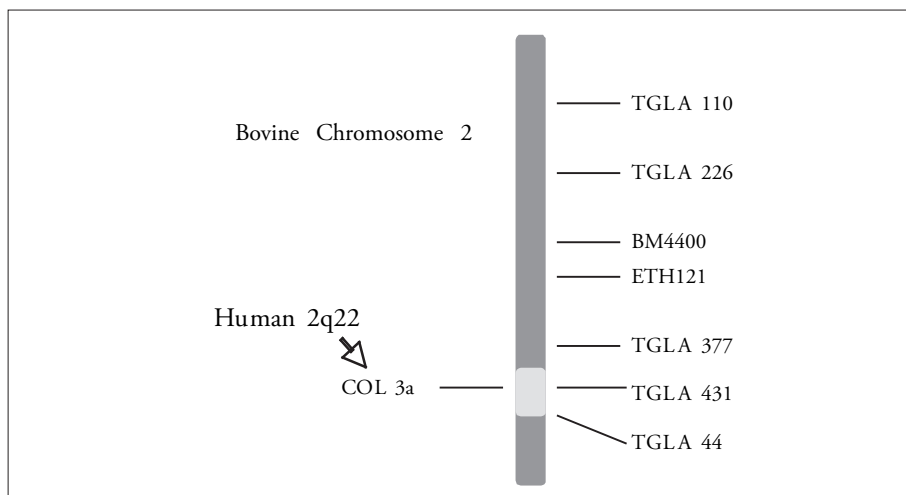


Fig. 7 Marcatori e geni candidati nella regione dove mappa il carattere DC

Nella scorsa metà degli anni '90, un complesso esperimento è stato eseguito per mappare il carattere in una popolazione sperimentale. Il gene è stato mappato in una regione breve del BTA2 vicino al marcatore microsatellite TGLA44 (fig. 6).

La mappa comparativa nell'uomo suggerì COL3a come un possibile gene candidato entro la regione (fig. 7).

Mentre il lavoro avanzava verso il clonaggio posizionale del gene, possibilmente investigando i polimorfismi del gene COL3a, McPherron et al. (1997) molto rapidamente scoprirono che: 1) nel topo il GDF8 gene dà origine a un fenotipo iperplasico/ipertrofico quando è knocked-out; 2) una delezione di 11 bp nel gene del omologo in bovini di razza Blu Belga è responsabile del fenotipo DC a causa di un difetto nel prodotto finale del gene (McPherron et al 1997a). Una volta che il gene è stato riconosciuto, molte altre mutazioni sono state identificate con un peso differente nella determinazione del fenotipo DC, come una cisteina in sostituzione della tirosina nella Piemontese (Kambadur et al., 1997) che rende difficile formare un dimero, e la comparsa di un codone di stop nel terzo esone che produce una proteina troncata.

Perciò, in questo caso particolare, l'uso di una specie del modello, che può essere facilmente manipolata e per la quale è disponibile una grande quantità

di conoscenza sulle caratteristiche del genoma, ha condotto a una scoperta rapida del gene implicato, delle sue caratteristiche, del ruolo nelle vie metaboliche e del potenziale uso economico.

NUOVI METODI PER L'IDENTIFICAZIONE DI GENI E PER LA SELEZIONE

Mappatura fine di QTL/geni tramite piattaforme diagnostiche SNP ad alta produttività

Un sottoprodotto del sequenziamento completo dei genomi è la disponibilità di un numero elevato di SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) con un limitato costo addizionale. Questo è ottenuto semplicemente sequenziando il genoma di alcuni individui (ovviamente per quanto più possibile diversi). Gli SNP trovati (di solito nell'intervallo 10,000-100,000) possono essere analizzati su piattaforme ad alta produttività producendo mappe molto dense con forte linkage disequilibrium fra marcatori adiacenti. Per esempio il sistema Illumina è basato su un assemblaggio di fibre ottiche di 96 matrici ciascuna recante fino a 1.536 sonde diverse di oligo (definiti Illumicodes ovvero firme di geni). Con tale strumentazione in alcune ore possono essere genotipizzati 96 individui su decine di migliaia di loci.

Il Kit Affymetrix GeneChip® Bovine Mapping 10K SNP contiene circa 10.000 SNPs che sono multiplexati in un saggio singolo. Circa il 92% degli SNPs di questo kit è stato scoperto dal Bovine Genome Sequencing Project.

Informazioni sugli SNP possono essere ottenute usando piattaforme in silico come il database Interactive Bovine In Silico SNP (IBISS) che è stato creato dal Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) per costruire un database di SNP ottenuti dall'enorme numero di sequenze EST bovine disponibili nel dominio pubblico (Hawken et al., 2004).

Nel bovino è disponibile già un panel di 20.000 SNP. Il consorzio di sequenziamento del suino ha pubblicato recentemente la prima versione della sequenza completa ed è probabile che un simile panel di SNP sarà disponibile a breve.

Analisi microarray

Eisen et al. (1998) furono tra i primi a usare profili di espressione genica ottenuti con microarray per predire funzioni geniche. Hanno usato algoritmi

gerarchici di raggruppamento per analizzare profili di espressione genica nel corso del tempo di lievito in fermentazione e in fibroblasti umani e trovarono che raggruppando trascritti con simili profili attraverso una dimensione temporale si poteva accuratamente identificare geni con funzione simile. Recentemente, in un progetto FIRB italiano coordinato da V. Russo, i microarrays sono stati usati per scoprire geni che sono differenzialmente espressi in una razza suina tradizionale, la Casertana, e una cosmopolita, la Large White (Savarese et al., 2005). Lo studio, ancora in corso, cercherà di delucidare quali geni o gruppi di geni sono responsabili delle grandi differenze fenotipiche nelle due razze, dovuto all'origine diversa o a selezione.

Espressione come Quantitative Trait Locus (eQTL)

Brem et al. (2002) hanno eseguito un'analisi di linkage di pattern di espressione genica a livello di genoma in un incrocio tra una linea di laboratorio e una selvatica di *Saccharomyces cerevisiae*. Hanno usato risultati ottenuti da microarray (intensità differenziale dei fluorofori) come fenotipi per il mappaggio genetico in un campione di lievito in segregazione. Questo approccio è stato seguito dal mappaggio dell'espressione di QTL (eQTL) in mammiferi. Ciascuno studio ha identificato caratteri *cis* e *trans*. Un carattere *cis* è uno che mappa geneticamente nell'ubicazione fisica del gene che codifica il suo mRNA, con l'implicazione che la variazione alla locus è direttamente responsabile della variazione ereditabile dell'espressione del gene. Un carattere *trans* mappa in una regione distinta dalla sua ubicazione fisica e così indica un gene con potenziale azione regolatrice rispetto al gene evidenziato dal microarray. Gli esperimenti possono trarre vantaggio dall'uso combinato di Gene Ontology (GO) di trascritti correlati, in quanto è ragionevole l'ipotesi che siano regolati dagli stessi fattori di trascrizione (Lan et al., 2006). Nessuno studio di eQTL è stato pubblicato finora in specie di interesse zootecnico, ma c'è una letteratura crescente particolarmente su topo dove popolazioni sperimentali segreganti sono piuttosto facili da costruire.

Selezione di polimorfismi in regioni regolatrici del gene

La maggior parte dei geni finora citati presenta alleli che producono proteine con strutture diverse e perciò influenzano il fenotipo alterando un comportamento altrimenti "normale". Ad esempio, nel caso della miostatina, tutte

III EXON	DRA I	MUSCULARITY VALUE	STD ERR
WILD ^A	TA	109.7	5.51
WILD ^A	TT	106.2	3.97
MH/+ ^A	TA	105.9	11.41
MH/+ ^B	TT	130.6	5.9

Tab. 3 *Effetto combinato sull'indice di muscolosità di polimorfismi nella regione del promotore (DRA I) e nel III esone della miostatina (Crisà et al., 2003). Lettere con indice superiore diverse indicano $P < 0.05$. mh = allele mutato*

le mutazioni che portano al fenotipo Doppia Coscia danno luogo a una proteina troncata o che non può formare il normale dimero funzionale. In ogni modo, c'è un enorme potenziale per la selezione di alleli che influenzano le regioni regolatrici della trascrizione di RNA. In questo modo, la proteina prodotta è la variante normale e solo il suo ammontare è modulato. Molte regioni del gene influenzano l'efficienza di trascrizione, come il promotore al 5', enhancers, silenziatori, ecc.

GHR

Gli effetti singoli e combinati di polimorfismi nella regione non codificante al 5' del gene del recettore dell'ormone della crescita bovino (GHR) sono stati esaminati su caratteri associati all'assunzione di alimento e produzione della carne in bovino da carne. Maj et al. (2004) hanno studiato quattro polimorfismi SNP. Settantuno tori giovani appartenenti a quattro razze (Charolais, Limousin, Aberdeen Angus, Hereford) e una razza a duplice attitudine (Simmental) sono stati oggetto dello studio. I risultati hanno mostrato che varianti genetiche alla regione non codificante al 5' del gene bovino GHR avevano un effetto marcato su caratteri della produzione della carne. Inoltre, associazioni statisticamente significative sono state trovate tra genotipi al GHR e consumo alimentare, peso della carcassa e dimensioni.

GDF8

Crisà et al. (2003) hanno trovato che individui di razza Marchigiana portatori di un genotipo TT in un sito polimorfico della regione 5' del gene della miostatina, quando associato alla condizione eterozigote al III esone, hanno

un indice di muscolosità del 25% più alto di individui con tutte le altre combinazioni possibili (tab. 3).

È abbastanza interessante che questo SNP esista anche in suino e che la mutazione sia stata associata con caratteri della crescita, con individui con genotipo TA aventi una media più alta dell'incremento giornaliero rispetto a quelli con genotipo TT (Jiang et al., 2002).

Validazione Mentre in molti casi è abbastanza facile predire l'effetto di un polimorfismo in regioni codificanti in quanto si può creare un codone di stop o un cambiamento profondo della struttura della proteina, per SNP in regioni regolatrici il loro ruolo non può essere predetto senza un esperimento *ad hoc*. Ad esempio, un costrutto è fabbricato col promotore al 5' di un gene reporter. Una misura molto precisa della trascrizione può essere ottenuta usando il gene della luciferasi attivato dall'allele del promotore da studiare e il gene della renilla attivato da un promotore standard come controllo della luminescenza emessa (Crisà et al., manoscritto in preparazione).

CONCLUSIONI

Molti geni che influenzano in modo significativo caratteri della carne sono stati scoperti in specie di interesse zootecnico e sono già attualmente sfruttabili nei piani di selezione. Tramite l'esperienza passata possiamo indirizzare meglio le strategie per scoprire nuovi geni economicamente importanti. Nuovi metodi, come genotipizzazione di SNP ad alta produttività, eQTL e sfruttamento di polimorfismo delle regioni regolatrici, condurranno rapidamente alla scoperta di molte varianti genetiche utili. Mentre alcune di queste informazioni saranno probabilmente disponibili nel dominio pubblico, la maggior parte sarà protetta intellettualmente tramite brevetto. I Paesi europei che possiedono la maggior parte delle risorse genetiche dovrebbero fare investimenti in questo campo di ricerca per aumentare la loro competitività verso concorrenti formidabili del resto del mondo. Questo è particolarmente importante se la sola scelta possibile è lo sfruttamento delle varianti genetiche che sono presenti naturalmente, ovvero senza il ricorso alla transgenesi: se i geni e le varianti sono brevettati, le ingenti spese per utilizzare tali conoscenze metteranno rapidamente fuori mercato le imprese zootecniche proprio nei paesi nei quali le varianti genetiche favorevoli sono apparse nel corso della storia.

ABSTRACT

Several traits of economical importance in meat production are under genetic control. Some of them are known and already used in selection schemes. The availability of genetic variants affecting meat traits will help also in rapidly switching selection objectives in a market where consumers and retailers demands change also quickly. Different strategies for the identification of genes have been employed to dissect complex traits. Namely, i. QTL search followed by positional cloning and ii. candidate gene analysis followed by validation. In these ways, a few genes have been discovered, sometimes patented, and used in the selection, like myostatin, calpastatin, DGAT1, leptin etc. Using high throughput techniques of Single Nucleotide Polymorphism genotyping, a high number of economically important genes affecting meat traits are under study and will be probably used soon in genetic improvement. New methods of gene discovery are promising for a fine dissection of traits, namely Expression Quantitative Trait Loci (eQTL) and the polymorphisms in the regulatory regions. While some of this information will be likely to be available in the public domain, most will be intellectually protected by patenting. European countries, that own most of the genetic resources, should make investments in this field of research to increase their competitiveness against formidable world competitors.

BIBLIOGRAFIA

- ARTHUR P.F. (1995): *Double muscling in cattle: A review*, «Aust. J. Agric. Res.», 46, pp. 1493-1515.
- BARB C.R., HAUSMAN J.H., HONSEKNECHT K.L. (2001): *Biology of leptin in the pig*, «Domest. Anim. Endocrinol.», 21, pp. 297-317.
- BARENDSE W., BUNCH R.J., HARRISON B.E. (2005): *The leptin C73T missense mutation is not associated with marbling and fatness traits in a large gene mapping experiment in Australian cattle*, «Animal Genetics», 36, pp. 71-93.
- BERGHMANS S., SEGERS K., SHAY T., GEORGES M., COCKETT N., CHARLIER C. (2001): *Breakpoint mapping positions the callipyge gene within a 285 kilobase chromosome segment containing the GTL-2 gene*, «Mammalian Genome», 12, pp. 183-185.
- BONGIONI A., POZZI, GALLI (2003): *Genotyping the Double Muscling Locus (mh) in Piedmontese Cattle*, in Proceedings 54th Annual Meeting of European Association for Animal Production, 96, EAAP, Rome, Italy.
- BREM R.B., YVERT G., CLINTON R., KRUGLYAK L. (2002): *Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast*, «Science», 296, pp. 752-755.
- BUCHANAN F.C., FITZSIMMONS C.J., VAN KESSEL A.G., THUE T.D., WINKELMAN-SIM D.C., SCHMUTZ S.M. (2002): *Association of a missense mutation in the bovine leptina gene with carcass fat content and leptina mRNA levels*, «Genetic Selection Evolution», 34, pp. 105-116.
- BUCHANAN F.C., THUE T.D., YU P., WINKELMAN-SIM D.C. (2005): *Single nucleotide polymorphisms in the corticotrophin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin genes are associated with growth and carcass yield in beef cattle*, «Animal Genetics», 36, 2, pp. 127-131.
- CIOBANU D.C., BASTIAANSEN J.W., LONERGAN S.M., THOMSEN H., DEKKERS J.C., PLASTOW G.S., ROTHSCHILD M.F. (2004): *New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs*, «J. Anim. Sci.», 82, pp. 2829-2839.

- D'ANDREA M., FIDOTTI M., PILLA F. (2005): *Differences in MC4R mRNA levels between Casertana and Large White pig breeds*, «Italian Journal of Animal Science», 4, Suppl. 2, pp. 94-96.
- D'ANDREA M., FIDOTTI M., PILLA F. (2006): *Expression analysis of Leptin and Melanocortin-4 receptor genes in Casertana swine breed*, in corso di stampa.
- D'ANDREA M., PILLA F., WADDINGTON D., ARCHIBALD A. (2006): *Lack of association between 67 and 1 polymorfismos in LEP and MC4R genes respectively, and traits in Casertana, Large White and Cross Breed swine*, in corso di stampa.
- DUNNER S., CHARLIER C., FARNIR F., BROUWERS B., CANON J., GEORGES M. (1997): *Towards interbreed IBD fine mapping of the MH locus - double - muscling in the Asturiana de los Valles breed involves the same locus as in the Belgian blue cattle breed*, «Mammalian Genome», 8, pp. 430-435.
- EISEN M.B., SPELLMAN P.T., BROWN P.O., BOTSTEIN D. (1998): *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 95, pp. 14863-14868.
- FAHRENKRUG S.C., FREKING B.A., REXROAD III C.A., LEYMASTER K.A., KAPPES S.M., SMITH T.P.L. (2000): *Comparative mapping of the CLPG locus*, «Mammalian Genome», 11, pp. 871-876.
- FREKING B.A., MURPHY S.K., WYLIE A.A., RHODES S.J., KEELE J.W., LEYMASTER K.A., JIRTLE R.L., SMITH T.P. (2002): *Identification of the single base change causing the calipyge muscle hypertrophy fenotipo, the only known example of polar overdominance in mammals*, «Genome Res.», 12, pp. 1496-1506.
- FUJII J., OTSU K., ZORZATO F., DE LEON S., KHANNA V.K., WEILER J.E., O'BRIEN P.J., MCLENNAN D.H. (1991): *Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor that is associated with malignant hypertemia*, «Science», 253, pp. 448-451.
- GRISART B., FARNIR F., KARIM L. et al. (2004): *Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 101, 8, p. 2398.
- HAWKEN R.J., BARRIS W.C., MCWILLIAM S.M., DALRYMPLE B.P. (2004): *An interactive bovine in silico SNP database (IBISS)*, «Mammalian Genome», 15, 10, pp. 819-827.
- HECKER K.H. (2002): *Automated high-accuracy mutation screening with WAVE® nucleic acid fragments analysis system*, in: Proc. International Society for Optical Engineering, 22-23 January 2002, San Jose, USA, 4626, pp. 43-50.
- HU Z., DRACHEVA S., JANG W., MAGLOTT D., BASTIAANSEN J., MAX F., ROTHSCHILD M.F., JAMES M., REECY J.M. (2005): *A QTL resource and comparison tool for pigs: Pig-QTLDB*, «Mammalian Genome», 16, 10, pp. 792-800.
- HU Z., HUMPHRAY S., SCOTT C., MEYERS N.S., ROGERS N., ROTHSCHILD M.F., REECY J.M. et al. (2006): *Extension of PigQTLdb: Genome-wide Alignment of BAC FPC Maps and RH Maps for QTL Positional Gene Mining*, «Plant & Animal Genome», xiv Conference, San Diego, USA, January 14-18.
- HUSTON R.D., CAMERON N.D., RANCE K.A. (2004): *A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorfismo is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations*, «Animal Genetics», 35, pp. 386-390.
- JIANG Z.-H., GIBSON J.P. (1999): *Genetics polymorfismo in the leptina gene and their association with fatness in four pig breeds*, «Mammalian Genome», 10, pp. 191-193.
- JIANG Y.L., LI N., DU L.X., WU C.X. (2002): *Relationship of T→A mutation in the promoter region of myostatin gene with growth traits in swine*, «Yi Chuan Xue Bao», 29, 5, pp. 413-416.

- KAMBADUR R., SHARMA M., SMITH T.P.L., BASS J.J. (1997): *Mutations in myostatin (GDF-8) in double muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle*, «Genome Res.», 7, pp. 910-915.
- KENNES Y.M., MURPHY B.D., POTHIER F., PALIN M.-F. (2001): *Characterization of swine leptina (LEP) polymorfismos and their association with production traits*, «Animal Genetics», 32, pp. 215-218.
- KIM K.S., LARSEN N., SHORT T., PLASTOW G., ROTHSCHILD M.F. (2000): *A missense variant of porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits*, «Mammalian Genome», 11, pp. 131-135.
- KIM K.S., REECY J.M., HSU W.H., ANDERSON L.L., ROTHSCHILD M.F. (2004): *Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pigs*, «Domestic Animal Endocrinology», 26, pp. 75-86.
- LAGONIGRO R., WIENER P., PILLA F., WOOLLUAMS J.A., WILLIAMS J.L. (2003): *A mutation in coding region of the bovine leptina gene associated with feed intake*, «Animal Genetics», 34, pp. 371-374.
- LAN H., CHEN M., FLOWERS J.B., YANDELL B.S., STAPLETON D.S. et al. (2006): *Combined Expression Trait Correlations and Expression Quantitative Trait Locus Mapping*, «PLoS Genet.», 2, 1, e6.
- LIEFERS S.C., VEERKAMP R.F., TE PAS M.F.W., DELAUD C., CHILLIARD Y., PLATJE M., VAN DERLENDE T. (2005): *Leptina promoter mutations affect leptina levels and performance traits in dairy cows*, «Animal Genetics», 36, pp. 111-118.
- MAJ A., OPRZADEK J., OPRZADEK A., DYMNIKI E., ZWIERSCHOWSKI L. (2004): *Polimorfismo in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene and its association with meat production traits in cattle*, «Anim. Res.», 53, pp. 503-514.
- MALEK M., DEKKERS J.C.M., LEE H.K., BAAS T.J., PRUSA K. et al. (2001): *A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition*, «Mammalian Genome», 12, pp. 637-645.
- MARCHITELLI C., SAVARESE M.C., CRISÀ A., NARDONE A., AJMONE MARSAN P., VALENTINI A. (2003): *Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene*, «Mammalian Genome», 14, pp. 392-395.
- MCPHERRON A.C., LAWER A.M., LEE S.J. (1997a): *Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member*, «Nature», 387, pp. 83-90.
- MCPHERRON A.C., LEE S.J. (1997b): *Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 94, pp. 12457-12461.
- NAPOLITANO F., ORRÙ L., DE MATTEIS G., CATILLO G., MOIOLI B. (2006): *Occurrence of the DGAT1 K232a SNP in a few Italian breeds and association with variation in milk fat content* (submitted 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Brasil).
- NASLUND J., FIKSE F., PIELBERG G., LUNDEN A. (2005): *Book of Abstracts of the 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, 11, p. 371.
- PARK H.B., CARLBORG Ö., MARKLUND S., ANDERSSON L. (2002): *Melanocortin-4 receptor (MC4R) genotypes have no major effect on fatness in a Large-White X Wild Boar intercross*, «Animal Genetics», 33, pp. 155-157.
- ROTHSCHILD M.F., CIOBANU D.C. (2004a): *Novel calpastatin (CAST) alleles*, United States Patent Application 20040048267.
- ROTHSCHILD M.F., BIDANEL J.P., CIOBANU D.C. (2004b): *Genome analysis of QTL for muscle tissue development and meat quality*, in *Muscle development of livestock animals. Physiology, Genetics and meat quality*, edited by M.F.W. te Pas, M.E. Everts, H.P. Haagsman-CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 247-266.

- RUSSO V., DAVOLI R., TAGLIAVINI J., DALL'OLIO S., BIGI D., COSTOSI E., COSTELLI M.B., FONTANESI L. (1993): *Identificazione del genotipo dei suini per la sensibilità all'alotano a livello di DNA mediante PCR*, «Zoot. Nutr. Anim.», 19, pp. 89-93.
- SAVARESE M.C., CRISÀ A., CASTIGLIONI B., STELLA A., PILLA F., VALENTINI A. (2005): *Use of microarray technology to evaluate differential gene expression in Large White and Casertana swine breeds*, Proceedings II IPSO congress, Viterbo, Italy, p. 156.
- SCHMIDT J.V., MATTESON P.G., JONES B.K., GUAN X.-J., TILGHMAN S.M. (2000): *The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted*, «Genes Dev.», 14, pp. 1997-2002.
- THALLER G., KÜHN C., WINTER A., EWALD G., BELLMANN O., WEGNER J., ZÜHLKE H., FRIES R. (2003): *DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle*, «Animal Genetics», 34, pp. 354-357.
- UNDERHILL P.A., JIN L., LIN A.L., MEHDI S.Q., JENKINS T., VOLLRATH D., DAVIS R., CAVALLI-SFORZA L.L., OEFNER P.J. (1997): *Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography*, «Genome Res.», 7, pp. 996-1005.
- YEO G.S., LANK E.J., FAROOQI I.S., KEOGH J., CHALLIS B.G., O'RAHILLY S. (2003): *Mutations in human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanism*, «Human Molecular Genetics», 12, pp. 561-574.
- ZHANG Y., PROENCA R., MAFFEL M., BARONE M., LEOPOLD L., FRIEDMAN J.M. (1994): *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*, «Nature», 372, pp. 425-432.

DONATO MATASSINO^{*,**}, CARMELA MARIA ASSUNTA BARONE^{***},
ALDO DI LUCCIA^{****}, CATERINA INCORONATO^{**}, FILOMENA INGLESE^{**},
DONATA MARLETTA^{*****}, MARIACONSIGLIA OCCIDENTE^{**},
PAOLA RONCADA^{*****}

Genomica e proteomica funzionali

I. INTRODUZIONE

L'evidente importanza che rivestono la *genomica* e la *proteomica* nella complessa funzionalità di un qualsiasi essere vivente richiede, ad avviso degli Autori, una visione di conoscenze, la quale mira continuamente a incrementare il bagaglio culturale di un allevatore. Il miglioramento genetico di una *biopoiesi* non può prescindere dal progredire di tali conoscenze, specialmente se viene implicato l'“aspetto fenotipico” della “qualità” del prodotto, considerata nei suoi *molteplici e innumerevoli* effetti sul “benessere del consumatore”. Questi effetti dipendono dal ruolo che i componenti “nutrizionali”, “extranutrizionali” e “salutistici” del prodotto di origine animale svolgono una volta ingeriti. L'uomo non può essere considerato un'entità *biologica* “invariante” nel

* Dipartimento di Scienze biologiche e ambientali, Università degli Studi del Sannio

** ConSDABI – National Focal Point italiano della FAO (NFP.I – FAO) per la tutela del germoplasma animale in via di estinzione nell'ambito della Strategia Globale FAO per la gestione della risorsa genetica animale (GS-AnGR, Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources) – Centro di Scienza Omica per la Qualità e per l'Eccellenza nutrizionali – Centro di Ricerca sulle Risorse Genetiche Animali di Interesse Zootecnico – Centro Produzione Sperma ed Embrioni – www.consadabi.org

*** Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta, dell'ambiente e delle produzioni animali (Sezione Produzioni animali, T.M. Bettini), Università degli Studi di Napoli “Federico II”

**** Dipartimento di Progettazione e di Gestione dei Sistemi Agro-Zootecnici e Forestali (PRO. GE.SA), Università degli Studi di Bari

***** Dipartimento di Scienze agronomiche, agrochimiche e delle produzioni animali (DACPA) (Sezione Scienze delle produzioni animali), Università degli Studi di Catania

***** Istituto Sperimentale Italiano “Lazzaro Spallanzani” – Laboratorio di Proteomica presso Dipartimento di Scienze cliniche veterinarie (Sezione Clinica medica), Università degli Studi di Milano

Il testo della relazione è parzialmente aggiornato a gennaio 2007.

tempo e nello *spazio*, ma un “essere vivente” che richiede, lungo l’arco della sua vita (dall’embrione al feto al bambino all’adolescente all’adulto all’ultra-sessantenne all’ultraottantenne all’ultracentenario), un “regime alimentare” diversificato al quale il “sistema allevatorio” deve rispondere con oculatezza, con competenza e con convinzione; la risposta del “sistema allevatorio” è ancora più impegnativa se si considera che il regime alimentare varia anche in relazione ad alcune funzioni “biologiche” (gravidanza, allattamento, attività agonistica, ecc.) e “intellettuali” esplicate quotidianamente (Matassino et al. 1991; Matassino, 1992a; Matassino, Cappuccio, 1998; Casabianca, Matassino, 2006; Matassino et al., 2006d ed e). In questo “*continuum*” coacervo di vita relazionale, il futuro del “miglioramento genetico degli animali in produzione zootecnica” (MGAPZ) non può prescindere da una “visione sistemica” (Needham, 1936; Von Bertalanffy, 1940, 1971; Bettini, 1969, 1972; Matassino, 1978, 1984, 1992b). Solo un percorso basato su una “visione sistemica” potrà soddisfare l’esigenza di fornire risposte concrete, costruttive e previsionali alla domanda tesa a disporre di strumenti capaci di indicare nella dimensione “spazio-temporale” livelli ottimali delle prestazioni degli animali in produzione zootecnica (Matassino 1984, 1986, 1988).

Una disamina arguta del MGAPZ non obsolescente per diverse riflessioni espresse si deve a: Aleandri (1989); Bufano (1989); Casu (1989); Cavalchini e Cerolini (1989); Cicogna (1989); Damiani et al. (1989); Fabbri (1989); Geri (1989); Lucifero (1989); Masina et al. (1989); Masoero (1989); Matassino (1989a e b); Pagnacco (1989); Pilla (1989a e b); Russo (1989); Scardella (1989); Silvestrelli (1989). Inoltre la tematica era stata trattata in: Bettini (1955); Bettini e Matassino (1961); Bettini (1963); Bettini e Matassino (1963); Bettini (1972); Cunningham (1974); Hanset (1974); Henderson (1975); Matassino e Pilla (1976); Matassino (1978); Cartwright (1982); Cartwright et al. (1982); Matassino (1984, 1985, 1988); Gahne e Juneja (1988); Russo e Fontanesi (2001); Pilla (2002); Pagnacco (2004).

Dalla suddetta disamina emergono alcune considerazioni che direttamente e/o indirettamente interferiscono con il MGAPZ e che sono raggruppabili in:

- (a) *economiche*, le quali impongono obiettivi diversi e non facilmente conciliabili cioè obiettivi di “qualità” e di “competitività”; obiettivi, che non si escludono a vicenda ma che si integrano nel senso che bisogna produrre “qualità” in un mercato “competitivo”;
- (b) *tecniche*, le quali comprendono una serie di condizioni caratterizzanti l’ambiente di allevamento (alimentazione, sistema di tenuta, strutturistica aziendale, ecc.);

(c) *genetiche*, le quali rappresentano elementi basilari; sarebbe un grave errore considerare esaustive le due precedenti considerazioni in quanto alla base di tutto esiste il “fattore genetico”, la cui importanza si è accresciuta proprio per l’acuirsi della competizione economica e per l’aumentato, sempre più sofisticato, livello di tecnica.

L’evoluzione della conoscenza del *genoma*, del *trascrittoma*, del *proteoma*, dell’*aromoma*, del *glicoma*, del *lipidoma* e del *metaboloma*, sollecita, in modo cogente, una visione del MGAPZ in un quadro d’insieme, ove gli aspetti abiologici, biologici e umani siano fortemente incorporati dal “sistema allevatorio”; quest’ultimo, deve considerare l’evoluzione cognitiva di tipo “costruttivo” nel senso che, passando da una conoscenza *abiotica* a quella *biotica*, l’autocoscienza dell’allevatore diventi sempre più elemento *fondante* per incrementare la sua capacità sia di conoscenza che di trasferimento operativo.

L’“arsenale molecolare” dell’animale in produzione zootecnica è la “dote” e l’*input* affinché l’animale, evidenziando un’immensa “plasticità fenotipica”, partecipi attivamente e con pieno diritto al “costruttivismo” del “nuovo” che si può identificare con il suo “epigenoma”; la conoscenza di quest’ultimo è la base per raggiungere “traguardi biopoietici innovativi e utili” specialmente per l’aspetto salutistico del consumatore che deve essere considerato un vero e proprio “co-produttore”.

Il “sistema allevatorio” e/o il “singolo allevatore”, operando secondo questa strategia, partecipa/ano pienamente all’“evoluzione costruttiva” dell’intero “sistema”, la cui parte fondante è, senza dubbio, la sua evoluzione “culturale” che conduce a un “paradigma costruttivo” dell’attività *biopoietica* della sua impresa, senza trascurare quello sia “teleologico” che “teleonomico”.

Le conoscenze sul tema da trattare sono documentate da una “vasta letteratura”, in cui spesso sperimentazioni “diverse”, talvolta “contrastanti” per “impostazione” e per “risultati”, forniscono un “coacervo di acquisizioni” che di norma rimodellano concetti biologici e comportamentali ritenuti invariati. L’argomento è di viva attualità, di notevole valenza scientifica e operativa, nonché molto futuristico, emblematico e complesso (Matassino et al., 2006d).

Le nuove conoscenze evidenziano che i meccanismi molecolari alla base della vita sono integrati in sistemi complessi che funzionano “olisticamente”. Pertanto, la biologia del “2000” mostra un “volto” nuovo che si va configurando con una “biologia olistica” o “integrata” o “biologia dei sistemi”. Questa biologia è indiscutibilmente diversa da quella del suo fondatore: Aristotele.

Il nuovo approccio si sta qualificando principalmente come settore “biologico-molecolare”, ove la conoscenza di un “carattere” o “manifestazione fe-

notipica” nella sua “struttura” e nella sua “funzione” è *fondamentale* se non *indiscussa*. Il “carattere” è funzione degli effetti di diversi piani organizzativi: *submolecolare, molecolare, cellulare, tissutale, organico, organismico, biocenotico, ecosistemico*; ogni piano è caratterizzato da norme proprie e da norme di vita di relazione con altri piani. A ogni successivo livello di organizzazione la complessità strutturale e funzionale aumenta, arricchendosi “epigeneticamente”; pertanto, si ha un aumento continuo, temporalmente e spazialmente, della quantità di informazioni necessarie a descrivere questo sistema (Bettini, 1969, 1972; Matassino, 1978; Matassino, 1984).

L'utilizzazione della biologia molecolare sta diventando, sempre di più, “fonte notevole di innovazione” dei sistemi produttivi interessati alla “biopoesi” (Matassino et al., 2006a).

Questa innovazione si basa su una “genomica” ove non sono più i soli segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” (cosiddetti “geni”) gli “unici protagonisti” del processo ereditario ma anche le “reti regolatrici” che ne governano l'espressione; espressione, che si concretizza in una “manifestazione fenotipica”, la quale altro non è se non il prodotto di una *attività sistemica* del DNA.

L'approccio classico allo studio dei fenomeni biologici è sempre stato quello di affrontare le problematiche in maniera indipendente: studio del singolo segmento di DNA codificante “polipeptide/i” e studio del singolo “polipeptide”; in realtà, è sempre più documentato come il comportamento di queste macromolecole sia collegato e sia integrato a quello di numerosi altri fattori nel contesto delle “complesse reti biologiche”. “Segmenti di DNA” e “proteine” vanno, quindi, considerati come componenti insostituibili di una vera e propria “rete cibernetica”.

L'importanza che si attribuisce ai segnali dell'ambiente “interno” ed “esterno” all'organismo nella regolazione di un meccanismo “molecolare-cellulare-biologico” evidenzia che l'“ambiente” e l'“organismo” costituiscono un'“unità sempre più inscindibile”, ove il ruolo fondamentale svolto dalle interazioni rende poco significativo lo studio delle singole entità. Pertanto, alla luce dell'impostazione sistemica, qualsiasi essere vivente può essere considerato un organismo “cibernetico” identificabile con un vero e proprio “sistema biologico, aperto, dinamico, vincolato, neghentropico” (Von Bertalanffy, 1940; Bettini, 1970; Matassino, 1978, 1984, 1989c; Sarà, 2002).

I progressi acquisiti in biologia molecolare, sempre in evoluzione, hanno condotto a una notevole espansione della cosiddetta scienza “omica”¹; questa

¹ “Omica”: suffisso derivato dal greco “ὅμας” nel significato di: “il tutto”, “l'insieme”.

indica l'approccio analitico che tende a studiare le macromolecole non più "singolarmente" ma in modo "olistico", quali componenti di una complessa "rete biologica". La "biomica", parte della scienza "omica", comprende, a oggi, varie branche che si integrano tra loro: *genomica*, *trascrittomica*, *proteomica*, *aromomica*, *glicomica*, *lipidomica*, *metabolomica*, ecc. (Matassino et al., 2006a).

In questa sede diviene importante sia evidenziare alcuni risultati delle sperimentazioni sia sottolineare alcuni concetti "basilari" e "semantici" della *problematica* scaturente dalla *crescente* "complessità" dell'argomento, essendo velleitario fornire risposte *esaurienti*.

La trattazione della *genomica* e della *proteomica funzionale* non può prescindere da un "microriferimento" alla "irriducibile complessità" del sistema vivente. In tale contesto, si è ritenuto altresì opportuno riportare alcuni cenni relativi allo stato dell'arte delle conoscenze sul genoma umano; quest'ultimo, infatti, oltre a rendere testimonianza della "complessità" del vivente, rappresenta uno dei campi nel quale lo "status" delle acquisizioni progredisce istante per istante.

Non è semplice condensare, oltre certi limiti, una materia così vasta e i relativi necessari approfondimenti, per cui è inevitabile che la trattazione presenti omissioni. Altresì, si è consapevoli del probabile "rischio" che il testo, in alcuni punti, risulti eccessivamente "concettuale" per meglio interpretare il funzionamento "genomico-proteomico" di un organismo vivente, quindi dell'*animale in produzione zootecnica*; pertanto, la presente, probabilmente, se non certamente, solleverà più problemi di quanti ne possa chiarire, ma il sollevare problemi "rende inquieti" e, concordando con lo scrittore francese J. Green, «Finché si è inquieti, si può stare tranquilli».

2. "COMPLESSITÀ" DEL SISTEMA VIVENTE

La parola "complessità" è un "*continuum*" oggetto di discussioni e di teorie; fra gli altri, ne hanno ampiamente trattato: G. Bateson (1904-1980), A. Einstein (1879-1955), N. Luhmann (1927-1979), E. Morin (1921), V. Pareto (1848-1923), T. Parsones (1902-1979), I. Prigogine (1917-2004), H. Spencer (1820-1903), F.J. Varela (1946-2000), H. von Foerster (1911-2002) i quali hanno evidenziato la *limitatezza* e l'*unilateralità* delle *concezioni razionali in chiave lineare e meccanicistica*. In sintesi (Matassino, 2001a), le diverse teorie considerano che la "complessità" sociale è caratterizzata da una specie di parallelismo fra:

(a) *progresso, conoscenza, vita, umanità, evoluzione*

e

(b) *caos, perturbazioni, disordine, instabilità, squilibrio, turbolenza, non linearità, marginalità e frattalismo.*

La “complessità”, come evidenziato da Matassino (2001a), è un vero e proprio “sistema complesso”, in quanto:

(a) è da delimitare, di volta in volta, nei suoi confini;

(b) è da conoscere nelle sue componenti qualitative e quantitative nonché nelle loro interrelazioni;

(c) è flessibile ed è variabile “spazialmente” e “temporalmente” perché strutturalmente instabile;

(d) ha “capacità al costruttivismo” differenziata per effetto del grado di informazione del *tempo* e dello *spazio*;

(e) è fortemente “autoregolatore”, “omeostatico”, per cui può produrre nuove combinazioni fra le parti costituenti che possono dare origine a dinamici peculiari “status” le cui regole di funzionamento possono mutare nel tempo e nello spazio come si verifica, ad esempio, per il sistema “genoma” per effetto delle continue e nuove combinazioni di segmenti di DNA;

(f) non è un modello lineare per l’assenza di proporzione tra causa ed effetto;

(g) è “imprevedibile”, nel senso che esso, alla luce delle precedenti considerazioni, non è totalmente “computabile”, perché può essere considerato una vera e propria “struttura caotica deterministica”;

(h) ha una sua “singolarità”, quale “universo soggettivo” non riducibile a mero oggetto di riduzionismo ma discernibile e con una sua propria “alterità”;

(i) ha una sua specifica pertinenza per la capacità di “dialogare” tra le parti componenti.

Come già detto, qualsiasi essere vivente va studiato e interpretato a differenti “livelli organizzativi”; in particolare, quello molecolare (“DNA” e suoi “prodotti”) va prima di tutto conosciuto a livello di “singola cellula” e, successivamente, nei rapporti tra le “cellule costituenti l’organismo” nonché tra quest’ultimo e il “microambiente” in cui l’organismo è inserito.

Le proteine, tra le macromolecole, rappresentano quelle maggiormente coinvolte nella manifestazione di un dato “fenotipo” cioè quelle che, più verosimilmente, riflettono le differenze nell’espressione dei segmenti di DNA. Piace a questo proposito ricordare la metafora del Nobel Renato Dulbecco (2002), il quale paragona il DNA al “nastro di un registratore” e le proteine ai “meccanismi che fanno muovere il nastro”: senza i suddetti meccanismi, non si produrrebbe il “suono”; il “genoma” è, dunque, da considerare il “progetto della vita” che viene realizzato dalle proteine.

Un “vertice” nel fenomeno della “complessità” della vita può essere considerato il sistema nervoso. Si stima che l’encefalo umano sia costituito da 100 miliardi di cellule (neuroni), di cui una trentina di miliardi costituisce la sola corteccia; ciascuna cellula è collegata alle altre da migliaia di *sinapsi*, cioè da migliaia di interazioni da cui dipende il suo funzionamento. Indagini sull’evoluzione della “mente” evidenzerebbero sempre più chiaramente l’“unicità” dell’*encefalo umano* che potrebbe essere spiegata dalla sua “lateralizzazione” associata alla *specializzazione emisferica*² (Hutsler et al., 1999; Gazzaniga, 2006).

Anche il numero di cellule che costituirebbe l’organizzazione complessiva di un mammifero, quale l’uomo, è sconvolgente: 100.000 miliardi (10^{14}); valore che supera le attuali stime del numero di galassie dell’universo, circa 125 miliardi, pur restando, però, inferiore a quello delle stelle che è stimato dell’ordine di 10^{21} .

Concordando con Behe (1996), si può affermare: «La ricerca ha provato che il fondamento della vita, la cellula, è gestita da una complessa e sofisticata macchina molecolare. Ci sono, letteralmente, piccoli camion e piccoli autobus molecolari che lavorano nella cellula e piccoli motori fuoribordo che le permettono di muoversi».

L’informazione contenuta nel singolo genoma è “unica” del “portatore” ed è normalmente “irripetibile”; considerando i 46 cromosomi, il genoma di un vivente umano è il risultato di circa 70 mila miliardi di combinazioni diverse, mentre il *genoma* di un *bovino* ($2n = 60$) è una delle ...1.152.921.504.606.850.000 (!!!) combinazioni.

L’uomo può essere considerato il vertice della *complessità* nella scala dei viventi, *complessità* che va intesa come “tipo” di cellule e di molecole e quindi come “maggiore varietà di funzioni” che possono essere eseguite.

La comprensione della “genesi” della *complessità* di un organismo pluricellulare richiede la considerazione di due tipi di processi:

- (a) “ontogenetico” o di “sviluppo”, realmente prodotto nel senso che da una singola cellula (lo zigote) si forma un organismo di più cellule fra loro differenziate che producono tessuti e organi in modo da *poter sopravvivere, riprodursi, relazionarsi con altri organismi e con l’ambiente*;
- (b) “filogenetico” o “evolutivo”, desumibile da una documentazione basata su fossili nel senso che da forme ipotetiche di vita sembrano derivare i primi

² *Specializzazione emisferica*: processo responsabile del rimodellamento di funzioni diverse in uno dei due emisferi: ad esempio, sviluppo del linguaggio nell’emisfero sinistro e sviluppo della percezione spaziale in quello destro, ecc.

batteri che avrebbero dato origine agli eucarioti unicellulari, i quali, a loro volta, avrebbero dato origine a quelli pluricellulari.

Secondo Sarà (2005), la “complessità” dei fenomeni della vita, osservata nella sua attualità, si esplica mediante una “struttura gerarchica” (o “gerarchia economica”) che trova la sua massima espressione nell’ambito del pensiero “olistico”; struttura gerarchica, costituita da diversi livelli “emergenti”³ contenuti gli uni negli altri e interconnessi da rapporti “istantanei”.

Già Bettini (1969) aveva intuito *l'importanza delle produzioni animali* su base *molecolare* in un contesto sistemico ove il piano organizzativo molecolare rappresenta il primo elemento dell'impostazione “atomistica” di un sistema “produttivistico”; in tale contesto, Egli propose tra gli insegnamenti universitari “complementari” quello della “zootecnica molecolare”.

La singola cellula non funziona, normalmente, come un semplice “sistema a cascata” (dal “genotipo”⁴ al “fenotipo”⁵), ma come un “sistema complesso”.

Il meccanismo responsabile dell’aumento di “complessità” di un sistema biologico opera mediante interazioni tra i costituenti a qualsiasi livello con rapporti per lo più costruttivi i quali, implicando *scambi di energia e di informazione* tra le entità interagenti, cooperano per la formazione di un sistema più ampio. Affinché tale sistema non assuma la rigidità della “non vita”, è necessario che le interazioni “positive” o “costruttive” siano accompagnate da quelle “negative” o “demolitive” e che quindi all’“attrazione” si contrapponga la “repulsione” (Sarà, 2005).

Complessivamente, *l'ontogenesi* mostra che nel bilancio la fase “costruttiva” prevale su quella “distruttiva”: l’albero dei viventi, pur presentando molti rami estinti, si è espanso e si è diversificato con la costruzione di organizzazioni sempre più autonome e più complesse; fase “costruttiva”, identificabile con la “capacità al costruttivismo”⁶ di un organismo (Matassino, 1989c, 1992b; Lewontin, 1993, 2004).

³ *Emergente*: nel senso che alcune proprietà non possono essere desunte da quelle del “livello inferiore”.

⁴ *Genotipo*: può essere considerato a livello: (a) *tassonomico*, come l’insieme di tutte le informazioni genetiche possedute da un organismo (oggi definito “genoma”); (b) *individuale*, come *coppia di alleli* che caratterizza un determinato *locus* monoallelico o polimorfo (ad esempio: *AA* o *AB* o *BB*).

⁵ *Fenotipo*: può essere definito come la manifestazione di qualsiasi natura (*biochimica, chimica, fisiologica, metabolica, somatica*, ecc.) quale espressione dell’informazione genetica di cui quell’essere vivente è dotato, in un determinato microambiente.

⁶ *Capacità al costruttivismo*: nel senso che le “novità evolutive”, per quanto imprevedibili, non sono una produzione “dal nulla”, ma una trasformazione di “precedenti potenzialità” grazie alle

Con particolare riferimento agli aspetti funzionali del genoma, la rete di messaggi molecolari in un organismo, complicata da fenomeni quali la bi-forcazione dei segnali, la *retroazione* (*feedback*) e la *diafonia* (*cross talk*)⁷, può essere paragonata a un “sistema di circuiti” in cui i segmenti di DNA con funzione *regolativa* agiscono da “commutatori” o da “interruttori” (*switch*) che “accendono” o “spengono” l’attività trascrizionale. Questi interruttori ricevono messaggi di ingresso (*input*) dall’ambiente *extra* e *intracellulare* e rispondono con messaggi di uscita (*output*) che si concretizzano nell’espressione del segmento di DNA interessato. Nel batterio *Escherichia coli*, Jacob e Monod (1961) hanno caratterizzato il primo “commutatore” *genetico*: il *repressore del segmento di DNA codificante la beta-galattosidasi*; enzima la cui sintesi è sottoposta a un doppio controllo: “positivo” o “negativo” in rapporto, rispettivamente, all’assenza di glucosio e alla presenza di lattosio (*lac-operon*)⁸. Successivamente, sono stati proposti veri e propri modelli di *circuiti molecolari*, quali rappresentazione della “logica” e dei meccanismi di attivazione dei segmenti di DNA di un genoma; un esempio di modellizzazione è quello proposto da Kauffman (1969, 1974) basato sulla *rete booleana*⁹ in cui

quali gli organismi partecipano attivamente alla “costruzione” del microambiente in cui vivono; nel 1907, nell’opera *L’évolution créatrice*, H. Bergson aveva proposto il termine “creativo” nel senso di “*élan vital*” (slancio vitale) per indicare “la capacità di produrre un flusso continuo di “novità evolutive”.

⁷ *Diafonia*: termine mutuato dalla tecnica delle comunicazioni identificabile con un “disturbo” in un punto del circuito ove a causa di scambi di energia tra differenti linee di trasmissione sono presenti segnali attinenti ad altri circuiti.

⁸ *Lac-operon* (operone del lattosio): rappresenta l’unità fondamentale del controllo coordinato della trascrizione dei segmenti di DNA codificanti gli enzimi necessari per il *metabolismo del lattosio*; esso è costituito da: (a) sito “promotore”, a cui si lega la RNA polimerasi; (b) sito “operatore”, a cui si lega la molecola regolatrice della trascrizione; (c) 3 segmenti di DNA contigui che trascrivono una singola molecola di RNA messaggero (RNA *policistronico*) codificante i 3 enzimi (*beta-galattosidasi*, *permeasi*, *transacetilasi*) necessari per il metabolismo del lattosio; l’attività trascrizionale di un *operone* è regolata da una proteina detta “repressore”. Nella fattispecie, se nel terreno di coltura del batterio è *presente il glucosio*, l’*operone* è “represso” in quanto il “repressore” legato al sito “operatore” blocca la trascrizione; se nel terreno di coltura il *glucosio manca ma il lattosio è presente*, l’*operone* viene “de-represso”; infatti, grazie all’attività basale minima dell’enzima “beta-galattosidasi”, una piccola frazione di lattosio viene convertita in “allolattosio”, che si lega alla proteina “repressore” modificandone la conformazione; questa variazione “conformazionale” provoca il distacco del *repressore* dal sito “operatore”; distacco che consente il legame della RNA polimerasi al promotore con l’avvio della trascrizione dei suddetti 3 enzimi.

⁹ *Rete booleana*: dal nome del matematico G. Boole (1815-1864), si basa su *variabili con due soli valori “possibili”* del tipo “acceso”/“spento”; le relazioni tra queste due variabili si esprimono sotto forma dei seguenti operatori “booleani”: (a) “somma logica” (*or*) in cui: (i) se uno dei due “operandi” in ingresso (*input*) è “acceso”, il valore di uscita (*output*) sarà “acceso”; (ii) se nessuno dei due operandi in ingresso è “acceso”, il valore di uscita sarà “spento”; (b) “prodotto logico” (*and*), in cui solo se entrambi gli operandi sono “accesi” l’*output* sarà “acceso”, in tutti gli altri casi il valore di uscita sarà “spento”; (c) “negazione” (*not*), in cui: (i) se l’operando di

migliaia di segmenti di DNA sono rappresentati come elementi che sono nello stato “on” (acceso, stato “1”) o “off” (spento, stato “0”) e lo stato on/off di alcuni elementi determina lo stato di altri. La rete *booleana* non costituisce la rappresentazione reale del comportamento dei segmenti di DNA, in quanto questo comportamento non è identificabile con un semplice on/off, ma piuttosto con “differenti livelli di espressione” entro determinati intervalli identificabili con un *continuum* di cascate di segmenti di DNA organizzato in reti complesse, come ad esempio si verifica per lo “sviluppo”¹⁰ e per l’“accrescimento”¹¹; quest’ultimo binomio è stato largamente usato da Darwin per chiarire un concetto biologico fondamentale, la differenza fra “crescita” e “sviluppo”; infatti, egli oppone l’adulto all’embrione nel senso che ogni essere vivente può continuare a crescere pur avendo cessato di svilupparsi. *I componenti del genoma opererebbero, quindi, attraverso cascate di segmenti di DNA codificanti organizzate in reti (“network”) molto complesse.* In tale sistema i segmenti di DNA “strutturali” agirebbero sulla base delle istruzioni fornite dai segmenti di DNA “regolatori” disposti a differenti livelli, tenendo presente che uno stesso segmento di DNA può assolvere sia la funzione “regolatrice” che quella “strutturale”. Al vertice di ciascuna cascata si troverebbero i segmenti di DNA “master”, capaci di influenzare in modo determinante il successivo svolgersi dell’“attività della cascata”. Un esempio di segmenti “master” è rappresentato da quelli “*hox*”¹² presenti in tutti gli animali “bilateri”, invertebrati e vertebrati, ove svolgono un ruolo determinante nell’organizzazione antero-posteriore del soma; gli stessi segmenti sono presenti anche nel lievito e in alcuni invertebrati primitivi ove, però, svolgono funzioni che, sebbene non ancora ben note, *sono sicuramente diverse* da quelle dei bilateri; ciò dimostra, se vi fosse ancora bisogno, *l’importanza del “contesto” in cui questi segmenti operano nel determinismo della struttura dell’organismo.*

Rollo (1994), pur riconoscendo l’importanza del modello “funzionale complesso”, propone il cosiddetto modello “misto” in cui si attribuisce una peculiare autonomia alle “cascate”.

input è “acceso”, il valore di uscita sarà “spento”; (ii) se l’operando di *input* è “spento”, il valore di uscita sarà “acceso”.

¹⁰ *Sviluppo*: variazione temporale di *forma* e di *struttura* di un individuo o di parte di esso (Bettini, 1972).

¹¹ *Accrescimento*: variazione temporale di *peso* e di *volume* di un individuo o di parte di esso (Bettini, 1972).

¹² *Segmenti di DNA “hox”*: scoperti negli anni ’80 e facilmente riconoscibili per la presenza di *homeobox*, cioè di sequenze di DNA quasi identiche di circa 180 bp, che codificano regioni polipetidiche specifiche (“domini”) di proteine di legame al DNA.

Una “rete complessa” può assolvere nuove funzioni o modificare la specificità molecolare entro il programma previsto o in altri programmi (Eizinger et al., 1999). Questo *interplay* (intergioco) fra *conservazione* e *cambio di specificità di azione* di singoli segmenti di DNA o di loro “reti” *può anche essere utile per l'interpretazione dei cambiamenti nel tempo* (cronogenetica).

La *complessità* della rete è da valutare ancora maggiore alla luce della funzione autocatalitica dell'RNA (*self splicing*) (Cech et al., 1981) nonché di quella del DNA (“depurinazione spontanea”) ¹³ (Amosova et al., 2006). Il predetto RNA è stato definito “ribozima”; termine, quest'ultimo, usato per indicare una molecola che è “strutturalmente” costituita da RNA ed è “funzionalmente” in grado di comportarsi anche da “enzima”. La funzione “autocatalitica” del DNA potrebbe svolgere un ruolo “utile” in quanto, modificando le proprietà “conformazionali” della doppia elica, potrebbe facilitare la formazione di complessi aperti “DNA-proteina” e/o giocare un ruolo nell’“impacchettamento” del DNA e/o facilitare eventi di “ricombinazione tra segmenti di DNA”.

Altri modelli di “reti” di segmenti di DNA sono:

- (a) il modello *bayesiano* ¹⁴, in cui i livelli di espressione sono definiti da probabilità *bayesiane*;
- (b) il modello *fuzzy* ¹⁵, in cui i livelli di espressione assumono valori continui nell'intervallo “0-1”; in *genetica quantitativa* un esempio potrebbe essere identificato nel “coefficiente di ereditabilità”, in cui la frazione “ambien-

¹³ Funzione “autocatalitica” dell’RNA e del DNA: fenomeno per cui l’RNA e il DNA si comportano da autocatalizzatori. Nel caso dell’RNA la funzione autocatalitica si concretizza nell’auto-escissione di segmenti di *origine intronica* dall’RNA prematuro (“*self-splicing*”). Nel caso del DNA la funzione autocatalitica si concretizza nella depurinazione spontanea cioè nel distacco della *base azotata guanina* dal deossiribosio della molecola di DNA; questa depurinazione sarebbe mediata da una struttura tridimensionale di “consenso” (*stem loop*: *stem* = stelo; *loop* = anello) che, rendendo i *siti purinici* del DNA più flessibili, faciliterebbe il distacco della base azotata. La depurinazione autocatalitica sarebbe favorita dal cosiddetto “stress superelicoideale fisiologico” che si manifesterebbe come riavvolgimento dell’asse del DNA a doppia elica su se stesso; questo riavvolgimento favorirebbe la formazione di strutture “*stem loop*” o di “consenso”. Considerando l’elevato numero di queste strutture tridimensionali, si ritiene che esse non sarebbero coinvolte nel fenomeno della “genesi” di mutazioni “puntiformi” dannose; si ipotizza che la depurinazione spontanea del DNA possa svolgere un importante ruolo nell’appaiamento dei cromosomi durante la meiosi.

¹⁴ Modello “bayesiano”: dal nome del matematico T. Bayes (1702-1761); le probabilità *bayesiane* sono interpretate come intervalli “fiduciali” nel verificarsi di un dato evento.

¹⁵ Modello “fuzzy”: la logica “fuzzy” (dall’inglese *fuzzy*= sfocato, confuso) è caratterizzata da: (a) *assenza del principio del terzo escluso*, secondo il quale ogni proposizione può essere “vera” o “falsa”, ma non può possedere contemporaneamente entrambi gli attributi; (b) appartenenza di un’entità a un insieme “graduale” (con valori compresi tra 0 e 1) anziché a uno “binario” (0 = “non appartenenza”; 1 = “appartenenza”) (Woolf e Wang, 2000; Resson et al., 2003).

tale” o quella “ereditabile” della “varianza fenotipica totale” può assumere un valore compreso fra “0” e “1”.

La *complessità* degli esseri viventi richiede un approccio “sistemico”; approccio identificabile con la “teoria generale dei sistemi”, resa ufficiale da L. von Bertalanffy nel 1945 e già espressa da Needham nel 1936. Secondo Needham, il sistema vivente è necessariamente “policromatico”, è una “complessità variegata” che si esprime in una essenza “singola”; pertanto, l’“interezza” dell’organismo è fondamentale nella *biocomunicazione*.

Bettini (1972) definì il sistema come “un insieme di processi interagenti caratterizzati da un numero più o meno grande di mutue relazioni funzionali” o, se si preferisce, “un complesso di eventi o di fenomeni di vita reale contrassegnati da scambievoli legami funzionali” (Matassino, 1978, 1984).

La “dinamica del fenomeno della complessità”, legata anche alle continue acquisizioni della *genomica* e della *proteomica*, nel loro significato più “lato”, evidenzia l’esigenza di una visione sempre più integrata “genotipo-fenotipo” nel funzionamento di qualsiasi “entità biologica”; funzionamento che potrebbe essere considerato, come nel “mandala” (Matassino, 1992b), il risultato delle interazioni di diversi sottosistemi (fig. 1).

2.1. *Pleiotropia*

La *dinamicità temporale e spaziale* rappresenta una delle principali caratteristiche dell’“attività funzionale” di un segmento di DNA; attività di per sé complessa e di non semplice definizione in quanto un segmento di DNA codificante “polipeptide/i” rarissimamente funziona da solo e/o possiede una singola funzione.

Le modalità grazie alle quali il “genotipo” “costruisce” il “fenotipo” sono fortemente *complesse* e ancora *in gran parte sconosciute*; l’esistenza di un numero sempre maggiore di segmenti di DNA a effetto “pleiotropico” evidenzia la difficoltà di definire la *funzione specifica* di un segmento di DNA.

La *pleiotropia* è un “fenomeno genetico” per il quale un unico segmento di DNA è in grado di influenzare “aspetti multipli” e “strettamente correlati” del “fenotipo” di un essere vivente. La prima osservazione di tale “fenomeno genetico” venne fatta da G. Mendel (1865) il quale notò come il “medesimo fattore ereditario” influenzasse sia il colore dei fiori sia quello del tegumento dei semi. H. Nilsson (1905) osservò che nell’avena vi era una stretta correlazione fra la pelosità dei culmi e la forma delle ariste. La dimostrazione della *pleiotropia* è complessa in quanto richiede che i “caratteri correlati” non solo

manifestino dissociazione nella discendenza ma abbiano sempre una stessa percentuale di scambio con i segmenti di DNA noti. Sebbene nel “settorre zootecnico” gli effetti *pleiotropici* siano stati spesso ipotizzati e siano stati oggetto di modelli sperimentali (Bettini, 1972), a oggi, sono ancora molto esigue le conoscenze relative al complesso biochimismo responsabile degli “effetti multipli”.

È acclarato che il “comportamento pleiotropico” può essere:

- (a) “modulare” (*modular pleiotropy*), quando le diverse “manifestazioni fenotipiche”, quali *espressione di un'unica mutazione, sono funzionalmente correlate*, nel senso che singole “unità funzionali” vengono influenzate distintamente dalla mutazione unica (Cheverud, 1996; Wagner, 1996; Wagner e Altenberg, 1996; Hansen, 2003; Welch e Waxman, 2003);
- (b) “ubiquitario” (*ubiquitous pleiotropy*), quando le diverse “manifestazioni fenotipiche”, quali *espressione di un'unica mutazione, non sono funzionalmente correlate*, nel senso che cambiamenti interessanti una data *manifestazione fenotipica* sono indipendenti da quelli di un'altra *manifestazione fenotipica* (Wright, 1968, 1980; Lande, 1980).

La *pleiotropia* potrebbe dipendere sia da *linkage* tra segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” che da presenza di una *correlazione genetica* tra questi “segmenti”. Quando l'effetto pleiotropico è “bilanciato” (uguale a 0), perché l'assetto allelico determina il sorgere di correlazione/i di ugual valore (sia in senso positivo che in senso negativo), si ha il fenomeno della pleiotropia “criptica” o “nascosta” (*hidden pleiotropy*) (Cheverud, 1984; Baatz, Wagner, 1997).

Attualmente, si ritiene che la maggioranza di questi “segmenti” a comportamento “pleiotropico” interessi soprattutto quelli coinvolti nello sviluppo e nelle risposte ormonali.

Ad esempio, la conservazione nel genoma di programmi “suicidi” che predispongono alla senescenza viene associata a un effetto “pleiotropico”; il complesso processo di *remodelling* (“rimodellamento”) che l'organismo attua in tarda età, realizzando soluzioni di compromesso differenti da quelle che risultano ottimali in età giovanile, si concretizza in un “pleiotropismo all'inverso”. Pertanto, gli stessi “segmenti” sarebbero responsabili di elevati livelli di efficienza nella fase giovanile, favorendo una forte sopravvivenza degli individui “portatori”, quindi di una loro “affermazione riproduttiva”, e sarebbero responsabili di una scarsa attività di “compromesso” (*remodelling*) nella fase “post-riproduttiva” con conseguente accelerazione dell'invecchiamento. Sembrerebbe, quindi, che l'accesso a un'età centenaria dipenderebbe da *segmenti di DNA* che si *comporterebbero in modo diametralmente opposto in relazione*

all'età dell'individuo; detti "segmenti" favorirebbero un maggiore rischio di mortalità nell'età "giovane" e consentirebbero un più proficuo "compromesso biologico" nell'età "senile" (Bartoletti, Terranova, 2002).

La sequenza temporale di attivazione dei vari segmenti di DNA è, indiscutibilmente, legata alla "stabilità" dell'informazione che decade *universalmente* e *progressivamente* nel tempo, poiché il tempo "biologico" viene *consumato* e non *sostituito*; ciò comporta come "effetto finale" un esaurimento dell'arsenale di cui l'individuo è in possesso.

Altro esempio dell'effetto di "compromesso biologico" è quello che regola l'attività di proteine cosiddette "bifronti", ampiamente presenti in natura, quale, ad esempio, la proteina Id2¹⁶ del tessuto nervoso; questa proteina, dopo aver svolto l'attività fisiologica di induzione della divisione cellulare durante lo sviluppo embrionale del sistema nervoso, può assumere una duplice funzione: (a) "negativa", nel promuovere la proliferazione di tumori del sistema nervoso in età pediatrica; (b) "positiva", nel favorire, *in vitro*, la crescita dell'assone in neuroni *"differenziati"* dello strato granuloso della corteccia cerebellare prelevati da ratti al 6. giorno di vita postnatale.

Questo "compromesso funzionale" sarebbe assicurato dal complesso enzimatico APC¹⁷ che, *attivando la degradazione della proteina Id2, ne impedisce l'accumulo*; la riduzione di Id2 promuoverebbe l'azione di fattori di trascrizione di un *cluster* di segmenti di DNA, tra i quali quello codificante il recettore *Nogo*, elemento chiave nell'inibizione dello "sviluppo" degli assoni; l'accumulo della proteina Id2 nel "neurone" reprimerebbe l'azione dei suddetti fattori di trascrizione promuovendo lo sviluppo dell'assone (Lasorella et al., 2006).

Nel *campo umano*, una *base genetica pleiotropica* viene riconosciuta a molte malattie. Come riportato da Matassino (2005b), un esempio è rappresentato dalla sindrome di *Hutchinson-Gilford* o "progeria infantile"¹⁸; responsabile della malattia è una *mutazione puntiforme* nel segmento di DNA codificante le proteine della membrana nucleare: "lamina A" e "lamina C"¹⁹. La mutazio-

¹⁶ *Proteina Id2*: proteina inibitrice del differenziamento.

¹⁷ *Complesso enzimatico APC*: complesso promotore dell'anafase che, trasferendo molecole di *ubiquitina* alla proteina "bersaglio", la "marca" affinché venga "riconosciuta" dal proteosoma 26S per la degradazione.

¹⁸ *Progeria infantile*: malattia genetica rara a insorgenza *post-natale* caratterizzata da invecchiamento e da mortalità precoce; le principali manifestazioni cliniche comprendono l'*alopecia*, la *cute sottile*, l'*ipoplasia ungueale*, la *perdita del grasso sottocutaneo*, la *rigidità articolare* e l'*osteolisi*.

¹⁹ *Lamina A e C*: proteine la cui elevata "omologia di sequenza" suggerisce un'unica origine: lo "splicing alternativo" a livello dell'esone 10 genererebbe due diversi *mRNA* codificanti le proteine.

ne comporta l'attivazione di un sito di “*splicing* non corretto” che si traduce nella delezione di 50 amminoacidi nella regione carbossilica terminale della proteina “lamina A”, comportante la presenza di una “lamina A” “imperfetta o difettosa”. Scaffidi e Misteli (2005) hanno sintetizzato un breve segmento di DNA modificato avente come bersaglio il sito di “*splicing* errato” sul *pre-mRNA* codificante la proteina “lamina A”; quest'oligonucleotide fungerebbe da “cerotto molecolare” in grado di favorire il “nascondimento” del “sito non corretto” dall'azione di *splicing* (“taglio”) evitando così la sintesi della proteina “lamina A” difettosa.

Nel “ceppo selvatico SM”²⁰ del batterio *Pseudomonas Fluorescens* SBW 25 sono stati caratterizzati effetti “pleiotropici” di una mutazione puntiforme a carico della regione codificante del segmento di DNA *wspF*; mutazione che rende il “ceppo mutato LSWS”²¹ in grado di colonizzare un nuovo microambiente (Knight et al., 2006). Tale mutazione “adattativa”²², o meglio partecipativa al “costruttivismo”, determina effetti “pleiotropici” che si estrinsecano anche in differenze di natura quantitativa ($P < 0,05$) tra il ceppo “SM” e quello “LSWS”. Questo “pleiotropismo” si concretizza, a oggi, nella sintesi di ben 52 proteine che, in vario grado, vengono coinvolte nel metabolismo del singolo “ceppo”.

Una mutazione può riguardare anche una semplice regione “regolatrice” di un segmento di DNA “pleiotropico”. Prud'homme et al. (2006), in *Drosophila*, hanno evidenziato che mutazioni differenti nella regione “regolatrice” del “segmento pleiotropico *yellow*”²³ sarebbero responsabili della “presenza” o dell’“assenza” della “macchia scura puntiforme sull'ala del maschio” a seconda della specie. L’“ipoespressione” del segmento di DNA determina una colorazione uniformemente grigia sull'ala del maschio di *Drosophila melanogaster* mentre l’“iperespressione” è responsabile di una “macula” scura in posizione distale nella parte anteriore dell'ala nel maschio di *Drosophila biarmipes*. Questa categoria di mutazioni potrebbe fornire una qualche spiegazione all'ipote-

²⁰ Ceppo selvatico SM: *Smooth morphology* = morfologia “liscia”; ceppo che, nella fattispecie, è caratterizzato da colonie su piastra con aspetto “liscio”.

²¹ Ceppo mutato LSWS: *Large Spreading Wrinkly Spreader Strain* = aspetto tendenzialmente rugoso delle colonie su piastra; ceppo che, nella fattispecie, è caratterizzato da colonie su piastra con aspetto “rugoso”.

²² Mutazione “adattativa”: termine introdotto da Cairns et al. (1988) per indicare una mutazione “non casuale” che rende i microrganismi, posti in condizione di *carenza nutrizionale*, capaci di utilizzare prontamente l'unico nutriente disponibile.

²³ Segmento di DNA “*yellow*”: segmento di DNA codificante una proteina necessaria per la sintesi di pigmentazione nera.

si di “evoluzione convergente”²⁴. Gli Autori hanno ipotizzato che la succitata “ipoespressione” potrebbe essere spiegata dalla presenza di una mutazione a carico di un “elemento regolatore” responsabile della disattivazione del segmento di DNA “yellow”, nonostante che la *Drosophila melanogaster* e la *biarmipes* abbiano un antenato comune caratterizzato da ala “maculata”. Nelle specie *Drosophila biarmipes* e *tristis* la macula si sarebbe formata indipendentemente grazie all’azione di due diversi “elementi regolatori”. *Sarebbero stati gli “elementi regolatori” a far variare e a determinare l’espressione del “segmento pleiotropico yellow” e quindi la comparsa di nuove manifestazioni fenotipiche.*

Nel “campo zootecnico”, un esempio di “pleiotropia” è fornito, nel pollo, dal segmento di DNA recessivo autosomico “psp” (*polidattilia-sindattilia-ptilopodia*) che, nella condizione di *omozigosi recessiva*, è responsabile del fenotipo “dita soprannumerarie e fuse con tarsi impiumati”. Altra *manifestazione fenotipica* con base “pleiotropica” è la “doppia muscolatura” o “doppia groppa”. Nella specie *bovina*, responsabili di tale fenotipo sono mutazioni a carico del segmento di DNA codificante la *miostatina*; dette mutazioni causerebbero “effetti multipli” a carico del *tessuto muscolare* e di quello *adiposo*. La base “pleiotropica” di tale fenotipo evidenzia l’importanza di *verificare gli effetti fenotipici multipli quando si intraprendono programmi di selezione tendenti al miglioramento del rapporto “massa muscolare”/“grasso” affinché non siano compromessi altri aspetti produttivi e riproduttivi influenzati dalla pleiotropia* (Short et al., 2002).

Nell’era post genomica, diventa sempre più importante spostare l’attenzione dall’“identità dei segmenti di DNA” alla “loro espressione” e al contesto in cui essi operano al fine di ridurre lo “iato” fra il “genotipo” e il “fenotipo”.

3. INTEGRAZIONE “GENOTIPO-FENOTIPO”

Il dualismo “genotipo-fenotipo”, teoricamente, inizia con la riscoperta delle leggi di Mendel (inizi 1900) (scoperte nel 1865), nonché con la disputa del dualismo “somatico-germinale” di Weissman (1883, 1885). Successivamente, fondamentali sono stati i concetti elaborati da Waddington (1942, 1953, 1957), su base sperimentale e teorica, come quelli di:

(a) “paesaggio epigenetico”²⁵;

²⁴ “*Evoluzione convergente*”: meccanismo evolutivo che si manifesta originando “similarità somatiche” in specie e in tempi diversi, secondo modalità indipendenti.

²⁵ *Paesaggio epigenetico*: raffigurato come “paesaggio” in cui le vie che possono essere “imboccate”

(b) “canalizzazione dello sviluppo”²⁶;

(c) “assimilazione genetica”²⁷.

Nel 1949 Schmalhausen ha introdotto il concetto di “norma di reazione” che *non va considerata «espressione statica del cambiamento di un “carattere”»* (o “manifestazione fenotipica”) *ma*, come evidenziato anche da Bettini (1972) e da Matassino (1978), *«fenomeno dinamico che si verifica in un determinato contesto microambientale sotto l'azione del “genoma”*. Stimoli ambientali possono portare alla espressione di una “variabilità genetica latente” e i fenotipi relativi, sortiti dall'ambiente dopo lo “screening” effettuato dalla selezione naturale, possono essere “assimilati geneticamente”. Ad esempio, in *Drosophila*, quando la proteina da shock termico Hsp90 non è manifesta, o per mutazione o per inibizione da farmaci o da shock termico, si rivela una variabilità genetica “criptica” che viene espressa nella generazione successiva (fenomeno della “capacitazione”²⁸) (Rutherford e Lindqvist, 1998).

L’“assimilazione genetica” e la “capacitazione” sono indicative della importanza di mantenere elevato il livello di biodiversità quale *strumento principe che permette alla natura di sincronizzarsi alla velocità dei cambiamenti ambientali*; pertanto, la biodiversità è da considerarsi sia anello di congiunzione con il passato sia base del divenire biologico. È merito della diversità biologica il continuo miglioramento qualitativo dell'informazione, quindi del grado di

durante lo “sviluppo ontogenetico” sono paragonate a una serie di percorsi che una pallina può intraprendere e la cui *scelta iniziale è casuale*; piccole variazioni della traiettoria sono responsabili delle più svariate posizioni che la pallina può assumere al termine del percorso scelto; pertanto, le forme osservate nei diversi stadi di sviluppo e/o le vie di attivazione dei segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” sono paragonabili a percorsi di sviluppo in un “paesaggio epigenetico” in cui ciascuno stadio serve da “battistrada” per il successivo e, contemporaneamente, costituisce un punto di diramazione di molte altre vie.

²⁶ *Canalizzazione dello sviluppo*: comprende le modalità di comportamento che consentono un adattamento (oggi “capacità al costruttivismo”) alle variazioni ambientali temporanee costringendo o *canalizzando* lo sviluppo verso vie alternative; secondo la dottrina filosofica “realistica” inglese riconducibile a *L'évolution créatrice* di H. Bergson (1907), non vi potrebbe essere “evoluzione” senza “canalizzazione”, la quale è resa possibile da “dighe” o, fuori metafora, da “piani di organizzazione cosmica” che ne disciplinano il flusso (Bettini, 1972).

²⁷ *Assimilazione genetica*: fenomeno consistente in una *modificazione fenotipica* dovuta a stimoli ambientali (“plasticità fenotipica”), *inizialmente non ereditaria*, la quale successivamente *diventa trasmissibile*; Rutherford e Lindqvist (1998) hanno interpretato l’“assimilazione genetica” in termini di manifestazione di una variabilità genetica “criptica” in determinate condizioni ambientali; il meccanismo biologico dell’“assimilazione genetica” è “importante” ai fini dell’*evoluzione della specie*; ad esempio, secondo Hodin (2000), alcune “convergenze” come le pinne dei pesci e quelle dei cetacei (distanti filogeneticamente) sarebbero maggiormente legate alla “plasticità fenotipica” e alla sua “assimilazione genetica”.

²⁸ *Capacitazione*: fenomeno per cui, a seguito di *stress* ambientali, si ha la riattivazione di potenzialità genetiche represses; riattivazione concretizzantesi nello sviluppo di nuovi “fenotipi”.

fitness o successo biologico di un dato tipo genetico al variare delle condizioni ambientali. Pertanto, la eventuale riduzione della variabilità genetica comporterebbe una diminuzione sia della capacità di “autoregolazione” che della propensione al “costruttivismo” dei sistemi biologici (Matassino, 1989c, 1990, 1992b, 1996, 2001a, 2004a, 2005a). La principale causa di “biodiversità” risiede nell’eterogeneità dei sistemi viventi; *l’eterogeneità è la norma* e, in biologia, vengono selezionati negativamente i meccanismi che tendono a limitare la variabilità genetica; ogni essere vivente possiede una propria individualità che viene “codificata” nel proprio “genoma” e viene “costruita epigeneticamente” (Matassino, 2004a). I “canoni etici” che scaturiscono dalle profonde e articolate riflessioni sulla “complessità del vivente” inducono a ipotizzare un “federalismo biologico” in grado di “riconferire” importanza e dignità alla “biodiversità antica autoctona” considerata come parte integrante di un “bioterritorio” (Matassino, 2005a). Questo “federalismo biologico” configura “un nuovo soggetto nel mondo del diritto per la contestuale presenza di quegli elementi che determinano la rilevanza giuridica di un bene e che consentono di riconoscerne la giuridicità” (Mazziotta e Gennaro, 2002).

Qualunque “filiera produttiva” basata sulla utilizzazione dell’animale in produzione zootecnica ha le sue fondamenta sulla relazione tra “biologia” e “poiesi”. La “biopoiesi” dovendo soddisfare, *primariamente*, esigenze dell’uomo “nutrizionali”, “extranutrizionali” e “salutistiche”, variabili nel “tempo” e nello “spazio”, affonda le sue radici nell’incommensurabile terreno della “biodiversità”. La conoscenza delle interazioni tra le caratteristiche molecolari “peculiari” dei tipi genetici autoctoni, specialmente antichi (TGAA) e le caratteristiche del *bioterritorio* in cui essi sono inseriti è *fondamentale per il continuo miglioramento quali-quantitativo di una “biopoiesi”*. Pertanto, l’ottimizzazione delle funzioni dell’“animale allevato ai fini produttivi” deve scaturire dalla conoscenza dello stesso sotto il profilo genomico, trascrittomico, proteomico, aromomico, glicomico, lipidomico e metabolomico in un contesto *bioterritoriale* in senso “lato”. L’integrazione tra questi suddetti profili potrebbe contribuire alla conoscenza dei diversi fattori che influenzano la variabilità delle caratteristiche qualitative delle produzioni animali; fattori che agiscono *infra vitam* e *post mortem* nei diversi momenti della filiera produttiva (Matassino, 2006b; Matassino et al., 2006d ed e).

Nel 1972 Bettini ha introdotto il concetto di “attributo di un oggetto del sistema animale a qualsiasi livello di organizzazione” in sostituzione del termine “carattere” o “manifestazione fenotipica”. Conseguentemente, il tipo di variazione della “manifestazione fenotipica” diventa una funzione parametrica dell’attributo, per cui si passerebbe a una genetica:

- (a) *informatica* propria degli acidi nucleici, del codice genetico e della sua trascrizione;
- (b) *cibernetica* rispetto al *canale interno* o *genetica dello sviluppo* o *fisiologia del segmento di DNA*;
- (c) *cibernetica di campo* nel senso di dinamica della variazione come risultato delle interazioni “genoma-ambiente” entro e fra gli individui.

La *complessità* della manifestazione fenotipica “produttività” suggerisce una revisione nel modo di considerare il “fenotipo” in un piano di miglioramento delle prestazioni degli animali in produzione zootecnica; in tale contesto, il “carattere” va inteso come espressione di un particolare aspetto del fenotipo visto anche sotto un profilo “tecnologico” e, pertanto, non solo “biologico” (Bettini, 1988; Matassino, 1988).

Il codice genetico è protetto da sistemi di *informazione*, di *controllo* e di *retroazione*. Già a livello individuale, le retroazioni (*biochimiche*, *fisiologiche* e *comportamentali*) sono piuttosto complesse; a livello di popolazione sono estremamente ancora più complesse e difficili da interpretare (Bettini, 1972). Infatti, la “costruzione” di un “fenotipo” si realizza secondo 3 *diversi livelli* di *retroazione* “positiva” e “negativa”:

- (a) *interazione intra DNA* codificante “polipeptide/i” (fenomeno della dominanza e della epistasi);
- (b) *interazione fra proteine*, RNA e DNA (fenomeni di *feedback* grazie alla “trascrizione” e alla “traduzione”);
- (c) *interazione fra proteine e altre biomolecole* a livello sia *intracellulare* che *intercellulare*.

I suddetti tre livelli sono fortemente influenzati da *fenomeni epigenetici* dovuti a fattori sia *esogeni* che *endogeni* responsabili di un vero e proprio “epigenotipo”, nel significato proposto da Waddington (1957), in base al quale *l'individuo non sarebbe un semplice mosaico di caratteri controllati dai segmenti di DNA codificanti “poliptideli”, ma un sistema caratterizzato da mutue interazioni e da equilibri tra forze opposte*.

Sul piano descrittivo, probabilmente, sarebbe possibile definire *fenotipicamente* una popolazione rispetto a un elevato numero di “caratteri” (biochimici, comportamentali, fisiologici, immunitari, somatici, ecc.) con qualsiasi grado di approssimazione desiderabile; tuttavia, resterebbe da stabilire quale significato è da attribuire alle differenze osservate nella manifestazione di un carattere, metrico o comunque, a effetto visibile e misurabile, nel senso di ripartire le suddette differenze in quelle di natura “ambientale” e in quelle di natura “genetica” (Bettini, 1972; Matassino, 1978).

Questi concetti evidenziano che l'espressione dei segmenti di DNA è influenzata da *interazioni* tra *citoplasma* e *nucleo*, le quali *impediscono l'esistenza di una corrispondenza univoca fra "genotipo" e "fenotipo"*, nel senso che lo stesso "genotipo" può esprimere diversi "fenotipi" e che "fenotipi molto simili" possono essere la manifestazione-espressione di "genotipi" diversi.

Negli anni '70 e '80 sono stati introdotti i concetti di "coniugazione della filogenesi e della ontogenesi" e di "constraint"; a partire dal 1999, il concetto di coniugazione "*filogenesi-ontogenesi*" è stato espresso come EVO-DEVO²⁹.

Constraint. Il termine "*constraint*"³⁰ (vincolo), nel significato più accettato, può essere identificato in "ciò che dirige altri tipi di cambiamenti o che impedisce quei cambiamenti che sarebbero operati dalla selezione"; *in senso lato*, il "constraint" è "*un fattore che costringe o canalizza i cambiamenti fenotipici in una direzione stabilita dalla storia passata o dalla struttura formale, anziché dal corrente adattamento*" (Gould, 1989).

È possibile individuare le seguenti categorie di *constraint*:

- (a) *strutturale*;
- (b) *di sviluppo*;
- (c) *filogenetica*;
- (d) *genetica*;
- (e) *epigenetica*;
- (f) *comportamentale*;
- (g) *ecologica o ambientale*;
- (h) *selettiva*.

Uno dei più importanti aspetti potrebbe identificarsi con il meccanismo di "assimilazione genetica"²⁷, processo fondamentale della *biologia epigenetica dello sviluppo*, che Waddington (1957, 1975) ha evidenziato in *Drosophila*. La produzione di un nuovo assetto genetico, dovuto all'"assimilazione genetica" del nuovo fenotipo, è favorita dalla cosiddetta "selezione naturale" nel corso

²⁹ EVO-DEVO (*Evolutionary developmental biology*= *biologia evolutiva dello sviluppo*): concetto che, sebbene formalizzato nel 1999, può essere fatto risalire a: (a) Gould (1977), che intuì l'importanza dell'"eterocronia" (cambiamenti dello "sviluppo" nel tempo) quale meccanismo di evoluzione; (b) Lewis (1978) che, con lo studio sistematico in *Drosophila* delle mutazioni dei segmenti di DNA "omeotici" (dal greco: *ὁμοίωσις* = *somiglianza*), ha inserito i concetti di "evoluzione" e di "sviluppo" nella *genetica molecolare*; si ricorda che H. Bateson (1894) ha introdotto il concetto di "omeosi" per indicare "mutazioni" in grado di far sviluppare un organo in una sede "inappropriata" (ad esempio, un "arto" al posto di un'"antenna").

³⁰ *Constraint*: termine proposto da Gould (1989) e che ha nella sua radice etimologica latina il significato di "stringere" in senso sia *positivo* che *negativo*.

dell'evoluzione ma, come nel caso dell'affine *effetto Baldwin*³¹ (1986), il fenomeno è “canalizzato” cioè guidato da *precisi stimoli ambientali* (Sarà, 2002).

Un fenomeno collegato all'“assimilazione genetica” può essere considerato quello dell'esistenza di *fenocopie* (Kauffman, 1993).

Sarà (1993), considerando *l'influenza dei constraint “interni” ed “esterni” sul “fenotipo”*, ha proposto di ripartire il “processo evolutivo” in due fasi:

- (a) “costruttiva-epigenetica” che si verifica a livello di *singolo organismo*;
- (b) “selettiva” che si verifica a livello di *popolazione*.

È noto che i vari “caratteri” o “manifestazioni fenotipiche” (comprese quelle comportamentali) di un organismo vivente sono ampiamente sottoposti all'effetto di una diversificata serie di “vincoli” che, indubbiamente, interagiscono con la “selezione”, sia essa naturale che zootecnica. In una visione “organismica” si parla di “constraint ecosistemici”. D'accordo con Sarà (1998), la relazione tra “selezione” e “constraint” è “reciproca”; questa “reciprocità” può condurre al sorgere di nuovi “fenotipi ereditabili”, nel senso che questi fenotipi sono il risultato sia dell'“estrinsecazione” del loro genoma sia del loro “epigenoma”. *Olisticamente, l'essere vivente va considerato come un “intero biologico” e non come un “semplice montaggio” di parti separate.* Una esemplificazione di questo complesso “processo funzionale” può essere quello riportato nella figura 2 che si riferisce alla rappresentazione della “rete di vincoli” e del probabile “sistema operativo”; sistema comprendente sia la fase di “capacità al costruttivismo” (Matassino, 1989c, 1992b; Lewontin, 1993, 2004) del *singolo organismo* che quella “selettivo-stocastica” operativa a livello popolazionistico. Dall'esame della figura 2 si evidenzia come alcuni “constraint” (genetici e filogenetici) e la fase di ottenimento genotipo/fenotipo sono compresi nell'area di “transvariazione” fra le due fasi: *organistico “costruttiva” e popolazionistico “selettivo-stocastica”*. Certamente, in questo contesto non avrebbe *semanticità* un approfondimento del meccanismo biologico comprendente l'effetto dei “constraint” (vincolo).

Ribotipo. Nella realizzazione del fenotipo grande importanza assume il concetto di “ribotipo” introdotto da Barbieri (1981) quale sistema intermedio tra il “genotipo” e il “fenotipo”; tale concetto è stato ripreso da Herbert e Ritch (1999), i quali hanno definito il “ribotipo” come “l'insieme della sequenza nucleotidica dell'RNA di un individuo”, sottolineando l'importanza della sua funzione negli organismi eucarioti.

In accordo con Sarà (2002), il DNA sarebbe solo un genoma “virtuale” nel senso che esso non specificherebbe “direttamente” il fenotipo, ma *solo il “pos-*

³¹ *Effetto Baldwin*: effetto consistente nel *maggiore accumulo* di mutazioni “favorevoli” a sostegno di “caratteri indotti” dall'ambiente.

sibile” fenotipo attraverso gli RNA. Si ritiene che l’RNA, coniugando capacità catalitica e informativa, abbia svolto una funzione fondamentale per l’origine della vita (cosiddetto “mondo a RNA”). Successivamente, si sarebbe evoluta la triade “DNA-RNA-proteine” in cui l’RNA eserciterebbe una funzione fondamentale di “raccordo”. Fondamentale per la formulazione dell’ipotesi dell’RNA quale *molecola* “primordiale” è stata la “scoperta” della funzione “autocatalitica” o di “*self splicing*” dell’RNA (ribozima); *il ribozima, quale traccia determinante del passato conservata nella biochimica delle cellule attuali*, può essere quindi considerato un “*fossile molecolare*” (Cech et al., 1981). Kun et al. (2005) hanno evidenziato che i ribozimi tollererebbero positivamente eventi di mutazione “multipla”³², anche con una frequenza di errore pari a 1 nucleotide³³ ogni 1000, senza un’alterazione della propria funzionalità; la possibilità di conservazione di detta funzionalità sarebbe assicurata dalle seguenti condizioni:

- (a) mantenimento della struttura secondaria quale fattore chiave per l’attività enzimatica;
- (b) conservazione di regioni “critiche” nella molecola a livello delle quali la natura della base azotata presente è fondamentale.

Sulla base di simulazioni informatiche si è stimato che i ribozimi potrebbero raggiungere lunghezze di 7000-8000 nucleotidi pari a circa 50-100 segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”; valore, quest’ultimo, che non si discosterebbe molto dal numero minimo di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” ritenuto essenziale per garantire la vita a un organismo semplice quale un batterio. Ciò supporterebbe l’ipotesi dell’“autonomia primordiale” dell’RNA.

Il “ribotipo” avrebbe un ruolo centrale nel processo evolutivo. Secondo Herbert e Rich (1999), i differenti “ribotipi” potrebbero essere sottoposti a selezione naturale in base ai fenotipi prodotti anche se questa selezione implica la necessità di ereditare i fenotipi “di successo”.

L’importanza del *ribotipo* come “agente intermediativo ed evolutivo” nella cellula è stata evidenziata da Barbieri (1998) sulla base dell’esistenza di codici legati all’RNA:

- (a) *codice* genetico che si esprime nella formazione del trascritto primario (*pre-mRNA*);

³² *Mutazione multipla*: presenza di più mutazioni puntiformi (v. n. 111) a carico di una molecola di DNA o di RNA; l’effetto delle mutazioni multiple è “moltiplicativo”.

³³ *Nucleotide*: costituito da un *nucleoside* {*zucchero* (deossiribosio nel DNA e ribosio nell’RNA) + *base azotata* [purina (adenina o guanina) o pirimidina (citosina o timina nel DNA; uracile nell’RNA)]} legato a un *gruppo fosfato*.

- (b) codice che regola una “prima tappa” *epigenetica post-trascrizionale* (*splicing*³⁴ ed *editing*³⁵ del *pre-mRNA*);
- (c) codice che regola una “seconda tappa” *epigenetica post-trascrizionale* (traduzione dell'*mRNA* in polipeptide).

Attraverso *questi tre codici*, con particolare riferimento agli ultimi due (“plurimi”³⁶ e “dinamici”), l’informazione passa da un tipo di molecola a un altro con un concomitante “salto di significato” del messaggio iniziale rendendo il fenotipo “dinamico” e “creativo”. L’ipotesi dei “codici plurimi”, ognuno dei quali rappresenta una “finestra” aperta agli “*stimoli periferici*” *esogeni* ed *endogeni*, conferisce una visione “organismica” dell’integrazione “genotipo”-“fenotipo” con un aumento dei “gradi di libertà” del sistema, considerando che ogni codice corrisponderebbe a un grado di libertà (Sarà, 2002).

3.1. *Epigenetica*

Il “codice genetico” può essere ritenuto il “prototipo” di infiniti sistemi di vita fortemente flessibili grazie all’influenza dei fattori epigenetici (Matassino, 1992b).

Le recenti acquisizioni scientifiche evidenziano in modo sempre più incontrovertibile l’importanza dell’*epigenetica* che, in senso lato, può essere intesa come: “modificazioni temporanee o permanenti dell’attività dei segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” dovute all’effetto dei fattori ambientali (Matassino, 1999).

L’epigenetica è stata definita da Wolffe e Matzke (1999), in senso stretto come: “lo studio dei cambiamenti ereditari nell’espressione del DNA senza il verificarsi di un cambiamento nella sequenza dello stesso”.

Tenendo conto delle suddette due definizioni saranno presi in esame:

³⁴ *Splicing*: a oggi, sono noti i seguenti meccanismi: (a) *splicing* del *pre-tRNA* in *tRNA* maturo; (b) *splicing* del *pre-mRNA* in *mRNA* che, a sua volta, può essere: (i) *costitutivo*: gli introni vengono “tagliati” e gli esoni vengono “assemblati” nello stesso ordine in cui si trovano nel segmento di DNA originale; (ii) *alternativo*: gli introni vengono “tagliati” e gli esoni vengono “assemblati” con sequenze alternative che danno origine a *mRNA* differenti (*co-trascritti*); (c) *self splicing* (*auto splicing*) (v. n. 13).

³⁵ *Editing*: meccanismo mediante il quale la sequenza nucleotidica degli *mRNA*, dei *tRNA* e degli RNA ribosomiali (*rRNA*) viene modificata dopo la trascrizione; le modificazioni note dalla letteratura consultata variano dall’inserimento o delezione di uridina (U) o di citosina (C) negli *mRNA* mitocondriali del tripanosoma alla sostituzione di specifici residui di C con residui di U negli *mRNA* mitocondriali delle piante, fino alla sostituzione di specifici residui di adenina (A) con residui di inosina (I) negli *mRNA* nucleari delle cellule di mammifero.

³⁶ *Codice plurimo*: codice la cui lettura è variabile.

- (a) *epimutazione*;
- (b) *paramutazione*;
- (c) *polifenismo*;
- (d) *impronta genitoriale (parental imprinting)* con riferimento, segnatamente, alla *manifestazione fenotipica "callipige"*.

Inoltre, particolare enfasi sarà data alla *cronogenetica* e alla *cronobiologia*, fenomeni biologici che possono essere considerati l'effetto di un compromesso tra l'"orologio biologico" interno e gli agenti "sincronizzatori" esterni.

Il "sistema epigenetico" regola l'espressione dei segmenti di DNA nella fase sia *pre-trascrizionale* sia *post-trascrizionale* e, di conseguenza, regola i processi di differenziamento cellulare e la morfogenesi. In primo luogo, il "sistema epigenetico" influenza l'espressione di segmenti di DNA in base alle informazioni che provengono a questo DNA dal "sistema sensitivo" che, essendo costituito da recettori e da trasduttori (*signalling = trasduzione dei segnali*), gioca un ruolo notevole nel "dialogo molecolare". Dunque, il "sistema epigenetico" fungerebbe da raccordo tra il "sistema genetico" e il "sistema sensitivo"; questo raccordo è costituito da tutte le *interazioni molecolari, fisiche e chimiche* che si verificano nel biochimismo cellulare. L'*epigenetica* costituisce quella che potrebbe essere definita una "onnipervasiva collaborazione tra genotipo e fenotipo" (Sarà, 2002).

Landman (1991) ha proposto la distinzione dei "meccanismi epigenetici" in:

- (a) *nucleici*: caratterizzati da "perdita" di DNA e di RNA non essenziale o da "acquisizione" di nuovi segmenti di DNA mediante trasposizione;
- (b) *epinucleici*: caratterizzati dall'"ereditarietà" di modificazioni conformazionali del DNA dovute a:
 - (i) "metilazione"³⁷ della *base azotata* "citosa" con conseguente effetto di "silenzamento" o di "spengimento" dell'espressione di un segmento di DNA;
 - (ii) "acetilazione"³⁸ degli *istoni* legati ai complessi regolatori della trascrizione con conseguente effetto di "attivazione" o di "accensione" dell'espressione di un segmento di DNA;

³⁷ *Metilazione*: aggiunta di gruppi "metile" da parte di enzimi metiltransferasi; l'aggiunta interessa preferenzialmente la base azotata "citosa" di un nucleotide adiacente a un altro contenente la base azotata "guanina" sullo stesso filamento di DNA (isole CpG); la "p" (*phosphodiester*) indica che i due nucleotidi sono connessi tra loro mediante un legame fosfodiesterico che interessa i gruppi ossidrilici (OH) del deossiribosio; le isole CpG sono solitamente localizzate all'estremità 5' dei segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i"; le basi di citosina sono di solito metilate quando i segmenti di DNA sono inattivi, ma vengono demetilate prima dell'inizio della trascrizione.

³⁸ *Acetilazione*: aggiunta di gruppi "acetile" alle proteine istoniche da parte di enzimi acetiltransferasi.

- (iii) attivazione di *promoter alternativi* di uno stesso segmento di DNA che ne modulano l'espressione in rapporto alle condizioni ambientali;
- (c) *extranucleici*: caratterizzati dall'ereditarietà di un *pattern morfogenetico* prodotto da una espressione di segmenti di DNA codificanti stabilizzata da fattori citoplasmatici.

L'esistenza dei processi epigenetici è stata convalidata da risultati di ricerche finalizzate all'ottenimento di organismi transgenici (OT), comunemente detti organismi geneticamente modificati (OGM); infatti, sebbene i segmenti di DNA introdotti s'integrassero come "copie multiple" o fossero "identici" alla sequenza "endogena", l'effetto si concretizza, contrariamente alle aspettative, non in un aumento di espressione, ma in un vero e proprio "silenziamiento trascrizionale" di segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i".

Secondo Jablonka e Lamb (1989, 1995) uno "*stato epigenetico*" può essere trasmesso ai discendenti anche se con ereditarietà diversa da quella mendeliana (EIS, *epigenetic inheritance system* = sistema di ereditarietà epigenetica); normalmente esso viene annullato al momento della riproduzione sessuale. Nei *mammiferi*, un particolare tipo di "eredità epigenetica" è riscontrabile nelle "proteine prioniche", le quali dipendono dal codice genetico solo per la forma "normale" (PrP^c, *cellular prion protein*); quest'ultima è responsabile di isoforme (PrP^{Sc}, *scrapie prion protein*) che trasmettono il loro stato alterato ad altre proteine normali. Nelle divisioni cellulari, questo fenotipo "prionico" viene trasmesso ereditariamente da una generazione cellulare alla successiva (Pagel e Krakauer, 1996). Trattasi di una trasmissione "molecolare fenetica" piuttosto diffusa, cioè di una eredità basata sulla "conformazione proteica".

Gli *effetti epigenetici ereditabili* possono influenzare la dinamica di popolazione e quindi l'evoluzione dei "caratteri" (Rossiter, 1996). Casi in cui gli "stati epigenetici" vengono ereditati stabilmente sono quelli che si possono identificare, a oggi, con le "epimutazioni" e con le "paramutazioni", entrambe scoperte per la prima volta nel regno vegetale.

Epimutazione. Essa consiste in una alterazione dei normali meccanismi epigenetici; nel regno vegetale, la maggiore frequenza di epimutazione può essere attribuita all'assenza di separazione precoce tra *soma* e *germe* e alla possibilità di una sua trasmissione per via "agamica". Cubas et al. (1999), nel valutare una variazione naturale nella simmetria del fiore *Linaria vulgaris*, hanno osservato che il fenotipo mutato dovuto a metilazione del DNA ("silenziamiento trascrizionale") tende a "revertire" durante lo sviluppo somatico come *conseguenza della sua minore stabilità*. Tuttavia, una "epimutazione" può essere stabile con l'aumentare di mutazioni nel DNA metilato. Recentemente, sono state riscontrate *epimutazioni* in *Drosophila* e in alcuni *mammiferi* nonostante

che in essi la differenziazione fra linea “somatica” e “germinale” sia precoce (Balter, 2000).

Nel topo, Morgan (1999) ha evidenziato che il colore della pelliccia può essere ereditato in modo stabile grazie a una epimutazione del segmento di DNA “agouti” lasciando intravedere, quindi, una certa labilità della barriera “somatico-germinale”.

Paramutazione. Essa è stata definita da Wolffe e Matzke (1999) come fenomeno che “trasgredisce” la prima legge di Mendel (*segregazione immutata nella progenie*) e che coinvolgerebbe interazioni “fisiche” trasmettenti uno stato o di “attività” o di “silenziamiento” di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” siti nello stesso *locus*; ad esempio, l’allele “paramutato” “silenzia” l’espressione dell’allele “normale”. Nella genesi della “paramutazione”, secondo Alleman et al. (2006), vi è assenza di interazioni fisiche tra gli alleli interessati; infatti, nel mais, questi Autori hanno evidenziato che la *paramutazione* è *genetica* in quanto mediata dal segmento di DNA *mop1*³⁹ codificante una RNA polimerasi RNA dipendente la quale sarebbe responsabile della sintesi di “RNA d’interferenza” in grado, nelle generazioni successive, di mantenere invariato lo *status* della *cromatina* associato alla *paramutazione*; *status* che può rappresentare un *meccanismo epigenetico* di regolazione *pre-trascrizionale*. Rassoulzadegan et al. (2006) hanno riferito sull’esistenza di “paramutazione” nel *topo*, evidenziando una *trasmissione anomala* del fenotipo “Kit” mediata da piccole molecole di RNA (*snRNA*). Infatti, negli individui “paramutati” si osservano:

(a) livelli dimezzati di *mRNA* codificante il recettore *Kit* al pari dei genitori portatori “eterozigoti” dell’allele *Kit^{tm1Aif}*⁴⁰;

(b) accumulo di piccole molecole di RNA (*snRNA*) assenti nei genitori portatori “eterozigoti” dell’allele *Kit^{tm1Aif}*; questi *snRNA* permetterebbero ai figli *privi dell’allele Kit^{tm1Aif}* di manifestare il fenotipo caratterizzato da estremità bianca alla coda e agli arti, fenotipo tipico dei soggetti portatori di tale allele. Interessante è il riscontro che dall’accoppiamento di genitori “eterozigoti” rispetto all’allele *Kit^{tm1Aif}* si ha una elevata mortalità prenatale nella progenie “eterozigote” a dimostrazione che la “paramutazione” può avere un effetto parzialmente negativo.

Polifenismo. Fenomeno biologico dovuto agli effetti delle interazioni “genoma-ambiente” sui processi di sviluppo degli organismi. Si parla di *polife-*

³⁹ DNA *mop1*: *mediator of paramutation 1* = mediatore 1 della paramutazione.

⁴⁰ Allele *Kit^{tmAif}* mutato dal selvatico: la presenza di tale allele è responsabile di un fenotipo caratterizzato da coda e da arti con estremità bianche.

nismo quando la variabilità è “agenetica” (Mayr, 1963) e può essere a distribuzione o discreta o continua, che, a sua volta, può essere o gaussiana o bi o plurimodale.

È importante definire i limiti entro cui un “attributo” è “fenico”⁴¹, cioè quale è la misura di variazione di un dato “genotipo” al variare delle componenti ambientali. In natura, il *polifenismo* è particolarmente presente negli insetti organizzati in apposite “società” (api, formiche, termiti, ecc.). Questo *polifenismo* non dipenderebbe da differenze *interessanti la base* nucleotidica del DNA, ma dall'*espressione differenziale* di gruppi di segmenti di DNA coinvolti nello sviluppo larvale.

La *comunità delle api*, un'organizzazione sociale tra le più ammirevoli, si basa sulla *suddivisione in tre caste*: ape “regina”, ape “operaia” e “fucò”, che si aiutano e si integrano a vicenda per la sopravvivenza della comunità, sebbene esplichino funzioni ben differenziate⁴².

Il fenomeno della differenziazione in “regine” o “operaie” sarebbe da attribuire all’“accensione” o allo “spegnimento” di particolari gruppi di segmenti di DNA durante lo sviluppo larvale nelle due “caste” di api. In particolare, i risultati principali ottenuti da Evans e Wheeler (2000) hanno evidenziato che:

- (a) fino al *secondo stadio larvale* i profili di espressione di questi segmenti sono simili nelle larve destinate a diventare “regine” e in quelle destinate a diventare “operaie”; le uniche differenze si evidenziano a carico di quei segmenti codificanti enzimi coinvolti nella *disattivazione degli ormoni steroidei*, con valori di attività di espressione più elevati nelle larve destinate a diventare “operaie”;
- (b) a partire dal *terzo stadio larvale* le differenze di espressione dei segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” tra “regine” e “operaie” interessano un numero maggiore di segmenti con particolare riguardo a quelli coinvolti nell'*accumulo di sostanze nutritive (amminoacidi) e nel metabolismo*;

⁴¹ “Fene”: inteso come “categoria” solo in senso statistico (Bettini, 1955, 1972, 1988).

⁴² *Comunità delle api*: l’ape “regina” svolge la funzione unica di deporre le uova per la conservazione della specie; le uova fecondate da uno degli spermatozoi custoditi nella spermateca danno origine a femmine “diploidi”, mentre quelle non fecondate danno origine a maschi *aploidi*; l’ape “operaia”, definita anche “femmina imperfetta” (apparato riproduttore atrofizzato), è l’unica abilitata *fenotipicamente* alla secrezione della “pappa reale”; in casi “eccezionali”, l’operaia acquisisce la capacità di deporre *uova partenogenetiche* (massimo 4), cioè uova che si sviluppano in embrione senza essere state fertilizzate e quindi “fucali”; il “fucò”, oltre a fecondare la “regina” coadiuva, tra l’altro, le operaie nella *termoregolazione dell’alveare* e dopo l’accoppiamento o “volo nuziale” muore; i “fuchi” non partecipanti al “volo nuziale” muoiono per inedia a causa della mancata somministrazione di alimenti da parte delle “operaie”.

- (c) durante l'ultimo stadio larvale la "regina", in coincidenza con il maggiore tasso di accrescimento, presenta, rispetto alle "operaie", livelli di espressione più elevati per un gruppo di segmenti di DNA codificanti *proteine cuticolari*.

In generale, le larve destinate a diventare "regine" sembrerebbero attivare un insieme di segmenti di DNA distinto, legato alla "casta", mentre le api destinate a diventare "operaie" continuerebbero a esprimere quei segmenti tipici della fase giovanile di larva. Tali differenze di espressione sarebbero dovute, tra l'altro, all'alimentazione (*determinismo trofogenetico delle caste*): le future operaie sono nutrite con la "pappa reale" solo nei primi 2 giorni di vita, mentre la futura regina è sempre alimentata con tale "pappa".

Impronta genitoriale. È stata rilevata la possibilità che alcuni "stati epigenetici" possano essere ereditati anche meioticamente. L'"*imprinting* genomico o parentale", *fenomeno non mendeliano* caratterizzato da trasmissione "polare" del carattere, è un esempio di metilazione "alternata" che, pur passando attraverso il gamete, necessita di essere ristabilita a ogni generazione; nell'*imprinting*, alleli *identici* a un determinato *locus* sono espressi *differentemente* (resi *funzionalmente diversi*) a seconda che l'informazione contenuta nel DNA sia *trasmessa dal gamete maschile o da quello femminile*. Un esempio è dato dal carattere "*callipige*" che è una manifestazione evidenziata negli ovini da Cockett et al. (1994). Trattasi di un'altra *trasmissione ereditaria che fa eccezione alle leggi mendeliane* e che è stata chiamata "superdominanza polare" in quanto *solo i soggetti "eterozigoti" che hanno ereditato l'allele "mutato" dal padre presentano il "fenotipo caratteristico"*⁴³. Alcuni risultati nella progenie in funzione della diversità genetica e fenotipica dei genitori sono riportati in Matassino (2004b).

Secondo Bidwell et al. (2004), *questo comportamento* può essere considerato il risultato contemporaneo di "tre eventi biologici" quali:

- (a) *mutazione* in una regione del DNA non codificante polipeptide ("intergenica") appartenente a un *cluster* di *segmenti di DNA* localizzato all'estremità distale del cromosoma 18 e sottoposto a *imprinting*; tale mutazione consiste in una transizione A→G;
- (b) *imprinting parentale (polarità della mutazione)*: l'individuo nella condizione di "eterozigosi" manifesta il fenotipo "*callipige*" per aver ricevuto l'informazione responsabile dal "padre"; la condizione fenotipica "*callipige*"

⁴³ *Fenotipo caratteristico*: esso è denominato "*callipige*" dal greco *καλός* = bello e *πυγή* = natica, per indicare un fenotipo caratterizzato da "ipertrofia" che coinvolge soprattutto i muscoli degli arti pelvici. Questa "ipertrofia" si manifesta soltanto poche settimane dopo la nascita a differenza della "doppia muscolatura" del bovino che si manifesta con "iperplasia" già durante il periodo fetale e "ipertrofia" nella fase *post*-natale (Koohmaraie, 1996).

potrebbe non manifestarsi indicando una condizione di deviazione dall'imprinting parentale; condizione che interesserebbe circa il 5% dei nati;

- (c) “superdominaza”: l'individuo nella condizione di “omozigosi” non manifesta il fenotipo “*callipige*” per l'esistenza di “RNA attivo” (*microRNA* e *snRNA*) codificato da segmenti di DNA posti sul “cromosoma materno” avente, probabilmente, funzione di “spegnimento” dell'allele mutato trasmesso dal “padre”; pertanto, le *forme di “RNA attivo” o “regolativo” conferirebbero all'informazione genetica una “dotazione”* aggiuntiva di “informazioni epigenetiche endogene” trasmissibili e in grado di contribuire alla variabilità delle manifestazioni fenotipiche.

Cronogenetica e Cronobiologia. Il termine “cronogenetica” è stato introdotto da Gedda e Brenici (1973) per indicare il “tempo ereditario originale” in quanto trasmesso ereditariamente e soggetto alla variabilità genetica; quindi, trattasi di un *tempo primitivamente “biologico”*, ossia “endogeno”, scandito dall'organismo vivente come effetto del fenomeno vita. La “cronogenetica”, dunque, interessando grandezze temporali endogene, si esprime come “tempo-durata” e va distinta dalla “cronobiologia”⁴⁴ la quale, invece, coinvolgendo relazioni fra “tempo fisico” e “tempo biologico”, si esprime come “tempo reattivo”.

L'importanza della “cronogenetica” è legata fondamentalmente al comportamento “temporale” sia qualitativo che quantitativo di *ogni segmento di DNA codificante*. Pertanto, tale “segmento” possiede anche una “quarta dimensione” che caratterizza la “durata” della sua informazione; conseguentemente, *nella variabilità della genetica formale, è da considerare anche quella “temporale”*.

Le *fluttuazioni ritmiche* di origine esterna sono *epifenomeni* che il segmento di DNA “riceve”, “trasmette” e “consuma”. Il tempo “esogeno” è quindi un tempo ritmico di sollecitazione di fenomeni vitali sostenuti dal tempo

⁴⁴ *Cronobiologia*: dal greco χρόνος = tempo; βίος = vita; λόγος = discorso, studio; le origini della *cronobiologia* risalgono a F. Halberg (1960); la cronobiologia fornisce principi generali dell'ordine: (a) *fisiologico (cronofisiologia)*; (b) *patologico (cronopatologia)*: alterazione della struttura temporale dovuta a processi morbosi; (c) *farmacologico (cronofarmacologia o, alla luce dell'approccio “omico”, cronofarmacogenomica)*: temporalizzazione della somministrazione di un farmaco; (d) *terapeutico*: impiego di una profilassi o di una cura in relazione alla caratteristica temporale della malattia. L'andamento temporale di una variabile biologica ritmica può essere meglio descritto matematicamente da una funzione “co-sinusoidale”, calcolabile, fra l'altro, con il metodo *conisor* proposto da F. Halberg (1960); sulla base di tale funzione si definiscono: (a) *periodo* (t): durata completa del ciclo di una variabile ritmica; (b) *mesor* (M): valore medio dei dati espressi dalla funzione; (c) *ampiezza* (A): differenza fra il punto più alto o più basso della curva e il *mesor*, (d) *acrofase* (φ): distanza espressa in unità di tempo o in gradi, da un punto di riferimento (punto di riferimento dell'acrofase) al picco della curva che definisce il ritmo; ad esempio, l'azotemia e la potassiemia presentano il loro livello massimo (acrofase) alle ore 21,00 di un ritmo *circadiano*.

“primitivamente biologico”. Questa sollecitazione riguarda soltanto i “meccanismi operativi” del genoma. Il tempo “astrale” influenzerebbe un segmento di DNA “operatore”; quest’ultimo attiverebbe un segmento di DNA codificante “polipeptide/i” e lo manterrebbe in “funzione” (“acceso”) fino al momento in cui lo “stimolo temporale esogeno” *ritorna al di sotto della “soglia operativa”* del segmento di DNA “regolatore”.

Una dimostrazione di “cronogenetica” *ante litteram* è stata offerta da C. Linneo nel 1735, quindi molto prima che G. Mendel scoprisse le leggi dell’ereditarietà (1865), ed è identificabile con l’“*horologius florum*”.

In conclusione, la “*individualità biologica*” non può identificarsi solo con la “qualità” e con la “quantità” dell’informazione di un segmento di DNA codificante “polipeptide/i” e “non”, ma deve tener conto anche della “sua temporalità”; *temporalità* che è funzione della cosiddetta “stabilità” di un segmento di DNA definita “*ergon*”. Secondo Gedda e Brenci (1973), i *principali fattori di stabilità* andrebbero identificati con:

- (a) “sinonimia” o “stabilità molecolare”;
- (b) “ridondanza” o “stabilità da ripetizione dell’informazione”;
- (c) “*repair*” o “stabilità da riparazione del DNA”.

Il segmento di DNA *va studiato e conosciuto nei suoi effetti informativi interessanti diversi momenti*, fortemente connessi tra di loro, quindi a livello di *qualità*, di *stabilità* (“*ergon*”) e di *durata* (“*chronon*”).

Il rapporto “*ergon-chronon*”, fondamentalmente, *rappresenta un sistema insostituibile per il funzionamento di qualsiasi entità biologica* inserita in un determinato *microambiente*; questo *microambiente* “esterno”, oltre logicamente a quello “interno”, *influenzerebbe la “dimensione temporale” della “fisiologia” e del “funzionamento”* di un segmento di DNA, tra cui la *velocità di erogazione (output) della informazione*.

Come esiste una filogenesi dei “caratteri” ereditati, vi è una filogenesi del “*chronon*”.

Le suddette due variabili (“*ergon*” e “*chronon*”) sono interdipendenti nel senso che a una data stabilità di un segmento di DNA in un determinato *microambiente* corrisponde una “speranza di vita” dell’informazione (“*chronon*”). Questo complesso fenomeno biologico evidenzia ancor più l’importanza dell’*epigenetica*, quindi dell’“*epigenoma*”.

Nel corso dell’evoluzione, i vari segmenti di DNA *hanno incorporato il tempo* (o potranno incorporare un *chronon*), per cui a livello sia “individuale” che “popolazionistico” si verificano *manifestazioni ripetitive* molto vicine temporalmente entro una “famiglia” (gruppo etnico legato da un certo grado di parentela) che possono essere definite, secondo Bettini (1977), “isocroni-

smo familiare”; pertanto, l’“unità ereditaria responsabile” ha in sé una “misura temporale dell’informazione” in termini sia di sua “attività” che di sua “estinzione”.

Alcuni effetti di segmenti di DNA quali *dominanza, recessività, intermedia* ed *epistasia* rappresentano modelli comportamentali dinamici influenzati anche dal tempo.

La *cronogenetica* si evidenzia ai diversi livelli di organizzazione di un sistema biotico: *submolecolare, molecolare, cellulare, tissutale, organico, organismico, biocenotico, ecosistemico*.

Il “ritmo” o meglio il “bioritmo”⁴⁵ è rilevabile nei processi “biochimici”, “enzimatici”, “fisiologici”, “elettrochimici”, “comportamentali” (emotività, ecc.), “intellettuali” di qualsiasi essere vivente.

La ritmicità dei fenomeni biologici è influenzata da fattori sia “interni” (*periodicità endogena*) che “esterni” (*sincronizzatori*⁴⁶); pertanto, le variazioni ritmiche sono regolate e coordinate da “orologi biologici” (rilascio ormonale, sonno-veglia, ecc.), ma, contemporaneamente, sono influenzate da fattori epigenetici. In altre parole, l’“orologio biologico interno” è in grado di prevedere i cambiamenti regolari del corso dei “sincronizzatori esterni”. Qualsiasi “bioritmo” viene condizionato nel suo andamento da un “sincronizzatore primario”. Qualsiasi essere vivente è caratterizzato dal possedere particolari strutture che lo rendono in grado di percepire la variazione nel valore di un “sincronizzatore primario” per poi procedere a conciliare il proprio “bioritmo” con quello del microambiente in cui è inserito. L’eliminazione o una forte riduzione dell’effetto di un “sincronizzatore esterno” comporta una profonda variazione nei bioritmi dell’organismo o della popolazione sino a giungere a un bioritmo a “corsa libera” (*free running*).

Per quanto a oggi è dato di conoscere, i bioritmi degli animali posti a un

⁴⁵ *Bioritmo*: è un “oscillatore biologico” e può essere definito come una *variazione periodica di un determinato evento*; i ritmi possono essere suddivisi in: (a) *autonomi*, se in assenza di forze esterne si comportano come oscillatori fisici, ossia come se fossero indipendenti dal “periodismo di campo”; (b) *di attività spontanea*, se la sincronizzazione richiede l’intervento di “orologi biologici”; (c) *trainati da oscillatori fisici o di risposta a cicli ambientali*, se sono sincronizzati a variabili periodiche di campo. *Tassonomicamente*, il bioritmo viene classificato in: (a) *ultradiano* ($t < 20$ ore); (b) *circadiano* ($20 \text{ ore} \leq t \leq 28 \text{ ore}$); (c) *diano* ($23,8 \text{ ore} \leq t \leq 24,2 \text{ ore}$); (d) *infradiano* ($t > 28 \text{ ore}$); (e) *circasettano* ($t = 7 \pm 3 \text{ d}$); (f) *circadisettano* ($t = 14 \pm 3 \text{ d}$); (g) *circavigintano* ($t = 21 \pm 3 \text{ d}$); (h) *circatrigintano* ($t = 30 \pm 5 \text{ d}$); (i) *circannuale* ($t = 1 \text{ anno} \pm 2 \text{ mesi}$).

⁴⁶ *Sincronizzatore*: fattore *esterno* (ambientale) o *interno* (ormone) che varia secondo un andamento periodico; a seconda del ruolo che esplica, un *sincronizzatore* può essere definito “primario” o “secondario”; ad esempio, nella periodicità circadiana, un sincronizzatore primario è rappresentato dal rapporto ore di luce/ore di buio.

gradino superiore della scala tassonomica sono sottoposti al controllo e al coordinamento di sistemi informativi molto peculiari, quali il *sistema nervoso* e quello *endocrino*: *grazie a una serie di meccanismi recettivi dei messaggi ambientali e di quelli integrativi specifici dei sincronizzatori si realizzano condizioni di armonia ottimale fra la struttura temporale e le variazioni delle condizioni in cui tale struttura è inserita*. In questo contesto, agli inizi degli anni '80, R. Wever e J. Aschoff hanno proposto la teoria del "multioscillatore", secondo la quale è possibile parlare di una vera e propria "organizzazione gerarchica" degli oscillatori ("pacemakers"), per cui gli "oscillatori primari" condizionano "oscillatori secondari" e questi quelli di "terzo ordine" e così via di seguito; *ciascun livello gode di una sua autonomia "decisionale" ed è in grado di comunicare con i livelli gerarchici superiori e/o inferiori*, instaurandosi così un sistema di meccanismi di *retroazione* o di "feed-back" e quindi di vere e proprie "reti cibernetiche". In altre parole, si tratta di un vero e proprio *sistema di controllo "automatico"* e di *trattamento dell'informazione con ritorno di segnale che permette a ciascuna unità di governo di individuare deformazioni comportamentali e di provvedere alla loro riduzione o eliminazione*. Nell'organizzazione "gerarchica" integrata i "ripristinatori di fase" ("phase resetters") "encefalici" (epifisi o ghiandola pineale e sistema ipotalamico-ipofisario) svolgono un ruolo fondamentale nello:

- (a) interpretare i messaggi dei "sincronizzatori" esterni;
- (b) elaborare la risposta;
- (c) informare altre strutture organiche al fine di mantenere entro limiti fisiologici l'andamento di una variazione ritmica.

Pertanto, il *bioritmo*, considerato quale risultante armonica di "sottosistemi" cooperativi e interagenti tra loro, ha un notevole significato in termini di "capacità al costruttivismo" e di "autoregolazione" o di "omeostasi"⁴⁷ di un sistema vivente al variare delle condizioni ambientali. Questa "omeostasi", a seconda del grado di organizzazione sociale del gruppo tassonomico, investe la sfera "biologica" e/o quella "psichica".

Di esempi di cronogenetica e di cronobiologia vi è un'immensa ricchezza anche nel settore zootecnico. I vari "modelli di funzione biologica", rappresentabili in chiave matematica, costituiscono esempi notevoli; si ricordano le diverse biopoiesi: "accrescimento", "ciclo riproduttivo", "galattopoiesi" individuale e/o di popolazione, "ovodeposizione", "sviluppo", ecc.

Un sistema complesso regolatore del ritmo temporale è quello "serotoni-

⁴⁷ *Omeostasi*: capacità dei viventi di governare le variabili dell'ambiente interno al variare di quello esterno, al fine di mantenerle entro valori tali che non causino danni irreversibili al loro "status" identificabile con quello fisiologico "normale".

na-melatonina”; il *livello di melatonina* ha un evidente “ritmo circadiano” e si ritiene che il processo di trasformazione della “serotonina” in “melatonina” venga attivato dal buio; questo processo esercita una fondamentale influenza sul ritmo “sonno-veglia” che, a sua volta, esplica un’azione positiva sul benessere degli animali. Per quanto è dato di sapere, la durata di un ciclo di sonno, comprensiva delle sequenze di sonno a “onde lente” e di “sonno paradosso”⁴⁸, è negli animali inferiore ai 20 min mentre nell’uomo è pari a circa 90 minuti.

Tra le specie d’interesse zootecnico, quella *equina* è caratterizzata dalla più elevata percentuale di veglia (80%), seguita da quella *ovina* (66,5%), *bovina* (52,3%) e *suina* (46,3%); in quest’ultima il sonno “paradosso” ha la maggiore incidenza (7,3%); il contrario si verifica nella specie *ovina* in cui il sonno “paradosso” incide solo per il 2,4%. Il ritmo “sonno-veglia” è *influenzato* da fattori “fisiologici”, “alimentari”, “climatici”; ad esempio, nei ruminanti, un’alimentazione ricca in azoto minerale determina un incremento delle ore di sonno (Ruckebusch, Gaujoux, 1976).

Alla *nascita* le modificazioni del ritmo “sonno-veglia” sono molto graduali e ciò a ragione dell’ambiente molto protettivo in cui il feto vive; ad esempio, l’*agnello neonato*, se posto in un box assieme alla madre, rimane per 24-48 ore indifferente all’alternanza del ritmo “giorno-notte” con piccoli incrementi del tempo di veglia e soltanto a partire dal 4° giorno successivo alla nascita manifesta percentuali di tempo di veglia più alte durante il giorno (rispetto alla notte).

Un aspetto di particolare importanza legato al ritmo “sonno-veglia” è quello della crescita corporea che viene stimolata dalla liberazione dell’ormone della crescita che si verifica durante il “sonno paradosso”; ad esempio, un suinetto sarà in grado di raddoppiare il proprio peso corporeo entro qualche giorno quando potrà dormire per almeno il 70% della giornata (Ruckebusch, 1983).

Nelle *condizioni di latitudine della penisola italiana*, è stato dimostrato che nelle vacche, su centinaia di migliaia di lattazioni, la *produzione lattea giornaliera individuale media* a livello di popolazione e in condizioni di “omeostasi demografica”⁴⁹ tende a variare nell’anno raggiungendo il valore massimo alla “fine dell’inverno-inizio primavera” e quello minimo alla “fine dell’estate-ini-

⁴⁸ *Sonno “paradosso”*: fase del sonno caratterizzata da un tracciato elettroencefalografico molto simile a quello registrabile durante la condizione di “veglia” sebbene l’individuo dorma profondamente.

⁴⁹ *Omeostasi demografica*: condizione per cui in una popolazione “genetica” la distribuzione dei parti, il rapporto tra le categorie e la distribuzione delle “uscite” e delle “entrate” demografiche tendono a essere costanti nell’arco dell’anno.

zio autunno” secondo una funzione “armonica”; si è ipotizzato che tale “biopoiesi” si comporterebbe secondo un “oscillatore biologico” trainato da un “oscillatore fisico”, che è il “fotoperiodo” (Bettini et al., 1968, 1969, 1970; Matassino et al., 1969, 1972, 1974).

Sempre ai livelli di latitudine italiana, in una grande popolazione ovina è stata ipotizzata da Matassino et al. (1975, 1982) l'importanza del *fotoperiodo* nel determinare un “ritmo circannuale” per l'attività di alcuni *enzimi* legati a:

- (a) *metabolismo proteico ed eliminazione dell'azoto amminico* [glutammico-ossalacetico transaminasi (GOT) o aspartato-aminotransferasi (AST), glutammato-piruvato transaminasi (GPT) o alanina-aminotransferasi (ALT)];
- (b) *produzione* di composti ad alto contenuto energetico (creatinfosfochinasi, CPK);
- (c) *catabolismo* di molti composti fosfatici (fosfatasi alcalina, ALP);
- (d) *glicolisi* [lattico deidrogenasi (LDH) e suoi isoenzimi (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5)].

L'*andamento circannuale* di questi enzimi e isoenzimi non risulta *significativamente influenzato* dallo “stato fisiologico” della pecora: “gravida all'estro indotto”, “gravida all'estro fisiologico”, “non gravida”; inoltre, l'*andamento ritmico* ha messo in evidenza come *i soggetti aventi attività più elevata per un determinato enzima tendono significativamente ad averla per tutti gli altri enzimi indagati*; ciò assume notevole importanza nella stima della “capacità al costruttivismo” del “singolo”. Sempre sui soggetti dello stesso allevamento, è stato studiato anche il profilo ematico [quadro sieroproteico (proteina totale, % di albumine, % di gamma globuline); sideremia; emogramma (eritrociti, leucociti, emoglobina, ematocrito)] (Rubino et al., 1975; Matassino et al., 1982); anche in questo caso si rileva un andamento “circannuale” indipendente dallo “status” fisiologico della pecora; andamento che sarebbe funzione dell’“oscillatore fisico”: “fotoperiodo”.

Probabilmente, il problema più complesso da risolvere nella *cronobiologia* e nella *cronogenetica* sarà quello della individuazione della *normalità* dei valori degli “indicatori biologici” che permettono di definire il “modello ordinario” di un bioritmo. L'uso del “cronodesmo”⁵⁰ per ciascun indicatore biologico a variazione ritmica potrebbe fornire elementi semantici quali-quantitativi al fine di permettere di discernere uno stato “normale” da uno “non normale”.

A conclusione dell'importanza della “epigenetica”, si può dire che *la com-*

⁵⁰ *Cronodesmo*: profilo ottenuto per ciascun “indicatore” biologico a “variazione ritmica”, entro ciascun microambiente, da un campione rappresentativo della popolazione.

preensione dei “meccanismi molecolari” che regolano l’espressione del DNA al variare del microambiente in cui questo DNA opera, al pari di altri importanti fenomeni genetici (dominanza, epistasi, pleiotropia), presenta ancora molti lati oscuri.

Per indagare questi meccanismi si rende sempre più non dilazionabile una “integrazione” tra la “genetica formale” e la “genetica molecolare”, specialmente per una migliore conoscenza della “plasticità fenotipica” e di una sua utilizzazione nel trasferimento operativo.

Un approccio “omico” potrà contribuire alla comprensione degli innumerevoli meccanismi utilizzati dal “genotipo” per “costruire” il “fenotipo”.

4. GENOMICA

La *genomica* si occupa dell’identificazione, quindi della caratterizzazione del *genoma*: insieme delle informazioni e delle loro interazioni di “natura genetica” presenti in un individuo. Alla luce del ruolo che le differenti condizioni epigenetiche esplicano nella modulazione del genoma, oggi si tende, sempre più, a dare importanza anche al concetto di “epigenoma”.

Il termine “genoma” fu coniato nel 1920 da H. Wincler nella versione tedesca “genoma”, quale combinazione dei termini “GENe” e “chromosOME”, inteso allora come “insieme quantitativo dei cromosomi”. Oggi, per genoma si intende l’“intero corredo di DNA” di un individuo.

Una definizione “in senso lato” di genoma umano è quella contenuta nella *Dichiarazione universale sul genoma umano e i diritti umani*, adottata nel 1997 dalla Conferenza generale dell’UNESCO e, nel 1998, dall’assemblea generale dell’ONU; in tale documento, il genoma umano è inteso, simbolicamente, come «*patrimonio comune o ricchezza ereditata dell’umanità*», quale *memoria storica di tutti i segmenti di DNA codificanti* che, discendendo per generazioni, sono giunti ai miliardi di individui che compongono la specie umana.

Questa definizione, a livello del singolo essere umano, dovrebbe recitare: «*Il genoma di ogni individuo è il risultato anche di mutazioni avvenute nella storia evolutiva dei suoi antenati. Le potenzialità genetiche di ciascun individuo, determinate da segmenti di DNA, possono esprimersi in modo diverso a seconda dell’ambiente, dell’educazione e delle condizioni di vita*» (Matassino, 2002).

Relativamente ai *microrganismi* è stato introdotto il termine “pan-genoma” per indicare che il loro genoma presenta, oltre a un *nucleo di segmenti comune ai diversi ceppi*, anche un *nucleo di segmenti di DNA codificanti “polipeptidici”* differente a seconda del ceppo (cioè segmenti “ceppo-specifici”)

(Tettelin et al., 2005). Un modello matematico ha previsto che nuovi segmenti di DNA continueranno a essere identificati, ad esempio, per *Streptococcus agalactiae*, anche dopo aver sequenziato centinaia di ceppi dello stesso microrganismo; *concetto*, quest'ultimo, *definito* dagli stessi Autori "pan-genoma aperto" per distinguerlo dal "pan-genoma chiuso" caratteristico di quei microrganismi, quali ad esempio il *Bacillus anthracis*, per i quali il sequenziamento di altri ceppi non apporterebbe altri nuovi segmenti di DNA. *Queste scoperte evidenziano, ancora una volta, la grande variabilità di comportamento degli esseri viventi.* I progressi tecnici degli anni '80, anni a cui risalgono le prime iniziative per il sequenziamento di interi genomi su larga scala, hanno contribuito alla rapida crescita della genomica e, pertanto, si è indotti a far coincidere la data di nascita di questo campo di ricerca con quella del *sequenziamento completo del primo genoma*: virus batteriofago ϕ -X174 (F. Sanger, 1980).

La *genomica*, rappresentando una branca della cosiddetta scienza "omica", nel suo significato di approccio "sistemico", si differenzia dalla *genetica classica* che invece tende a studiare il "segmento di DNA codificante "polipeptide/i" "singolarmente" nonché a definirne le modalità di trasmissione da una generazione alla successiva.

Oggi, gli studi di *genomica* non sono più limitati alla determinazione della sequenza del DNA, ma si estendono all'analisi:

- (a) dell'*espressione* dei segmenti di DNA in RNA e in "polipeptide/i";
- (b) delle *relazioni evolutive* tra i genomi;
- (c) delle *funzioni* dei segmenti del DNA.

Pertanto, la *genomica* può essere suddivisa in:

- (a) *strutturale*, che *permette di decifrare il messaggio del genoma*, o meglio, di definire la:
 - (i) sua *sequenza*;
 - (ii) sua *struttura*;
 - (iii) *localizzazione* di segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i" o *non* sui cromosomi;
- (b) *comparativa*, che permette di stabilire le relazioni evolutive tra segmenti di DNA sia all'interno del genoma di un determinato organismo [ad esempio identificazione di famiglie di segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i" (o cosiddette "famiglie geniche")], sia tra genomi di specie diverse;
- (c) *funzionale*, che consente di definire la "funzione probabile" di segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i".

La genomica si avvale sempre più dell'integrazione della *bioinformatica* e

della *biologia computazionale*: discipline ambedue necessarie per un'interpretazione dei risultati in chiave "sistemica".

Nella presente relazione maggiore attenzione sarà dedicata alla genomica "funzionale", anche se si farà spesso riferimento a quella "strutturale" e a quella "comparativa"; ambedue propedeutiche a quella "funzionale" e integranti la stessa.

4.1. Genomica "strutturale"

Per una migliore comprensione della *complessità* della "genomica strutturale", in senso lato, si ritiene opportuno dare maggiore enfasi alle recenti acquisizioni sul *genoma umano*. Questo genoma è quello meglio conosciuto e caratterizzato strutturalmente. Poiché il "funzionamento del DNA" può essere considerato di tipo "universale", specialmente per quanto riguarda gli eucarioti, i meccanismi di genomica "strutturale" e "funzionale" scoperti nell'uomo rappresentano un "modello estensibile" quasi certamente *agli animali in produzione zootecnica*, con particolare riguardo a quelli che occupano un gradino più elevato nella scala tassonomica.

Il *sequenziamento* del *genoma umano*, a oggi ancora incompleto⁵¹, evidenzia la notevole *complessità* dello stesso (schema 1 e tab. 1). In particolare, lo schema 1 fornisce una breve descrizione di alcune caratteristiche strutturali dei costituenti il genoma umano, nonché alcuni cenni sulle caratteristiche funzionali degli stessi. I componenti, il cui ruolo è ritenuto rilevante nella regolazione dell'espressione di segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i",

⁵¹ Aggiornamento a dicembre 2006 in riferimento alla "costruzione Build 35" messa a punto dall'*International Human Genome Consortium* (IHGC), denominata "finished". Una sequenza si definisce finished allorquando: (a) almeno il 95% dell'*eucromatina del genoma* è stata *sequenziata* (vengono tralasciati solo quei *gap* che non sono sequenziabili con le tecniche disponibili); (b) ogni base è stata sequenziata dalle 8 alle 10 volte; (c) la determinazione della sequenza è caratterizzata da un tasso di errore al massimo di 1 evento su 10^4 basi. La sequenza "Build 35" è la versione *finished* più aggiornata attualmente disponibile, subentrata alle precedenti versioni; la *prima sequenza*, prodotta nel 2001, veniva indicata come *draft* in quanto era stato sequenziato e assemblato solo il 90% dell'*eucromatina* e ogni base era sequenziata solo 4 volte. La sequenza "Build 35", contenente ancora 341 *gap* o *buchi* [33 eterocromatinici (per un totale di circa 198 Mb) e 308 eucromatinici (per un totale di circa 28 Mb)], *copre all'incirca il 99% del genoma "eucromatinico" ed è caratterizzata da un tasso di errore di circa 1 evento su 10^6 basi*; il restante 1% del genoma eucromatinico rappresenta regioni cromosomiche contenenti per lo più duplicazioni segmentali di DNA e risiede nei 308 *gap* "eucromatinici"; questa parte mancante non può essere ancora efficientemente mappata, clonata e sequenziata stante la metodica di indagine attualmente disponibile.

saranno oggetto di approfondimento nel capitolo di “Genomica funzionale”.

Le tabelle 2 e 3 evidenziano la rapidità con cui variano le conoscenze in merito ai dati genomici. Dall'esame della tabella 3 è possibile rilevare un *minore progresso di conoscenza sul sequenziamento del genoma delle specie di interesse zootecnico* rispetto all'uomo: per esempio, dei 23.231 segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” a oggi sequenziati nel *bovino*, ben 17.441 (76,37%) sono “desunti”⁵² e soltanto 5.790 (24,92%) sono “noti”⁵³; viceversa, nell'uomo dei 22.656 segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”, ben 21.372 (94,33%) sono “noti” e appena 1.878 (8,08%) sono “desunti”.

Dal sequenziamento del genoma umano e dal continuo aggiornamento dei dati scaturiscono molti più interrogativi di quelli a cui si pensava di poter trovare una risposta, tra i quali:

- (a) *dimensione del genoma in Mbp assolutamente indipendente dalla complessità* di un organismo nel senso che la dimensione del genoma umano sequenziato, pari a *circa 3.080 miliardi di coppie di basi* (+4.000.000, pari a +0,12% rispetto al dicembre 2005), è simile a quella di molti anfibi, rettili e crostacei; una relazione positiva tra *dimensione del genoma* e complessità *somato-funzionale* dell'organismo si osserva nei procarioti e ancor più nel passaggio dai procarioti agli eucarioti unicellulari, quali il lievito (*Saccharomyces cerevisiae*);
- (b) *paradosso del numero e della densità*⁵⁴ dei segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” nel senso che *non esiste alcuna relazione fra complessità, nu-*

⁵² *Segmento di DNA “desunto”*: definito sulla base della “similarità” scaturita dal confronto con una proteina o con una sequenza di DNA complementare (cDNA) o con una sequenza nucleotidica EST (*Expressed Sequence tag*) di una specie strettamente affine filogeneticamente.

⁵³ *Segmento di DNA “noto”*: nel senso che il suo prodotto proteico o il segmento di DNA complementare (cDNA) rientra nei *database* internazionali “specie-specifici”: UniProt (*Universal Protein Resource*), RefSeq (*Reference sequence*), UniProt/TrEMBL (*Universal protein resource/Translated EMBL database*).

⁵⁴ *Densità di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”* (cosiddetta densità “genica”): *numero di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” contenuto in una megabase (Mb) di DNA genomico*; la maggiore densità è stata riscontrata nei virus, nei quali, talvolta, la parte terminale di un segmento di DNA codificante “polipeptide/i” è anche la parte iniziale del segmento di DNA contiguo; nei batteri la densità è elevata (circa 1000 segmenti /Mb); negli eucarioti la “densità” varia da un valore di circa 500 segmenti /Mb nel lievito, a quello di circa 80 nel moscerino della frutta. Nella *specie umana* è necessario operare una distinzione tra: (a) *genoma nucleare* caratterizzato da densità molto bassa (circa 10 segmenti /Mb); (b) *genoma mitocondriale* caratterizzato da densità molto elevata per cui, in alcuni casi la parte terminale di un segmento di DNA codificante “polipeptide/i” è anche la parte iniziale del “segmento” contiguo; ad esempio, il segmento di DNA codificante la “subunità 8” dell'enzima ATPasi è compreso tra il nucleotide 8.366 e quello 8.569 del cromosoma mitocondriale, mentre quello codificante la “subunità 6” dello stesso enzima è compreso tra il nucleotide 8.527 e 9.204 di detto cromosoma; è da sottolineare che le sequenze amminoacidiche delle due subunità sono diverse anche nella zona

mero e densità; pur essendo stimati 100.000 miliardi di cellule, l'uomo ha un numero di segmenti di DNA [22.656 (dicembre 2006) con una variazione percentuale pari a +2,93 rispetto al dicembre 2005] che si discosta di poco da quello riscontrato nel nematode *Caenorhabditis Elegans* [20.060 (dicembre 2006) con una variazione percentuale pari a +1,71 rispetto al dicembre 2005] costituito da solo 959 cellule (tab. 3);

(c) *numero di pseudogeni* (circa 19.000 nel genoma umano) non *proporzionale* né alle dimensioni del genoma, né al numero dei segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”;

(d) *percentuale di DNA (esonico)* codificante proteina pari a solo l'1,4 (schema 1); frazione di DNA “non codificante” o “regolativo”⁵⁵, da ritenere un vero e proprio tesoro di informazioni e non DNA “spazzatura”, DNA “non funzionale”, DNA “ignorante”, DNA “parassita”, DNA “inutile” o genoma “invisibile”, pari a ben 98,6% (schema 1); entro la frazione del DNA “regolativo” è *da sottolineare* la presenza di:

(i) “introni”, il cui numero complessivo sarebbe proporzionale al grado di “complessità” dei viventi: il genoma degli organismi che occupano gradini inferiori della scala tassonomica sarebbe caratterizzato da un numero di “introni” inferiore a quello degli organismi più complessi; ad esempio, nell'anellide *Platynereis dumerilii*, senza dubbio meno complesso dell'uomo, Raible et al. (2005), solo limitatamente a 30 segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” omologhi rispetto all'uomo, hanno evidenziato un numero medio di “introni” per segmento di DNA pari a circa 7,8; valore, quest'ultimo, non molto dissimile da quello riscontrato nella *specie umana* (circa 8,4); il *Platynereis dumerilii*, per il fatto di possedere “*elementi ancestrali omologhi*” rispetto all'uomo pur appartenendo al *phylum* degli Anellidi, organismi già presenti poco prima del Cambriano⁵⁶, può essere considerato un “fossile vivente”⁵⁷;

(ii) *elementi trasponibili*, la cui percentuale è superiore nel genoma umano

comune in quanto il codice di lettura dei due segmenti di DNA è differente.

⁵⁵ DNA “regolativo”: la denominazione deriva dall'*individuazione di funzioni* raggruppabili in: (a) “strutturali”, che contribuiscono a favorire la stabilità delle origini di replicazione del DNA e l'organizzazione dei centromeri, nonché l'appaiamento meiotico dei cromosomi; (b) “eurigeniche”, che contribuiscono a coordinare l'espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” non vicini, “attivatori” o “silenzianti” di segmenti di DNA, nonché a regolare l'espressione di essi nel corso dello sviluppo.

⁵⁶ *Cambriano*: periodo che risale a circa 550 milioni di anni fa e che è *ritenuto momento di comparsa degli organismi a simmetria bilaterale*.

⁵⁷ *Fossile vivente*: qualsiasi organismo o molecola la cui *struttura* o *funzione* si rivela fondamentale per la ricostruzione del “percorso evolutivo “molecolare” o “filogenetico” della vita.

(39,1%) rispetto a quella di altri organismi, quali: *Drosophila melanogaster* (3,1%), *Caenorhabditis elegans* (6,5%) e *Arabidopsis Thaliana* (10,5%) e la cui “densità” nel genoma umano *varia* con la *localizzazione cromosomica*⁵⁸.

4.2. Genomica “comparativa”

La *genomica comparativa* utilizza le informazioni note sul contenuto e sull’organizzazione dei genomi e della loro espressione, relative a specie differenti, per *stabilire le eventuali relazioni filogenetiche tra gli organismi*. Questa comparazione che può estendersi anche alla “proteomica” si basa su due *concetti fondamentali*:

(a) *omologia*⁵⁹;

(b) *analogia*⁶⁰.

Il *confronto fra i genomi*, a oggi sequenziati, *sta evidenziando che organismi differenti condividono per lo più gli stessi segmenti di DNA codificanti “polipeptidi”*. Ad esempio, l’80% dei segmenti di DNA dell’uomo ha un corrispettivo nel topo in termini di omologia.

Una condizione degna di nota è rappresentata dal *pesce palla* (*Takifugu Rubripes*) che ha un genoma di 393.296.343 paia di basi (tab. 2) ma possiede ben 22.008 segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”, numero non dissimile da quello stimato per l’uomo (22.656) (tab. 3); pertanto, il genoma del pesce palla è caratterizzato dalla quasi assenza di sequenze non codificanti “polipeptide/i”. Una peculiarità del “genoma del pesce palla” è la grande “omologia” (circa 85%) con il “genoma umano” relativamente alla frazione codificante “polipeptide/i” pur essendo “uomo” e “pesce palla” due organismi la cui *divergenza evolutiva risulterebbe a circa 400 milioni di anni fa*. Questa

⁵⁸ *Densità e localizzazione cromosomica dei trasposoni*: in una regione del cromosoma X umano l’89% del DNA sembrerebbe essere costituito da elementi trasponibili, mentre alcuni tratti ne sarebbero quasi del tutto privi.

⁵⁹ *Omologia*: percentuale di identità esistente tra sequenze nucleotidiche di due segmenti di DNA o tra sequenze amminoacidiche di due proteine derivate da uno *stesso segmento di DNA* o da una stessa *proteina ancestrale*; i segmenti di DNA o le proteine omologhe possono essere definiti: (a) *paraloghi*, se appartengono alla *stessa specie* (esempio: i segmenti di DNA codificanti la globina *alfa* e *beta* nell’uomo derivano dalla duplicazione di un medesimo segmento di DNA *ancestrale*); (b) *ortologi*, se appartengono a *specie diverse* (esempio: i segmenti di DNA codificanti la subunità *alfa* dell’emoglobina nell’uomo e nel topo).

⁶⁰ *Analogia*: *identità di funzione* tra sequenze nucleotidiche di due segmenti di DNA o tra sequenze amminoacidiche di due proteine *indipendentemente da una comune origine evolutiva*.

conservazione interspecie coinvolge anche l'*Ascidia*, Cordato invertebrato, che condivide circa metà del suo patrimonio di segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i" con i vertebrati.

I genomi dell'uomo e dello *scimpanzé* (*Pan Troglodytes*) sono ancora più conservati. La comparazione del genoma umano con quello di *scimpanzé* (*The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium*, 2005) ha evidenziato che *le due specie condividerebbero circa il 96% del genoma*; le differenze tra il *genoma umano* e quello di *scimpanzé* pari a circa il 4% sarebbero così ripartite:

- (a) *differenze dovute a mutazioni puntiformi* (1,2%);
- (b) *differenze dovute a inserzione, delezione, duplicazione di interi segmenti di DNA* (2,8%).

Anche gli *pseudogeni* (schema 1) possono far luce sulla storia evolutiva delle forme di vita oggi più comuni.

Si ritiene che *lo pseudogene non sia sottoposto a selezione naturale*; esso *possiede una maggiore tendenza ad accumulare mutazioni rispetto al segmento di DNA "funzionale"*; pertanto, esso può essere considerato una specie di "orologio molecolare": dal confronto del numero degli pseudogeni tra due specie, è possibile ottenere informazioni sulle dinamiche evolutive.

Gilad et al. (2003, 2004), hanno evidenziato che il numero di *pseudogeni* per i *recettori olfattivi diminuisce* procedendo *dall'uomo allo scimpanzé e da quest'ultimo al topo e al cane*. Da analisi comparative, Webb et al. (2004) hanno messo in luce che il segmento di DNA TRP2 (*tRNA proline 2*), indispensabile per il funzionamento dell'organo vomero-nasale (organo sensibile ai ferormoni), era *ancora attivo* nell'antenato comune delle scimmie del Vecchio e del Nuovo mondo, mentre era già uno *pseudogene* prima della separazione tra le scimmie *Catarrine* e gli *ominidi*. Ciò dimostra che la *maggiore disattivazione* dei *segmenti di DNA codificanti i recettori olfattivi* si sarebbe verificata nelle scimmie del Nuovo mondo (*Platirrine*), nelle scimmie antropomorfe del Vecchio mondo (*Catarrine*) e nella scimmia urlatrice (*Alouatta*), le quali, però, *hanno sviluppato una visione dei colori di tipo tricromatico a scapito dell'olfatto*.

La *notevole divergenza* in termini di omologia nella sequenza degli *pseudogeni* tra *uomo e topo* *evidenzia la distanza evolutiva tra le due specie* (circa 75 milioni di anni fa); tale distanza non risulta altrettanto evidente dal *confronto tra le due specie* per i segmenti di DNA "veri" ("geni veri"), la cui omologia, invece, è elevata. Ad esempio, il segmento di DNA codificante un enzima che catalizza la sintesi della vitamina C è attivo nel *topo*, mentre è diventato "non funzionale" ("pseudogene") nell'*uomo* e nei *Primati*; pertanto, sia *l'uomo* che i *Primati* debbono assumere la vitamina C con l'alimentazione.

La genomica comparativa può contribuire alla comprensione della *evol-*

zione di importanti funzioni biologiche, quali ad esempio il linguaggio nell'uomo. Enard et al. (2002) hanno ipotizzato che il segmento di DNA FOXP2⁶¹ avrebbe giocato un ruolo importante nello sviluppo del linguaggio. Questo segmento è presente nell'uomo, nel topo e nello scimpanzé, ma nell'uomo presenta due mutazioni⁶² che conferirebbero alla proteina un'attività differente da quella presente negli altri due organismi; differenza di attività che nell'uomo si concretizza in elevati livelli di espressione che, temporalmente, coinciderebbero con lo sviluppo dei "centri del linguaggio"; infatti, questa espressione determinerebbe l'attivazione di segmenti di DNA bersaglio coinvolti nella sintesi di neurotrasmettitori importanti per la formazione dei "centri del linguaggio". Al contrario, nello scimpanzé, al momento dello sviluppo dei "centri del linguaggio", il suddetto "segmento" di DNA potrebbe non essere espresso a livelli ottimali nelle regioni appropriate del cervello oppure, anche se espresso a livelli ottimali, potrebbe comportarsi da attivatore più "debole" di quei "segmenti" di DNA coinvolti nella sintesi dei neurotrasmettitori per effetto delle due mutazioni, determinando una forma più primitiva di linguaggio.

Gilad et al. (2006), impiegando un approccio "DNA microarray – multispecie" [*Homo sapiens sapiens* (uomo), *Pan Troglodytes* (scimpanzé), *Macacus mulatta* (macaco), *Pongo pygmaeus* (orango)], hanno evidenziato che, limitatamente al tessuto epatico, la maggior parte dei segmenti di DNA che presenta differenti livelli di espressione tra "uomo" e "scimpanzé" è identificabile con quelli codificanti i "fattori di trascrizione"; questo diverso comportamento rafforzerebbe l'ipotesi che la maggior parte delle differenze tra le specie risiede nei meccanismi di regolazione dell'espressione di segmenti di DNA codificanti "polipeptidi"; meccanismi che raggiungerebbero la punta dell'iceberg nell'uomo per la maggiore complessità della struttura stessa della molecola del DNA, ove, apparentemente, vi sarebbe più "ridondanza".

La genomica comparativa sta altresì evidenziando che molti dei segmenti di DNA dei vertebrati deriverebbero dalla "duplicazione" di "segmenti" già

⁶¹ FOXP2: *forkhead-box P2 gene* = "gene" con dominio a testa "biforcuto"; segmento di DNA appartenente alla famiglia FOX includente 43 membri codificanti fattori di trascrizione caratterizzati da un "dominio di legame" di 100 amminoacidi; la denominazione FOX si deve alla particolare configurazione spaziale del dominio a "forma di farfalla" o a "doppia forcina", nota come "forkhead" (testa "biforcuto"); sulla base, rispettivamente, della presenza o dell'assenza di una regione basica all'estremità -COOH del dominio, le proteine FOX sono distinte in due classi: (a) "1", comprendente le sottofamiglie A, B, C, D, E, F, G, I, L, Q; (b) "2", comprendente le sottofamiglie M, N, O, P (Katoh e Katoh, 2004).

⁶² Mutazioni FOXP2: le due mutazioni presenti su segmento di DNA FOXP2 comportano, a livello di proteina, la sostituzione dell'amminoacido "treonina" con l'"asparagina" in posizione 303 e della "asparagina" con la "treonina" in posizione 325 della catena amminoacidica.

presenti in organismi ancestrali.

I meccanismi con cui la *duplicazione* può generare nuovi segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” sono due:

(a) *comparsa di mutazioni* a livello delle regioni codificanti di copie multiple; tale meccanismo non produce segmenti di DNA con funzioni completamente “nuove”, ma genera segmenti di DNA codificanti “proteine più o meno simili” ma con “attività diversa”;

(b) *acquisizione di nuove sequenze “regolatrici”* che consentono alle diverse copie di un segmento di DNA di essere espresse “differenzialmente”; ad esempio, nella *Drosophila melanogaster* l'unico segmento FGF⁶³ presente si esprime negli organi respiratori mentre i 22 segmenti FGF presenti nei vertebrati si esprimono in un ampio spettro di distretti cellulari, compresi gli stessi arti.

Pertanto, gli “eventi di duplicazione” di segmenti di DNA offrono la possibilità di espandere il “repertorio” dei profili di espressione, quindi delle relative funzioni proteiche.

La duplicazione dei segmenti di DNA codificanti le *globine* può rappresentare un esempio del duplice effetto della *origine di nuovi schemi di espressione* e di *attività proteica diversa*. Infatti, nella specie umana, i 4 segmenti di DNA codificanti, rispettivamente, le *globine* γ , δ , ϵ e ζ , *derivano da eventi di duplicazione di un segmento di DNA ancestrale*; le 4 *globine* hanno diversa affinità di legame per l'ossigeno, nel senso che le γ e le ϵ *globine* legano l'ossigeno con maggiore affinità rispetto a quelle δ e ζ ; conseguentemente, le “prime” sono utilizzate prevalentemente dal “feto” e le “seconde” dal “neonato” e dall’“adulto” (Griffiths et al., 2000).

L'elevato grado di omologia esistente tra i genomi lascerebbe supporre che “manifestazioni fenotipiche” anche molto complesse, proprie degli organismi che occupano un gradino elevato nella scala evolutiva, dipenderebbero non tanto dalla comparsa di “nuovi” segmenti di DNA, cioè di segmenti differenti per sequenza nucleotidica, ma, probabilmente, dalla diversità nelle funzioni che gli “stessi segmenti” esplicano soprattutto nella dimensione “spazio-tempo” entro la specie.

In ultima analisi, la *genomica comparativa* sta evidenziando che le “variazioni evolutive” vanno considerate, essenzialmente, come un problema di “regolazione” dell'espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”; in tale contesto, oggetto di studio della *genomica comparativa* dovrà essere sempre più *l'identificazione delle variazioni dei profili di espressione dei segmenti di DNA omologhi* nei diversi organismi, *quale possibile percorso per la com-*

⁶³ FGF: *fibroblast growth factor* = fattore di crescita dei fibroblasti.

preensione dei complessi meccanismi presumibilmente responsabili della diversità fenotipica esistente tra gli organismi.

4.3. Genomica “funzionale”

*La conoscenza della struttura di un segmento di DNA e della sua localizzazione cromosomica rimane un aspetto fondamentale ma non esclusivo; il passo successivo è quello di conoscerne la funzione fortemente influenzata dalle molteplici interazioni. Queste interazioni fanno sì che il “repertorio” di segmenti di DNA “attivi dal punto di vista trascrizionale” in un dato tipo di cellula e in un dato momento del ciclo cellulare sia “limitato” e “specifico”. Ne deriva che un “segmento di DNA” può essere presente ma non necessariamente essere funzionalmente “attivo”, cioè essere “trascritto” (*pre-mRNA* e *RNA_m*) e un “trascritto”, a sua volta, può essere presente ma non necessariamente essere “tradotto” in proteina. L’espressione di un segmento di DNA è finemente regolata affinché un organismo vivente possa rispondere ai cambiamenti ambientali impiegando un numero limitato di risorse nella sintesi di prodotti.*

I meccanismi di regolazione dell’espressione di un segmento di DNA codificante “polipeptide/i” sono attivi e sorprendenti già negli organismi inferiori sebbene nella cellula procariotica essi siano più semplici per l’assenza di nucleo e quindi di separazione fra cromosoma e citoplasma.

Steunou et al. (2006), monitorando l’espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” in un arco di tempo di 24 ore, hanno evidenziato che i *sinecococchi*⁶⁴ effettuano una separazione temporale dell’attività di espressione del DNA: i segmenti di DNA coinvolti nella sintesi degli enzimi necessari per la *fotosintesi* e per la *respirazione* sono “accesi” di giorno e “spenti” al tramonto, mentre quelli coinvolti nella sintesi dell’enzima *nitrogenasi* (responsabile della fissazione dell’azoto) e degli enzimi che intervengono nella fermentazione presentano un comportamento opposto. Questo sistema di regolazione consente ai *sinecococchi* di vivere una “doppia vita”: di giorno si comportano come “batteri fotosintetici” e di notte come batteri “azoto-fissatori”.

Rispetto ai procarioti, la *complessità della regolazione è superiore negli “eucarioti”* per la separazione fra “sito di trascrizione” (a livello del *nucleo*) e “sito di traduzione” (a livello del *citoplasma*) e per l’organizzazione dei segmenti di DNA che, non essendo strutturati in operoni, vengono raramente trascritti

⁶⁴ *Sinecococchi*: organismi unicellulari procarioti privi di sistemi di separazione spaziale delle attività cellulari.

insieme in un'unica molecola di RNA messaggero; ciò *evidenzia quanto sia grande la complessità, anche esaminando il solo momento della trascrizione senza considerare "ciò che precede" e "ciò che segue"*.

Negli eucarioti, i meccanismi di regolazione dell'espressione del segmento di DNA codificante "polipeptideli" sembrano presentare una "notevole specificità" legata anche al "tipo genetico". Ad esempio, in cellule mononucleate di sangue periferico di bovini Bruna e Frisona sottoposte a stress termico cronico simulante condizioni di *ipertermia*, Lacetera et al. (2006) hanno rilevato i livelli di *mRNA* della proteina Hsp72⁶⁵ e hanno evidenziato che la *risposta varia* nei due tipi genetici esaminati. Infatti, l'incremento della temperatura determina un'aumentata attività trascrizionale soltanto nelle cellule isolate dal tipo genetico Bruna; in particolare, il suddetto incremento è significativo a 41 °C (+53,2%, $P<0,05$) e a 43 °C (+80,4%, $P<0,05$) rispetto alla temperatura di 39°C. La differenza di risposta rilevata tra i due tipi genetici indagati sarebbe soltanto di natura "molecolare"; pertanto, resta da approfondire il significato biologico in termini di capacità di reagire allo *stress* e di prestazione produttiva e riproduttiva.

Sempre negli eucarioti, meccanismi di regolazione di tipo ambientale sono importanti nel modulare la espressione di segmenti di DNA codificanti "polipeptideli". Bernabucci et al. (2006) hanno messo in evidenza come la esposizione a differente fotoperiodo può indurre una modificazione della espressione dei segmenti di DNA codificanti la leptina (vedi nota 115) (Ob, *obese*) e i suoi recettori [Ob-Ra (*obese receptor a*) e Ob-Rb (*obese receptor b*)] nel tessuto adiposo di vacche di razza Frisona Italiana. In particolare, l'esposizione degli animali al giorno "lungo" (18/6 ore luce/buio) determina un incremento significativo dell'attività trascrizionale dei segmenti di DNA codificanti la leptina (+52,30%, $P<0,01$) e i suoi recettori (+30,37%, $P<0,01$ per Ob-Ra e +13,04% per Ob-Rb, $P<0,05$) rispetto alla condizione di giorno "neutro" (12/12 ore luce/buio), mentre l'esposizione al giorno "corto" (6/18 ore luce/buio) determina un decremento di quest'attività rispetto alla condizione di giorno "neutro" dell'entità di -65,97% per Ob-Ra e -61,81% per Ob-Rb ($P<0,01$). I risultati fanno supporre che l'espressione di questi segmenti di DNA sia influenzata dal fotoperiodo. Le variazioni indotte potrebbero costituire un importante fattore di variazione della risposta dell'attività riproduttiva e produttiva (galattopoiesi) in bovini in relazione al fotoperiodo; fenomeno già noto empiricamente.

Inoltre, gli stessi Autori (Bernabucci et al., 2004) hanno evidenziato come anche la fase fisiologica del "periparto" possa determinare una modificazio-

⁶⁵ Hsp72: *heat shock protein* = proteina da *shock* termico di 72 kDa.

ne nell'attività trascrizionale del DNA nel fegato e, quindi, *una differente* risposta delle principali proteine [apolipoproteina-E (apoE), proteina microsomiale (MTP, *microsomal triglyceride transfer protein*) e apolipoproteina-B₁₀₀ (apoB₁₀₀)] coinvolte nella sintesi e nella secrezione delle lipoproteine a bassissima densità (VLDL, *very low density lipoprotein*). Nell'immediato periodo dopo il parto viene evidenziata un'aumentata attività trascrizionale per la apolipoproteina-E e per la proteina microsomiale nonché una riduzione dell'attività trascrizionale per la apolipoproteina-B₁₀₀. La *differente* risposta di queste 3 proteine suggerisce che, probabilmente, vi sarebbe una relazione tra la ridotta attività trascrizionale per la apolipoproteina-B₁₀₀ e la diminuzione della sintesi e della secrezione di VLDL nel fegato come è stato rilevato in vacche allo *status* periparto.

4.3.1. Regolazione "pre-trascrizionale"

L'espressione comincia a essere regolata a monte della trascrizione attraverso meccanismi che stabiliscono quali sequenze siano disponibili per la trascrizione, quindi siano espresse, influenzando tra l'altro anche la velocità a cui queste sequenze vengono trascritte. Tali meccanismi si estrinsecano, essenzialmente, in:

- (a) *modificazioni* influenzanti la struttura della cromatina⁶⁶: l'"architettura "DNA-istoni" di per sé reprime l'espressione dei segmenti di DNA non consentendo ai fattori di trascrizione, agli attivatori e alla RNA polimerasi di esplicare il proprio ruolo; dunque, *il DNA deve svolgersi dalle proteine istoniche prima che la trascrizione possa aver luogo*;
- (b) *costituzione di complessi di attivazione e/o di repressione da parte di proteine regolatrici (repressori o attivatori)*⁶⁷;

⁶⁶ *Cromatina*: complesso macromolecolare costituito dalle *proteine istoniche* organizzate in ottameri, attorno ai quali la doppia elica del DNA si avvolge strettamente per un tratto della lunghezza di 146 nucleotidi; l'insieme dell'ottamero e del DNA avvolto intorno a esso costituisce il "nucleosoma" che è l'unità ripetitiva fondamentale della cromatina; due *nucleosomi* successivi sono associati all'istone H1 e sono connessi grazie a un breve filamento di DNA "linker" (connettore). La cromatina è distinguibile in: (a) *eterocromatina, più condensata*, corrispondente alle zone in cui *non è presente attività di trascrizione*; (b) *euromatina, meno condensata*, corrispondente alle zone in cui *l'attività di trascrizione è intensa*. L'euromatina "condensata" non può essere trascritta (repressione trascrizionale o "spegnimento"); l'euromatina "decondensata" (assunzione di una struttura a "filo di perle") può essere trascritta (*attivazione trascrizionale* o "accensione").

⁶⁷ *Repressori o attivatori*: la trascrizione di un segmento di DNA può essere regolata "negativamente" o "positivamente" grazie alla presenza di un "repressore" e di un "attivatore", rispettivamente; nel *primo caso* la trascrizione ha luogo solo in *assenza del "repressore"*, nel *secondo caso* solo

(c) “*riarrangiamenti*” di segmenti di DNA (duplicazioni, inserzioni, delezioni, ecc.) che, nel loro complesso, modificando le “reti regolative” del genoma, determinano grandi variazioni dell’espressione dei segmenti di DNA.

Modificazioni influenzanti la struttura della cromatina. Cambiamenti nella struttura della cromatina sono rappresentati principalmente da “condensazioni” e da “decondensazioni” *dell’eucromatina*.

I meccanismi influenzanti gli stati di “condensazione” e di “decondensazione” della cromatina sono principalmente imputabili a:

- (a) *acetilazione degli istoni*⁶⁸: ripristino dell’attività trascrizionale (“accensione”);
- (b) *deacetilazione degli istoni*⁶⁹: inibizione dell’attività trascrizionale (“spegnimento”);
- (c) *metilazione del DNA*⁷⁰: inibizione dell’attività trascrizionale (“spegnimento”);
- (d) *demetilazione del DNA*⁷¹: ripristino dell’attività trascrizionale (“accensione”).

La condensazione dell’“eucromatina” in “eterocromatina” è un “efficace” meccanismo di repressione dell’espressione di segmenti di DNA negli eucarioti ed è bene esemplificata dal processo di “disattivazione del cromosoma X”. Considerando un mammifero, l’*inattivazione del cromosoma X* è regolata dalla “compensazione del dosaggio”⁷²; l’*inattivazione* di uno dei due cromosomi X è casuale: probabilità pari al 50% per il cromosoma di origine materna o di origine paterna; tuttavia, in un tessuto vi potrà essere la prevalenza di attivazione del cromosoma di origine paterna oppure di quello di origine materna. Questa diversità inizia già dalle cellule embrionali (stadio di circa 20 cellule nell’uomo) per poi proseguire con le successive replicazioni cellulari. Qualche effetto di questo meccanismo comportamentale è il seguente: la femmina “eterozigo-

in presenza dell’“attivatore”.

⁶⁸ *Acetilazione degli istoni*: la destabilizzazione della struttura del “nucleosoma”, imputabile alla neutralizzazione delle cariche positive delle code istoniche, favorisce la “decondensazione” della eterocromatina e quindi la “disponibilità del DNA alla trascrizione”.

⁶⁹ *Deacetilazione degli istoni*: la stabilizzazione della struttura del “nucleosoma” favorisce la “condensazione” della cromatina e quindi lo “spegnimento dell’attività trascrizionale”.

⁷⁰ *Metilazione del DNA*: la formazione di complessi di “deacetilazione” favorisce la “condensazione” della eucromatina e quindi lo “spegnimento” dell’attività trascrizionale.

⁷¹ *Demetilazione del DNA*: la disgregazione dell’architettura “DNA-istoni” rende disponibile il DNA alla trascrizione.

⁷² *Compensazione del dosaggio*: livellamento, nel maschio e nella femmina, della quantità delle proteine sintetizzate dai segmenti di DNA localizzati sul cromosoma X. Nell’uomo Carrel e Willard (2005) hanno rilevato che ben 34 segmenti di DNA presenti sul cromosoma X non sono sottoposti a “inattivazione”; 31 di essi (91%) sono localizzati sul braccio corto.

te” per i *loci* siti sul cromosoma X presenta il cosiddetto “fenotipo a mosaico”, nel senso che alcune cellule esprimono solo un allele e altre l’altro allele come nel caso del “mosaicismo” a carico del colore del mantello nel topo; fenomeno che nel 1961 ha indotto Lyon ad avanzare l’ipotesi della inattivazione di uno dei due cromosomi X presenti in una *femmina* mammifera. Altro esempio di “fenotipo a mosaico” è il gatto “calico”⁷³. Sempre nel mammifero, per effetto del meccanismo di non compensazione precisa del “dosaggio”, una malattia si può manifestare con un gradiente d’intensità: è il caso delle femmine “eterozigoti” portatrici del segmento di DNA responsabile dell’emofilia che presentano concentrazioni molto variabili del fattore di coagulazione IX (dal 20 al 100% del normale). L’inattivazione di uno dei due cromosomi X nella “femmina mammifera” è controllata dal segmento di DNA *Xist*⁷⁴, il cui prodotto di espressione è responsabile della “condensazione” della *eucromatina* in *eterocromatina* e quindi del “silenziamento” trascrizionale.

In alcuni batteri, spesso, il “silenziamento” mediato dalla “metilazione” della citosina è una vera e propria forma di difesa del genoma dai batteriofagi.

Probabilmente, anche in *Drosophila* (organismo che non metila il suo DNA) le modificazioni a carico della struttura della cromatina giocano un ruolo molto importante nella regolazione dell’espressione di segmenti di DNA codificanti “*polipeptideli*”⁷⁵ (Orlando, 1998).

Costituzione di complessi di “attivazione” e/o di “repressione” da parte di proteine regolatrici. La regolazione dell’inizio della trascrizione coinvolge

⁷³ “Gatto calico”: gatto di sesso femminile con mantello “variegato” o a “guscio di tartaruga” caratterizzato da macchie “nere” e “gialle” su base bianca; questo fenotipo è dovuto all’inattivazione casuale del cromosoma X: nelle cellule in cui è inattivato il cromosoma X portatore dell’allele *C^b* (responsabile del colore “nero”) si hanno le macchie di pelo “giallo”, mentre in quelle in cui è inattivato il cromosoma X portatore dell’allele “*C^x*” (responsabile del colore “giallo”) si hanno quelle di pelo “nero”. Il gatto di sesso maschile è o “giallo” o “nero”; eccezionalmente si può avere un maschio “variegato” quale risultato dell’anomalia cromosomica “trisomia gonosomica” caratterizzata dalla presenza di tre cromosomi sessuali (XXY).

⁷⁴ *Xist: inactivating the single X Chromosome* = segmento responsabile della inattivazione del singolo cromosoma X (Lee et al., 1996).

⁷⁵ *Regolazione dell’espressione del DNA*: ad esempio, in *Drosophila*, l’“accensione” o il “silenziamento” di un segmento di DNA omeotico sarebbe mediato dal gruppo di proteine *Trx-G* (*Trithorax-group*) o *Pc-G* (*Polycomb-group*), rispettivamente; questi gruppi sarebbero responsabili di un diverso riarrangiamento posizionale di “nucleosomi” in corrispondenza di sequenze “regolative” della cromatina. Le proteine *Trx* e *Pc* sono codificate da due gruppi distinti di segmenti di DNA tra i cui componenti esisterebbero segmenti che, se mutati, sono responsabili del fenotipo “omeotico” (vedasi nota 29); ad esempio embrioni in cui sono stati disattivati i segmenti *Pc* (“*Pc-/Pc-*”) evidenziano profonde trasformazioni omeotiche del tipo “caudale-craniale” simili a quelle dovute a difetti dei *loci Ubx* (*Ultrabitorax*) e *abdA* (*abdominal-A*) (Lewis, 1978); la maggior parte delle mutazioni nei segmenti *Trx* sono “letali”.

proteine che interagiscono con i segnali regolativi⁷⁶ del segmento di DNA da controllare mediante loro regioni specifiche o “domini”. Una *proteina* regolatrice è definita attiva “in *trans*” (*trans acting*) mentre il *sito bersaglio* è definito attivo “in *cis*” (*cis acting*); questo meccanismo conformazionale è denominato regolazione “*cis-trans*”. Questi fattori “regolatori” possono indurre cambiamenti nella struttura della cromatina oppure possono interagire con il “macchinario trascrizionale” e o “avviare” o “reprimere” o “modulare” la trascrizione dei segmenti di DNA a cui sono legati (Ji, Wong, 2006).

Fattori di trascrizione differenti possono avere “motivi di legame”⁷⁷ tra loro diversi, ma possono anche legarsi in modo cooperativo a un “cis-elemento” che contiene differenti “motivi di legame” tra loro strettamente associati. *Questo legame combinatorio consente ad alcune centinaia di fattori di trascrizione di controllare i pattern di espressione “spazio-temporale” di migliaia di segmenti di DNA.* Gli elementi di regolazione *in cis* costituiscono la “logica di controllo” obbligato (*hardwired*) del genoma. Ad esempio, lo sviluppo embrionale può essere considerato il risultato del programma trascrizionale codificato anche dai “cis-elementi” (Davidson, 2001).

Nel *topo*, Scheller et al. (2006) hanno evidenziato l'importanza dei meccanismi di *trasduzione del segnale* (*signalling*) nell'attivazione dei segmenti di DNA coinvolti nell'adesione cellulare rilevando che segnali provenienti dall'ambiente esterno e interno della cellula influenzano anche la regolazione *cis-trans*; quindi l'*epigenetica* svolge un ruolo importante anche nell'attività trascrizionale del DNA.

“*Riarrangiamenti*” di segmenti di DNA. La disponibilità del DNA può essere regolata sia controllando l'“accessibilità” di determinate regioni del DNA per la trascrizione, sia variando il numero di copie di segmenti di DNA “accessibili”. Questa strategia di “amplificazione” coinvolge cicli di:

- (a) *trasposizione di sequenze mobili* (TSM) (*TMS, Transposition of Movable Sequences*) che genera segmenti duplicati localizzati casualmente su cromosomi non omologhi grazie allo spostamento di un *segmento di DNA* da un sito a un altro del genoma;
- (b) *scambio cromatidico ineguale* (SCI) (*UCO, Unequal Crossing Over*) che contribuisce all'ottenimento di sequenze ripetute *in tandem* grazie all'appaiamento “errato” tra segmenti di DNA omologhi per struttura (*segmenti*

⁷⁶ *Segnali regolativi*: segnali rappresentati da *promoter* (sequenza “promotrice” dell'attività trascrizionale), *enhancer* (sequenza di “potenziamento” dell'attività trascrizionale), *silencer* (sequenza “silenziatrice” dell'attività trascrizionale).

⁷⁷ *Motivo di legame*: sequenza nucleotidica di 6-30 *bp* riconosciuta da un determinato fattore di trascrizione.

identici), ma non occupanti la stessa posizione su *loci* corrispondenti di *cromosomi omologhi*.

Fra l'altro, questi dinamici meccanismi rappresenterebbero "*constraint*" genetici che favorirebbero la dispersione degli elementi di un segmento di DNA "vantaggioso" e quindi contribuirebbero al processo di "evoluzione concertata" noto anche come "deriva molecolare".

Un "riarrangiamento" di segmenti di DNA si ha anche, probabilmente, per il verificarsi spontaneo del fenomeno della *traslocazione robertsoniana*; quella 1;29 (*rob 1;29*)⁷⁸, a oggi, sembrerebbe la più frequente nel bovino. È acclarato che l'incidenza di tale traslocazione è maggiore nelle razze bovine con prevalente attitudine alla produzione della carne che in quelle con prevalente attitudine alla produzione del latte, e può raggiungere, come è stato evidenziato in alcuni tipi genetici da carne non italiani, valori che oscillano tra il 40% e il 70% (Ranger-Figueiredo, Iannuzzi, 1993). Indagini citogenetiche effettuate su alcuni tipi genetici bovini italiani (Succi et al., 1980; Matassino et al., 1985) hanno evidenziato una frequenza della stessa traslocazione allo stato cosiddetto "eterozigote" mediamente pari al 20,5% nella Romagnola, al 18,7% nella Marchigiana, al 18,1% nella Podolica, al 9,5% nella Chianina, al 6,4% nella Modicana e al 3,6% nell'Ottoneuse.

La maggiore incidenza della *rob 1;29* nelle razze con prevalente attitudine alla produzione della carne indurrebbe a supporre l'esistenza di un'influenza positiva di tale "riarrangiamento" cromosomico su alcuni aspetti della produzione "carne". Infatti, alcuni autori (Darré et al., 1972; Falaschini et al., 1990) hanno rilevato una correlazione positiva tra la traslocazione *rob 1;29* e l'estrinsecazione di alcune caratteristiche produttive, quali ad esempio l'"incremento ponderale giornaliero medio" e la "conformazione delle masse muscolari". Matassino et al. (1996, 1997) hanno evidenziato che il soggetto traslocato Marchigiana presenta:

(a) sul totale dei tagli della carcassa, un'incidenza percentuale significativamente

- (i) *minore* dei tagli "*adiposi*";
- (ii) *maggiore* dei tagli "*carnosi*";
- (iii) *minore* del tessuto "*scheletrico*";

(b) *migliori caratteristiche "reologiche" per alcuni tagli*;

⁷⁸ *Traslocazione robertsoniana 1;29 (rob 1;29)*: modificazione stabile e naturale dell'assetto cromosomico derivante dalla fusione di due cromosomi acrocentrici non omologhi a livello dei loro centromeri con la conseguente riduzione del numero diploide di cromosomi da 60 a 59 nei portatori cosiddetti "eterozigoti" e da 60 a 58 nei portatori cosiddetti "omozigoti"; essa, normalmente, non è accompagnata da anomalie fenotipiche.

- (c) valori più elevati per alcune “misure somatiche”;
 (d) differenti caratteristiche “morfometriche” della “fibra muscolare”.

La “duplicazione di segmenti di DNA” rappresenterebbe uno dei meccanismi più importanti per *l'evoluzione delle cosiddette “famiglie geniche”*, le quali possono essere considerate il risultato dinamico di un vero e proprio processo di “conversione democratica di segmenti di DNA codificanti polipeptide/i”, con funzione principe di “rete di mutazione”. Questa conversione rappresenta un esempio naturale, più che brillante, del processo biologico definito “opportunismo evolutivo” o “capacità al costruttivismo” (Matassino, 1989c, 1992b; Lewontin, 1993, 2004).

Il verificarsi di “errori di copiatura” compromettenti la funzionalità del segmento di DNA può condurre *sia a un aumento della variabilità genetica, ed eventualmente fenotipica, sia alla formazione di “pseudogeni”*.

Pseudogene. Lo *pseudogene*, considerato finora una vera e propria sorta di “fossile molecolare” in quanto inteso “relietto distrutto da una mutazione e abbandonato dall'evoluzione”, a oggi, sta evidenziando un'attività funzionale che, sinteticamente, si concretizza:

- (a) nel *controllare*, tramite l'RNA “attivo” da esso prodotto, l'espressione del segmento di DNA “vero” codificante “polipeptide/i” di cui imita la sequenza; nel *topo*, è stato evidenziato che la *disattivazione dello pseudogene* “Markorin p1” causa *l'alterazione dell'attività del corrispondente* segmento di DNA “vero” “Markorin 1”, importante regolatore dello sviluppo, pur non essendo stato quest'ultimo oggetto dell'intervento diretto di disattivazione (Hirotsume et al., 2003);
 (b) nell'*attivare la riparazione* (funzione di *back up* o recupero) del “segmento di DNA codificante “polipeptide/i”.

È stata “verificata” la presenza di cosiddetti “pseudogeni risorti”, cioè di *segmenti di DNA inattivi*, che per *mutazione* hanno ripreso la loro attività di codificare “polipeptide/i”. Infatti, nei lieviti, gli *pseudogeni relativi ad alcune proteine presenti sulla superficie della cellula si riattivano in presenza di stress ambientali* (Pinarbasi et al., 1996). Anche nei *Bovidi* è emerso che il segmento di DNA codificante una *ribonucleasi seminale* sarebbe stato per gran parte della sua storia evolutiva uno “pseudogene” che si sarebbe *riattivato solo di recente* (Trabesinger-Ruef et al., 1996).

La formazione di pseudogeni sembrerebbe essere positivamente correlata all'intensità di espressione di un segmento di DNA: i segmenti di DNA codificanti le proteine ribosomiali sono maggiormente espressi e hanno maggiore occasione di dare origine a pseudogeni “processati”, essendo coinvolti in funzioni di manutenzione della cellula (Gerstein, Zheng, 2006).

Trasposoni. Il cambiamento nella contiguità dei segmenti di DNA era noto già nella “genetica classica” come “effetto di posizione”. Grande merito è da attribuire al Nobel (1983) B. McClintock per le ricerche sul mais (1940) che hanno condotto alla scoperta di *elementi mobili di DNA*: i cosiddetti segmenti di DNA “saltatori” o “ballerini” (*“jumping” gene*) o “trasposoni”.

Oggi, è noto che detti elementi trasponibili sono presenti sia negli organismi *procarioti* che in quelli *eucarioti*.

I trasposoni stanno evidenziando un ruolo sempre più importante nella *dinamicità* e nell'*evoluzione del genoma* in quanto fungono da veri e propri “modulatori” dell'espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” per la presenza di *promoter*, di *enhancer* e di *silenziatore*. Essi possono condurre al sorgere di *nuove e dinamiche reti “cibernetiche”* a livello *molecolare* e di nuovi “modelli di sviluppo” a livello di “manifestazione fenotipica”. I TGA, presenti solo in determinate aree geografiche isolate, possono subire effetti che, intensificando la dinamica dei trasposoni, aumentano la propria “capacità al costruttivismo”. Il genoma dei TGA può costituire un *materiale biologico di elevato valore* anche ai fini della individuazione di modelli evolutivi per “equilibri intermittenti” (*punctuated equilibria* o “evoluzione a salti”), grazie ai quali la storia degli organismi viventi sarebbe caratterizzata dall'alternarsi di periodi di *stasi evolutiva* a periodi di *diversificazione rapida* (Matassino, 1989c, 1992b). La teoria degli “equilibri intermittenti” può essere considerata già in embrione in quella dell’“equilibrio slittante” (*shifting balance*)⁷⁹.

I trasposoni possono provocare la “metilazione” del DNA come strategia “per nascondersi” all'ospite e, quindi, per *aumentare la loro presenza* essendo “*trasmessi*” da una generazione cellulare alla successiva senza essere eliminati (Wolffe e Matzke, 1999).

Come osservato da Girard e Freeling (1999), l'inserzione dei *trasposoni* può alterare sia il *livello di espressione* di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” che il *pattern spaziale di espressione* di detti “segmenti” con *effetti regolatori sia qualitativi che quantitativi*.

Damiani et al. (2002), studiando la distribuzione degli *elementi trasponi-*

⁷⁹ *Teoria dell’“equilibrio slittante”*: teoria proposta da S. Wright negli anni '30 nel tentativo di fornire una spiegazione al superamento delle barriere “adattative” (oggi barriere alla “capacità al costruttivismo”); una specie che ha raggiunto un “picco adattativo” (insieme di determinati requisiti che rendono la specie “adatta” a un contesto ambientale, quindi di elevata “capacità al costruttivismo”) non potrebbe raggiungere un nuovo “picco” sulla base dei soli fenomeni di “mutazione” e di “selezione naturale” in quanto, durante il passaggio, la popolazione rischierebbe di essere “controselezionata”; solo la “deriva genetica” potrebbe modificare la struttura genetica delle popolazioni e quindi consentire, probabilisticamente, di superare la “valle adattativa” e di raggiungere il nuovo “picco”.

bili in alcune specie appartenenti all'ordine dei *Bovidi*, hanno evidenziato la maggiore concentrazione di detti elementi nella regione promotrice o negli introni o all'estremità 3' non tradotta di quei segmenti di DNA *attivamente espressi e influenzanti* la:

- (a) *comunicazione intercellulare;*
- (b) *differenziazione cellulare;*
- (c) *risposta immunitaria;*
- (d) *produzione quali-quantitativa lattea attraverso il controllo dell'entità di prolattina e di lattoproteine sintetizzate.*

4.3.2. Regolazione "post-trascrizionale"

La base molecolare della regolazione "*post-trascrizionale*" è *meno ben compresa di quella "pre-trascrizionale"*. Si ritiene che tutto il *processo di espressione* (trascrizione, maturazione del *pre-mRNA*, esportazione dell'RNA maturo ai ribosomi) sia legato a un *unico sistema di controllo con una stretta rete di interazioni a cui prendono parte diversi meccanismi*. Ad esempio, nel metabolismo dell'*mRNA* (*trascrizione e maturazione* dei trascritti primari) non è ancora ben chiaro quale sia il ruolo svolto dalla struttura "a cappuccio" inserita all'estremità 5' (*capping*⁸⁰). Tuttavia, è accertato che la sua presenza è indispensabile per l'attacco dei ribosomi sull'RNA *messaggero* prima dell'inizio della traduzione; infatti, la sua rimozione impedisce la traduzione dell'*mRNA* in proteina.

Alcuni meccanismi regolativi operano anche a livello della:

- (a) *maturazione dell'RNA messaggero e sua stabilità;*
- (b) *traduzione dell'mRNA in proteina.*

Maturazione dell'RNA messaggero e sua stabilità. Il processo di maturazione del *pre-mRNA*, con particolare riferimento allo "*splicing* alternativo" e all'*editing*, rappresenta un sistema finemente regolato che contribuisce a rendere più "versatile" e più "sofisticato" il *genoma degli eucarioti*; questi organismi vengono denominati anche "*soft-wired*" *organisms* (organismi *scarsamente "vincolati"*), contrariamente ai procarioti che vengono definiti "*hard-wired*" *organisms* (organismi *profondamente "vincolati"*) in quanto il loro RNA, dopo la sintesi, non subisce particolari processi di maturazione (Herbert, Rich, 1999). *Vi sarebbe, dunque, una forte relazione positiva* fra "complessità" di un organismo e "nu-

⁸⁰ *Capping*: modificazione *post-trascrizionale* del *pre-mRNA* consistente nell'aggiunta del "nucleoside guanosina metilato" all'estremità 5' terminale della molecola di *mRNA*.

mero” di “splicing alternativo”. La genesi di nuovi siti di “splicing alternativo”, quale conseguenza del fenomeno di “esonizzazione dell'introne mediata dai retrotrasposoni *Alu*”⁸¹, contribuirebbe ad arricchire la riserva di informazioni per la sintesi di ulteriori proteine specifiche. L'aumentata attività di “splicing alternativo” associata alla più elevata presenza di *Alu* nel *genoma umano* rispetto a quello di altri *Primates* potrebbe spiegare la diversità quali-quantitativa di proteine nell'encefalo dell'uomo; in questa diversità quali-quantitativa potrebbe risiedere una delle possibili spiegazioni di diversità cognitive importanti fra *uomo* e *scimpanzé*⁸² (Matassino, 2005b; Matassino et al., 2006a).

Il controllo della stabilità dell'*mRNA* è particolarmente importante negli eucarioti. In questi organismi, il periodo di dimezzamento dell'*mRNA* varia nell'ambito di due ordini di grandezza; i trascritti a “vita lunga” possono essere tradotti molte volte mentre quelli a “vita breve” non possono essere tradotti più di una volta prima di essere “degradati”. La velocità di degradazione degli *mRNA* trascritti è direttamente correlata con l'espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”. Un esempio di regolazione dovuta alla stabilità dell'*mRNA* è riscontrabile nella famiglia di segmenti di DNA codificanti gli istoni⁸³. La richiesta di istoni aumenta durante la duplicazione del DNA dal momento che nuovi *nucleosomi* devono essere assemblati; rispetto al livello basale, all'inizio di tale duplicazione, si rileva un incremento da 20 a 40 volte della concentrazione di *mRNA* codificante gli istoni; tale incremento è imputabile a un:

- (a) potenziamento dell'attività trascrizionale;
- (b) allungamento (da 8 a circa 40 minuti) del periodo di dimezzamento dell'*mRNA*.

Traduzione dell'*mRNA* in proteina. La concentrazione di una proteina non è correlata in maniera semplice all'attività trascrizionale del corrispondente segmento di DNA che la codifica in quanto la sua “sintesi” è “ulteriormente regolata” a livello del “meccanismo” di traduzione, fra l'altro, dai seguenti fattori:

- (a) frequenza con cui si svolge la traduzione;

⁸¹ Esonizzazione dell'introne mediata dai retrotrasposoni *Alu*: trasformazione di introni in esoni determinata dalla “trasposizione” e dall’“integrazione” di elementi *Alu* in introni di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”; si stima che nel *genoma umano* oltre 500.000 *Alu* siano “introni”, dei quali oltre 25.000 potrebbero diventare veri e propri “esoni”.

⁸² Diversità cognitive *uomo-scimpanzé*: le differenze di funzionamento tra le due specie, tra l'altro, sarebbero dovute alla quantità, al tipo di corteccia cerebrale (*neo cortex*) e al numero di neuroni corticali presenti [30 milioni nel *topo*; 3 miliardi nello *scimpanzé* (filogeneticamente più vicino all'*uomo*), 30 miliardi nell'*uomo odierno* (10 volte di più dello *scimpanzé*)].

⁸³ Istoni: proteine che si legano in modo non specifico al DNA e che vengono impacchettate con esso, *in vivo*, per formare i “nucleosomi”.

- (b) velocità di allungamento della catena polipeptidica;
- (c) efficienza con cui inizia e si conclude la traduzione;
- (d) rendimento con cui si svolgono le modificazioni successive alla traduzione.

Il controllo a livello dell'“inizio della traduzione” è un meccanismo che sembra essere per lo più utilizzato nella sintesi di proteine che si assemblano in complessi multimerici o di proteine essenziali per la vitalità della cellula. Un esempio di controllo dell'inizio della traduzione dell'*mRNA* in polipeptide è stato rilevato da Huttelmaier et al. (2005), i quali hanno evidenziato un meccanismo attraverso il quale l'*mRNA* codificante la *beta-actina* non viene “tradotto” se non in corrispondenza del sito in cui l'*actina* svolge la propria funzione di componente del citoscheletro; la proteina ZBP1⁸⁴, definita “gendarme”, si lega a tale *mRNA* e ne impedisce la traduzione in *actina* per cui il “complesso gendarme-*mRNA*” si accumula all'estremità delle protrusioni della cellula ove l'*actina* esplica la sua funzione; in questo sito cellulare la fosforilazione della ZBP1 a opera di uno specifico enzima chinasi sarebbe responsabile del distacco della proteina ZBP1 dall'*mRNA* il quale può essere tradotto in *beta-actina*.

Nei *virus* e nei *procarioti* la sintesi di alcune proteine “meno essenziali” viene regolata controllando la “fine della traduzione”.

I suddetti fenomeni rendono non semplice la determinazione di una relazione diretta univoca (positiva o negativa) tra numero di molecole di mRNA e proteine codificate.

Concludendo, l'espressione è regolata a valle del processo trascrizionale mediante un controllo delle modalità con le quali RNA, proteine, relative isoforme e loro frammenti sono modificati, protetti e trasportati. In queste fasi si inserisce l'azione dell'“RNA intronico” che conferisce informazioni genetiche aggiuntive.

4.3.2.1. RNA “regolativo”

Lo schema 2 mostra la probabile attività trascrizionale di un segmento di DNA evidenziando che il flusso dell'informazione genetica non è rappresentabile soltanto dalla sequenza “DNA→RNA→”polipeptide/i”, ma può concretizzarsi nella sequenza “DNA→RNA”, dando origine a molecole di RNA non codificanti “polipeptide/i” a partire o da “introni” o da “esoni” appartenenti a segmenti di DNA codificanti non “polipeptide/i”; questo RNA è anche noto come RNA “attivo” o “regolativo”. Quest'ultima denominazione scaturisce

⁸⁴ Proteina ZBP1: Zipcode Binding Protein = proteina che si lega a una sequenza codice detta “di avviamento” di 54 ribonucleotidi localizzata all'estremità 3' non tradotta dell'*mRNA* della *beta-actina*.

dalle notevoli potenzialità, in termini di regolazione, che stanno emergendo per gli “RNA attivi”, che possono essere *reversibili* e *variabili* per l’assenza di codici *standard* di “avvio” o di “arresto” del processo di traduzione. L’RNA a lungo è stato considerato un *mero traduttore dell’informazione contenuta nel DNA*, cioè un *intermediario nella sintesi di proteine*; invece, esso sta evidenziando *notevoli potenzialità* in termini di “prestazioni cellulari”.

Un esempio di RNA “regolativo” è rappresentato dal *microRNA* (schema 1).

Si stima che i *microRNA* controllino l’espressione di oltre il 30% dei segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” sia nella *specie umana* che in *altri organismi* (Berezikov et al., 2005). È ormai evidente il coinvolgimento dei *microRNA* in svariati processi fisiologici quali: lo *sviluppo di organi e tessuti*, l’*apoptosi*, il *mantenimento dello stato di pluripotenza delle cellule staminali* (ES, *stem embryonic cells*), ecc.

Il contributo dei *microRNA* allo sviluppo dei tessuti è stato evidenziato sia per la *miogenesi* in *Xenopus laevis* (Chen et al., 2005) che per l’*adipogenesi* nella *specie umana* (Kajimoto et al, 2006); in quest’ultima sono stati osservati cambiamenti nel profilo di espressione (“iperespressione” o “ipoespressione”) di 21 *microRNA* nella fase di conversione del “pre-adipocita” in “adipocita maturo”.

I *microRNA* svolgerebbero anche il ruolo di assicurare la “pluripotenza”⁸⁵ delle cellule ES come hanno evidenziato Houbavy et al. (2003), Suh et al. (2004) e Ge et al. (2006) nell’*uomo* e nel *topo*. La salvaguardia di questa “manifestazione fenotipica” da parte dei *microRNA* è massima nella cellula ES indifferenziata per ridursi in modo significativo con il procedere della perdita del carattere di pluripotenza e scomparire negli organi “adulti”. I segmenti di DNA codificanti questi *microRNA* “ES-specifici” sono spesso organizzati in *cluster* e le molecole di *microRNA* vengono trascritte come un unico *pre-mRNA* “policistronico”⁸⁶.

L’elevato grado di *omologia* tra i *microRNA* *umani* e *murini* suggerirebbe che tali RNA siano coinvolti in reti regolative “chiave” altamente conservate nei mammiferi nel senso che i *microRNA*, contribuendo a rendere le “cellule

⁸⁵ *Pluripotenza* (o *multipotenza*): condizione per cui una cellula non è in grado di dare origine a un individuo completo, ma può specializzarsi in una cellula appartenente a uno qualsiasi dei tre foglietti embrionali (*ectoblasto*, *mesoblasto* ed *endoblasto*).

⁸⁶ *Pre-mRNA policistronico*: *pre-mRNA* derivato dalla trascrizione contemporanea di più segmenti di DNA presenti in successione sull’elica stampo; normalmente, i segmenti contenuti nell’“mRNA policistronico” presentano interrelazioni funzionali nel senso che, ad esempio, sono coinvolti in una medesima via metabolica. Nella fattispecie, Suh et al. (2004), in cellule ES umane, hanno descritto 8 *microRNA* (*miR-302 b**, *miR-302b*, *miR-302c*, *miR-302c**, *miR-302 a*, *miR-302 a**, *miR-302d*, *miR-367*) localizzati sul cromosoma 4 in una regione di 200 paia di basi.

staminali” “insensibili” ai segnali ambientali i quali normalmente inibiscono il ciclo cellulare, consentirebbero alle cellule di continuare a proliferare. Questa funzione dei *microRNA* potrebbe avere importanti implicazioni in medicina soprattutto ai fini della possibilità di inibizione della divisione in cellule cancerose attraverso l’induzione della perdita di funzione di *microRNA* “chiave” per l’attività proliferativa di queste cellule (Hatfield et al., 2005).

Il *microRNA* può contribuire all’instaurarsi di nuove manifestazioni fenotipiche. Ad esempio, nel tipo genetico ovino Texel, il fenotipo “ipertrofico” sarebbe dovuto a una *mutazione puntiforme* (sostituzione G→A) sul segmento di DNA codificante il fattore di crescita *GDF8*⁸⁷; da un’analisi in “*silico*”⁸⁸ è risultato che il segmento di DNA mutato corrisponderebbe a un sito di legame per due *microRNA* (*miR-1* e *miR-206*) responsabili del silenziamento *post-trascrizionale* del segmento stesso con la conseguente inibizione della sintesi del suddetto fattore di crescita (*miostatina*); inibizione responsabile dell’*ipersviluppo della muscolatura* (Clop et al., 2006).

Gli RNA “regolativi”, specialmente quelli *d’interferenza*⁸⁹ (schema 1), stanno trovando sempre maggiore applicazione come “silenziatori mirati” di

⁸⁷ *GDF8* (*growth differentiation factor 8* = *fattore di crescita 8*): fattore di crescita noto anche come *miostatina*; proteina, che controlla sia lo sviluppo della muscolatura sia il rapporto “massa muscolare/massa adiposa”.

⁸⁸ In “*silico*”: locuzione derivata dal latino (*in silico* = in “silicio”) utilizzata per indicare la riproduzione di fenomeni biologici in una simulazione matematica computerizzata quale frutto della informatizzazione della ricerca; il termine “silicio” è riferito al “silicio” di cui è costituita la maggior parte dei componenti elettronici.

⁸⁹ *Interferenza dell’RNA*: fenomeno scoperto nel nematode *Caenorhabditis elegans* da Fire et al. (1998) consistente nel “silenziamento” dell’espressione di un segmento di DNA codificante “polipeptide/i” a opera di molecole di RNA a doppio filamento; grazie a tale scoperta Fire e Mello hanno ricevuto il Nobel (2006). Sono stati proposti due possibili modelli per spiegare i meccanismi dell’interferenza mediata dagli RNA: (a) modello di Zamore et al. (2000) che prevede: (i) taglio, a opera dell’enzima *dicer*, della molecola di RNA a doppio filamento che innesca il fenomeno dell’interferenza in piccole molecole di RNA (~ 22 nucleotidi) a doppio filamento, denominate *siRNA* (*short interference RNA* = RNA corto di interferenza); (ii) associazione dell’*siRNA* con proteine con la formazione di un complesso “*siRNA*-proteina” inattivo; (iii) conversione del complesso “*siRNA*-proteina” “inattivo” in quello “attivo” di silenziamento “RISC” (*RNA Induced Silencing Complex* = complesso di silenziamento indotto dall’RNA), in cui le molecole di *siRNA* sono a singolo filamento; (iv) interazione del RISC con l’RNA messaggero trascritto dal segmento di DNA che deve essere “silenziato” e degradazione dell’*mRNA*; (b) modello di Lipardi et al. (2001) che differisce da quello precedente per il fatto che l’*siRNA* a singolo filamento interagirebbe con l’*mRNA* bersaglio complementare funzionando da *primer* (innesco) per la sintesi di RNA lunghi a doppio filamento a opera di una RNA polimerasi RNA dipendente; tale processo darebbe origine a molecole di RNA a doppio filamento di lunghezza sufficiente per essere tagliate dall’enzima *dicer*, il quale degraderebbe l’*mRNA* e, nello stesso tempo, genererebbe nuovi *siRNA*; in questo modo l’*mRNA* verrebbe

segmenti di DNA responsabili di malattia (Paddison et al., 2002a e b; Carmell et al., 2003; Siolas et al., 2005); applicazione che si concretizza grazie alla possibilità di “veicolare”⁹⁰ nella cellula bersaglio piccole molecole di RNA a doppio filamento in grado di “antagonizzare” l'*mRNA* trascritto dal segmento di DNA che si intende silenziare. La tecnica del “silenziamento mirato” di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” ha ricevuto un notevole impulso grazie all'utilizzo di brevi RNA *a forcina*, denominati *shRNA* (*short hairpin* RNA) per innescare il fenomeno dell’“interferenza” quando veicolate in una cellula.

La realizzazione di librerie “murine” e “umane” di *shRNA* “silenziatori” è oggetto di particolare interesse anche per una loro futura utilizzazione (Berns et al., 2004; Paddison et al., 2004). A oggi i segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” che possono essere silenziati sono circa 10.000.

Ivanova et al. (2006) hanno contribuito, mediante il *silenziamento dell'espressione di segmenti di DNA*, alla comprensione nei meccanismi molecolari responsabili della *capacità di autorinnovamento (self renewal)* delle cellule ES nel topo. L'RNA *breve a forcina* è stato impiegato per “spegnere” (“silenziare” o *knocking-down*)⁹¹ 65 segmenti di DNA coinvolti, probabilmente, nella rego-

degradato attraverso un ciclo di “PCR degradativa”; questo modello è stato confermato da Sijen et al. (2007).

⁹⁰ *Veicolazione*: processo di trasporto di DNA o di RNA che richiede l'impiego di opportuni “carrier” (molecole con funzione di “trasporto”) o “vettori”; di largo impiego e di notevole efficienza sono i vettori costituiti da *virus ingegnerizzati* anche se il loro utilizzo desta alcune preoccupazioni che stanno orientando la ricerca verso la messa a punto di *vettori sintetici non virali (liposomi cationici)* in grado di *complessare* gli acidi nucleici carichi negativamente. Ewert et al. (2006) hanno realizzato un nuovo “vettore lipidico” caratterizzato da una testa idrofila dotata di 16 cariche positive che rendono la molecola in grado di legare molto efficientemente il DNA. Un altro metodo per trasferire molecole di acido nucleico in una cellula senza ricorrere a virus è il cosiddetto “bombardamento genico” (“*gene gun*”) consistente nell'utilizzo di particolari strumenti o *elettrici* o ad *alta pressione* per *veicolare* nella cellula particelle microscopiche di oro o di tungsteno ricoperte da DNA; questa tecnica è utilizzabile in qualsiasi specie in quanto la *veicolazione* è governata da fattori “fisici” e non “biologici”; tuttavia, questa *veicolazione* non è stabile, al pari di quella effettuata tramite i “liposomi” ed è particolarmente svantaggiosa nel caso di cellule proliferanti con la necessità di ripetere le iniezioni nel tempo. Come evidenziato da Matassino (1999, 2002), la *veicolazione* di DNA esogeno riveste notevole significato operativo nella utilizzazione di alcune *biopoesi* quali fonte di “molecole” di interesse farmaceutico per l'uomo (Velander et al., 1997; Wall, 1998; Harvey et al., 2002). La Oxford Biomedica, in collaborazione con la VIRAGEN (Scozia) e con il Roslin Institute (Scozia) (2007), utilizzando vettori lentivirali per la *veicolazione* di “costrutti di DNA esogeno”, ha ottenuto galline in grado di produrre uova il cui albume contiene proteine “ricombinanti” con funzione di farmaco; l'espressione dei segmenti di DNA esogeno responsabili della sintesi di queste proteine è regolata in modo tale da: (a) avvenire in maniera specifica nelle cellule dell'ovidutto; (b) non essere “silenziata” nelle successive generazioni.

⁹¹ *Knocking-down*: perdita di funzione di un segmento di DNA ottenuta attraverso l’“interferenza

lazione del *processo di autorinnovamento delle cellule staminali*. Il *silenziamiento di 7 dei suddetti segmenti di DNA interferisce negativamente sul processo di autorinnovamento (pluripotenza)* suggerendo che i fattori di trascrizione da essi codificati giocano un ruolo importante.

Questa strategia di *silenziamiento* presenta potenzialità notevoli anche nel settore zootecnico, specialmente ai fini terapeutici. Ad esempio, Golding et al. (2006), in associazione o con la “clonazione somatica”⁹² o con la fecondazione “*in vitro*”, hanno “silenziato” l’espressione del segmento di DNA codificante la proteina prionica “normale” nella specie “caprina” e in quella “bovina”. Il risultato di questa ricerca consiste in una riduzione considerevole della sintesi della proteina prionica “normale”; quindi trattasi di un percorso conducente a una prevenzione della “encefalopatia spongiforme bovina” (BSE, *bovine spongiform encephalopathy*) anche se non trascurabile è il limite nei meccanismi biologici implicati nella “clonazione somatica” (Matassino, 1998, 1999). Questa possibilità potrebbe rappresentare una valida alternativa al metodo del “*Knock out*”.

I vantaggi del silenziamento da *knock-down* consistono, fra l’altro, nella possibilità di ripristinare l’attività del segmento di DNA “silenziato” se questo intervento dovesse essere ritenuto utile per gli scopi da raggiungere in una “biopoiesi”.

Gli *shRNA* si sono rivelati, altresì, utili per la soppressione di virus esogeni e di retrovirus endogeni in specie d’interesse zootecnico (Karlas et al., 2004; de los Santos et al., 2005).

Richt et al. (2006) hanno ottenuto bovini *knock out* allo stato “omozigote” per il segmento di DNA codificante la proteina prionica normale con il sistema del “bersagliamento sequenziale di segmenti di DNA” (*sequential gene-targeting system*) messo a punto da Kuroiwa et al. (2004). Su un totale di 85 embrioni *Knock out* impiantati sono nati 12 soggetti (efficienza del 14%), attualmente di 20 mesi di età. Questi soggetti sono stati valutati “normali” dal punto di vista clinico, fisiologico, istopatologico e immunitario. Per quanto attiene all’aspetto riproduttivo, sono stati ottenuti 20 embrioni a partire da spermatozoi isolati dai soggetti *Knock out* e utilizzati per

mediata da RNA”; la perdita funzionale non è associata all’alterazione strutturale del segmento di DNA interessato a differenza di quanto avviene nel *knock-out* che, invece, comporta anche un’alterazione strutturale del segmento di DNA; infatti, il *knock-out* consiste nella *sostituzione* del segmento di DNA “selvatico” (“*gene transplacement*”) con un suo derivato reso “inattivo” o “nullo” introducendo una sequenza in grado di compromettere la funzione.

⁹² *Clonazione somatica*: ottenimento di “cloni” mediante il trasferimento del nucleo proveniente da una cellula somatica “adulta” “sdifferenziata” in un citoplasto come un oocita enucleato.

la fertilizzazione “*in vitro*” con oociti di soggetti cosiddetti “selvatici” (non sottoposti a *Knock out*); questi embrioni allo stadio di blastocisti sono stati trasferiti in 8 bovine attualmente al 40. giorno di gestazione. Si resta in attesa di verificare gli effetti del *Knock out* sui soggetti che si svilupperanno da questi embrioni, nonché sulla prole che si otterrà da detti soggetti. Inoltre, le ricerche di Richt et al. (2006) hanno evidenziato che confrontando il tessuto nervoso di bovini “normali” con quello di soggetti *Knock out* si ha assenza di propagazione della proteina prionica patogenetica nei secondi.

Questa tappa è un primo passo per poter intervenire antropicamente nel ridurre patologie in animali d’interesse zootecnico.

4.3.3. Trascrittoma

La determinazione del “*potenziale di espressione*” o *trascrittoma* (*RNAoma*), in un dato momento del ciclo cellulare, è una strada da perseguire per esplorare la “complessa funzione” di un segmento di DNA “codificante”.

La conoscenza delle differenze quantitative delle varie “specie” di RNA permetterà di ottenere “informazioni” per la stima della “variabilità fenotipica” totale e delle sue “componenti”; queste informazioni sono utilizzabili nella selezione o nella *introgressione assistita dal molecolare* (MAS, *molecular assisted selection*; MAI, *molecular assisted introgression*).

Come evidenziare l’espressione del repertorio di segmenti di DNA “codificanti” in una cellula, in un tessuto o in un individuo? A oggi, sono disponibili diverse metodiche:

(a) *visualizzazione differenziale* o impronta digitale dell’RNA (*RNA-fingerprinting*)⁹³ (Liang e Pardee, 1992);

⁹³ *Visualizzazione differenziale RT-PCR* (DD RT-PCR, *differential display Reverse transcriptase – polymerase chain reaction*): metodo che permette di incrementare una “sottopopolazione” di *cDNA* (DNA complementare = *complementary DNA*) mediante trascrizione inversa di sottoinsiemi di *mRNA* (provenienti da tessuti differenti dello stesso individuo oppure dallo stesso tessuto di individui differenti) in *cDNA* e sua amplificazione, nonché suo clonaggio; esso offre il vantaggio di favorire il clonaggio di quei *mRNA* rari minimizzando l’isolamento di *EST* (*expressed sequence tag* = etichette o segnali di sequenze espresse; ciascuna etichetta è identificativa di un “messaggero” “unico”) “rappresentative” dei cosiddetti segmenti di DNA *housekeeping* (segmenti di DNA “ubiquitari”, nel senso che essi sono espressi in tutte le cellule dell’organismo) ma, a differenza della SSH, la metodica “DD RT-PCR” non garantisce l’analisi esclusiva di quei segmenti di DNA differenzialmente espressi ed è poco adatta alla ricerca mirata dell’espressione di segmenti di DNA “noti”; questa carenza di “garanzia” suggerisce l’uso della metodica “*microarray*” che è in grado di evidenziare la diversità di espressione di vari segmenti di DNA codificanti.

- (b) *analisi seriale dell'espressione genica*⁹⁴ (Velculescu et al., 1995);
- (c) “*micromatrice*” di segmenti di DNA “codificanti” (“*DNA microarray*”)⁹⁵ (Skena et al., 1995);
- (d) *ibridazione sottrattiva di soppressione*⁹⁶ (Diatchenko et al., 1996).

Attualmente, l'analisi “*microarray*” rappresenta la strategia più perseguita nella conoscenza del trascrittoma nonostante che l'approccio “*microarray*” implichi la necessità della *validazione* dei dati⁹⁷. Tale esigenza è legata alle innumerevoli fonti di variabilità insite nella stessa metodica:

- (a) *disegno sperimentale*;
- (b) *campionamento ed estrazione dell'RNA*;
- (c) *protocollo di ibridazione e di marcatura*;
- (d) *impostazione strumentale, con particolare riferimento all'analisi dell'immagine*;
- (e) *elaborazione e normalizzazione del dato*;
- (f) *interpretazione del dato*.

Queste fonti di variazione possono *accentuare o minimizzare* l'effettiva variazione biologica alla quale si è interessati (Jenssen et al., 2002; Kothapalli et al., 2002; Wittwer et al., 2002).

L'importanza di questa metodica e della sua problematica ha suggerito la costituzione di una Società scientifica: MGED (*Microarray Gene Expression Data*

⁹⁴ *Analisi seriale dell'espressione genica* (SAGE, *serial analysis of gene expression*): metodo basato sul sequenziamento “in serie” di EST, ciascuna delle quali identificativa di un “messaggero” “unico”; esso non richiede la conoscenza “a priori” dei segmenti di DNA da analizzare e consente di individuare nuovi segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” nonché di quantificare l'*mRNA* originatosi da tali “segmenti”; la costituzione di archivi di EST (Adams et al., 1991; Davoli et al., 1999; Grosse et al., 2000; Smith et al., 2001; Band et al., 2002; Boardman et al., 2002; Davoli et al., 2002; Yao et al., 2002) ha consentito un ampio sviluppo di questo metodo; il numero di EST a oggi sequenziate in alcuni organismi eucarioti è riportato nella tabella 5.

⁹⁵ “*Micromatrice*” di segmenti di DNA “codificanti” (“*DNA microarray*”): metodo basato sull'*ibridazione* di segmenti di DNA “noti” [oligonucleotidi o *cDNA* distribuiti secondo uno schema ordinato (*array*) su una piccola superficie solida] con segmenti di *cDNA* marcati con fluorocromi; la fluorescenza emessa dall'ibrido è indicatrice della presenza di segmenti di DNA funzionalmente espressi (“accesi”) o “attivi” dal punto di vista trascrizionale; l'entità di questa fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di *mRNA* trascritta.

⁹⁶ *Ibridazione sottrattiva di soppressione* (SSH, *Suppression Subtractive Hybridization*): metodo che mira a incrementare una “popolazione” di *cDNA* specifica di un tessuto o di un tipo di cellula mediante l'amplificazione dei segmenti di *cDNA* “specifici” e la *soppressione dell'amplificazione dei cDNA “non specifici”*, cioè espressi anche in altri tipi di tessuto o di cellula; tale metodo offre il vantaggio di isolare anche trascritti presenti in minima quantità, ma può fornire “falsi positivi” associati alla PCR.

⁹⁷ *Validazione* dei dati: procedura per la quale la Food and Drug Administration (FDA) ha previsto: (a) costituzione di banche dati pubbliche; (b) disponibilità di materiale biologico di riferimento e di controllo per la valutazione della riproducibilità e della sensibilità.

Society)⁹⁸ che, attualmente, persegue *6 principali progetti di standardizzazione*⁹⁹. A oggi, la conferma dei risultati ottenuti con l'approccio *microarray* viene effettuata con il sistema di "reazione a catena della polimerasi in tempo reale" (*real time* PCR), che permette di quantificare in modo relativo o assoluto le variazioni di espressione di segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i".

L'analisi *microarray* consente di visualizzare *rapidamente e simultaneamente* migliaia di identità e/o di *differenze* di espressione individuando segmenti di DNA "accesi" o "spenti" e di valutare l'entità di *espressione relativa* mediante un *confronto a due a due* (ad esempio: *stesso* tessuto di *due* individui differenti oppure *due* tessuti differenti dello *stesso* individuo): a oggi, è possibile indagare l'espressione *simultanea* di circa 100.000 segmenti di DNA "codificanti". *Nel settore zootecnico, grazie a questa possibilità, la metodica microarray rappresenta sempre più la base di numerose ricerche finalizzate alla comprensione dei meccanismi di importanti e complessi processi fisiologici* (ad esempio: *sviluppo del tessuto muscolare e metabolismo del tessuto adiposo*) per i quali è richiesto un approccio di tipo "sistemico"; approccio ben lontano dalle metodiche tradizionali (*Northern blotting*, ibridazione *in situ*, saggi di protezione da *RNAasi*), le quali consentono di esaminare i cambiamenti di espressione soltanto di pochi segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i", esperimento per esperimento. Tra l'altro, l'approccio *microarray* permette di rilevare "simultaneamente" a "livello individuale" il "polimorfismo genetico". Infatti, la "tipizzazione simultanea" di più *loci* consente di individuare *aplotipi* e/o segmenti *codificanti* che operano contemporaneamente; "aplotipo" identificabile con un'unità di *trasmissione da genitore a figlio* (Bettini, 1970; Pagnacco et al., 1983; Matassino et al., 1993; Zullo et al., 1994).

⁹⁸ *MGED: Microarray Gene Expression Data Society* = società che si occupa della gestione dei dati relativi all'espressione di segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i"; essa ha lo scopo di *facilitare* la condivisione di elementi rilevati con esperimenti di genomica funzionale e di proteomica entro la Comunità scientifica.

⁹⁹ *Progetti di standardizzazione*: essi includono: (a) MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment* = indicazione di informazioni minime di esperimenti *microarray* richieste per interpretare e verificare i risultati); (b) *MAGE-ML (Microarray And Gene Expression-Markup Language* = realizzazione di un "format modello oggetto" per lo scambio di risultati di esperimenti *microarray*), (c) *GO (Gene Ontology* = redazione di un "vocabolario descrittivo" dinamico temporalmente "non arbitrario" del prodotto di espressione di segmenti di DNA in termini di "funzione molecolare", "ruolo/i biologico/i" e "ubicazione/i cellulare"), (d) *MT (Microarray Transformation* = compilazione di raccomandazioni relative a metodi di normalizzazione di "dati" acquisiti sperimentalmente), (e) *RSB WG (Reporting Structure for Biological Investigations Working Groups* = definizione di modelli di struttura di riferimento di gruppi di lavoro per le investigazioni biologiche), (f) *MISFISHIE (Minimum Information Specification For In Situ Hybridization and Immunohistochemistry Experiments* = indicazione di strategie tecniche minime da perseguire affinché i risultati possano essere considerati attendibili).

In *ambito internazionale*, le applicazioni della metodica *microarray* al settore zootecnico sono documentate da una recente e vasta letteratura (tab. 4); in *ambito nazionale*, il progetto FIRB (Fondo Investimenti per la Ricerca di Base): «*Identificazione e analisi dell'espressione dei geni nel suino per lo studio e il miglioramento della produzione e della qualità della carne*» (2002-2006) può essere, invece, considerato “pionieristico”.

Alcune ricerche in ambito internazionale. Nel *bovino* Jersey, Band et al. (2003) hanno analizzato le differenze dei profili di espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” in 17 differenti tessuti campionati da un vitello di una settimana di età identificando 29 segmenti di DNA con espressione di ben 50 volte inferiore rispetto allo standard di riferimento; l'analisi dei *cluster* ha evidenziato gruppi di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” comuni ai tessuti: gastrico, immunitario, muscolare e nervoso.

Di particolare rilevanza per quanto attiene all'*accrescimento del muscolo* sono quei segmenti di DNA la cui attività trascrizionale *varia in condizioni di atrofia o di ipertrofia muscolare* (Carson et al., 2001; Jagoe et al., 2002; Wittwer et al., 2002). A tal proposito i dati a oggi disponibili evidenziano che *i cambiamenti nella massa muscolare sono accompagnati da variazioni dell'espressione di segmenti di DNA coinvolti nel “turnover” proteico, nel “metabolismo” e nella “trasmissione neuromuscolare”*.

Suino. Seo e Beever (2001) hanno comparato i cambiamenti di espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” in 7 tessuti coinvolti nella regolazione del metabolismo e dell'accrescimento prelevati a 28, 56, 90 e 165 giorni di età da soggetti con *basso e alto incremento ponderale*; essi hanno rilevato che i segmenti di DNA codificanti la *gamma-actina*, la *troponina* e la *tropomiosina* sono *iperespressi* nei muscoli dei *lombi* e del *prosciutto* nel gruppo di *suini con elevato tasso di accrescimento ponderale* a tutte e quattro le età prese in considerazione.

Ernst et al. (2002) hanno costituito una “libreria normalizzata” a cDNA¹⁰⁰ di muscolo scheletrico proveniente dall'arto posteriore di soggetti a: 45 e 90 giorni di sviluppo fetale, nascita e 7 settimane di età; essi hanno evidenziato che ben 55 cloni presentavano un'entità di espressione due volte più elevata nel muscolo scheletrico fetale rispetto a quello proveniente da soggetti di 7 settimane di

¹⁰⁰ “*Libreria normalizzata*” a cDNA: archivio in cui ciascuna molecola di “trascritto” è uniformemente rappresentata dal punto di vista quantitativo (Soares et al., 1994); la “normalizzazione” si ottiene sottoponendo la popolazione di cDNA a un processo di denaturazione seguito da riassociazione in modo che le molecole di cDNA più abbondanti si riassociano più rapidamente e possono essere parzialmente sottratte; il decremento delle molecole più abbondanti è pari a un fattore di “1000-10.000”.

età; non è stato identificato alcun *clone* iperespresso nel muscolo proveniente dai suini di 7 settimane di età.

Bai et al. (2003) in uno studio dei profili di espressione nei muscoli *Psoas Major* (PM) e *Longissimus Dorsi* (LD) di soggetti di 3 giorni di età hanno identificato 70 “segmenti” di DNA *maggiormente espressi* nel PM e 40 *maggiormente espressi* nell’LD; questi segmenti di DNA finora inclusi nei *database* interessano principalmente quelli:

- (a) *codificanti “polipeptide/i” mitocondriali;*
- (b) *coinvolti nella gluconeogenesi o nella glicolisi;*
- (c) *partecipanti alla “trascrizione”, alla “traduzione” e alla “trasduzione” di segnale;*
- (d) *codificanti le proteine sarcomeriche strutturali.*

Alcune ricerche in ambito nazionale. Nel suino, il progetto FIRB, precedentemente citato, coinvolgente 6 unità operative¹⁰¹, si prefigge essenzialmente la:

- (a) *analisi dell’espressione differenziale* con metodi “richiedenti” e “non” l’identificazione preliminare di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”;
- (b) *individuazione di polimorfismi, il mappaggio di segmenti di DNA e l’analisi di associazione.*

L’espressione differenziale di “segmenti” di DNA ha interessato il *confronto dei profili trascrizionali di tessuti* (adiposo e muscolare) e di organi (fegato) tra:

- (a) *tipi genetici differenti* [Duroc (Du), Large White (LW), Casertana (CT), Landrace (LA), Pietrain (P)];
- (b) *gruppi di soggetti divergenti, entro il tipo genetico, per alcune caratteristiche qualitative della carne* (potenziale glicolitico, calo di prima salagione del prosciutto da stagionare);
- (c) *gruppi di soggetti sottoposti a diversi livelli di stress;*
- (d) *gruppi di soggetti macellati a età diverse.*

L’applicazione della SAGE ha permesso di studiare *l’evoluzione dell’espressione di segmenti di DNA* durante la crescita in soggetti di tipo genetico diverso fornendo interessanti risultati; nei tipi genetici Du e LW, a 3 e a 9 mesi, è stata rilevata complessivamente la presenza di:

¹⁰¹ *Unità operative:* Dipartimento di protezione e valorizzazione agroalimentare (DIPROVAL) – Sezione di Allevamenti zootecnici, Università di Bologna (Responsabile: prof. V. Russo); Dipartimento Produzioni animali, Università di Udine (Responsabile: B. Stefanon); IBBA/CNR, Milano (Responsabile: dr. B. Castiglioni); Istituto Zootecnica, Università Cattolica Sacro Cuore (PC) (Responsabile: prof. P. Ajmone Marsan); Dipartimento di Scienze animali, vegetali e dell’ambiente, Università del Molise (Responsabile: prof. F. Pilla); Dipartimento di Produzioni animali, Università della Toscana (Responsabile: prof. A. Valentini); le 6 unità sono coordinate dal prof. V. Russo.

- (a) 55.222 “etichette” (EST, segnale di sequenza espressa) “totali”;
- (b) 18.063 “etichette” “uniche” (32,7%);
- (c) 580 “etichette” “comuni” (1,05%);
- (d) 108 “etichette” “differenzialmente espresse” (0,2%).

Nei tipi genetici indagati, a 3 mesi, è stato individuato un numero maggiore di *segmenti di DNA sottoregolati* (coinvolti prevalentemente nei processi metabolici e fisiologici cellulari) rispetto a quello dei *segmenti di DNA sovraregolati*; all'età di 9 mesi, il numero di “segmenti” “sottoregolati” tende a equilibrarsi a quello dei “segmenti” “sovraregolati”. Considerando contemporaneamente i tipi genetici indagati, la distribuzione dei segmenti di DNA espressi a 3 mesi evidenzerebbe una maggiore “discriminazione” rispetto a quelli espressi a 9 mesi di età ove vi sarebbe una minore differenza tra i tipi genetici; in particolare, per quanto concerne le *proteine “strutturali”* (*miotilina*¹⁰², *miozenina 1*¹⁰³, *miomesina*¹⁰⁴) tali differenze di espressione sono particolarmente evidenti nel muscolo LD; in più, la ID3¹⁰⁵ riveste una particolare *importanza differenziale* alle diverse età considerate; queste differenze di espressione sarebbero identificabili nel differente accrescimento muscolare rilevato fra i tre tipi genetici presi in esame: CT<DU<LW (Stefanon et al., 2006).

Questa differenza nel comportamento tra i suddetti tipi genetici potrebbe risiedere nel dover considerare l'importanza del ruolo che riveste l'“epigenoma” e non solo quella del “genoma” (Matassino, c.p. 2006).

Dal confronto dell'espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptidi” tra tipi genetici “estremi” (CT e LW) sono stati individuati sia *segmenti di DNA differenzialmente* espressi sia l'*esistenza di una elevata variabilità individuale di espressione*; la conoscenza della “fisiologia dell'espressione” di tali segmenti è ancora limitata. Inoltre, lo studio delle differenze di espressione dei segmenti di DNA “leptina”, “recettore 4 della melanocortina”, “adinopectina”, “recettori 1 e 2 dell'adinopectina” e “catepsina F” ha consentito di rilevare che il “sistema adinopectina” è *differenzialmente espresso nei tipi genetici CT e LW* (Pilla, 2006).

Nello studio dei profili di espressione di tipi genetici estremi (CT e LW) anche il *fegato* si è dimostrato un “sistema modello”. Il confronto tra i *pool*

¹⁰² *Miotilina*: proteina espressa nel muscolo cardiaco e scheletrico; essa interagisce con l'*alfa-actinina* nella banda I del sarcomero.

¹⁰³ *Miozenina 1*: proteina che interagisce con la *miotilina* e potrebbe giocare un ruolo nella miofibrillogenesi.

¹⁰⁴ *Miomesina*: immunoglobulina espressa in tutte fibre del tessuto muscolare in via di sviluppo.

¹⁰⁵ ID3: *inhibitor of DNA Binding 3* = inibitore 3 del legame al DNA; fattore di trascrizione regolante la sintesi della *miogenina* e coordinante la deposizione proteica nel muscolo.

media le differenze individuali con una ripetibilità degli esperimenti “medio-alta” (0,63) (Ajmone Marsan, 2006).

L'analisi di espressione differenziale in “cosce” di soggetti LA e LW *con caratteristiche estreme per sette manifestazioni fenotipiche* ha consentito di individuare 400 segmenti di DNA differenzialmente espressi dei quali solo per 28 non è stata trovata alcuna descrizione in banca dati (Iacuanello et al., 2006).

Per l'analisi delle differenze dei “profili di espressione” del tessuto *muscolo-scheletrico* di soggetti “estremi” per alcuni parametri qualitativi (*potenziale glicolitico*¹⁰⁶ e *calo di prima salagione* del prosciutto da stagionare), le metodiche SSH, DD RT-PCR e DNA *microarray* hanno consentito di (Russo et al., 2006):

(a) *individuare segmenti di DNA* coinvolti in importanti vie metaboliche per ciascuno dei due *pool* estremi (“alto” e “basso potenziale glicolitico”); ad esempio, i segmenti di DNA codificanti enzimi coinvolti nella fosforilazione ossidativa sono molto espressi nel *pool tester* a “basso potenziale glicolitico”;

(b) *definire il numero di segmenti di DNA* “sovraespressi” nei due *pool* estremi: 176 e 74 nei *pool* “basso” e “alto potenziale glicolitico”, rispettivamente;

(c) *identificare* 10 segmenti di DNA “candidati” per il “calo di prima salagione”.

Dal confronto fra soggetti “sottoposti” e quelli “non sottoposti” a diversi livelli di stress, Russo et al. (2006), con l'approccio *microarray* hanno evidenziato la:

(a) *esistenza di un numero elevato* di segmenti di DNA espressi in modo *differenziale* tra soggetti “stressati” e “non stressati” con interessanti differenze tra i tipi genetici;

(b) *influenza dell'allele “n”*¹⁰⁷ del segmento di DNA “alotano” sul numero di segmenti *differenzialmente espressi (DE)*: 766 sono i segmenti di DNA *DE* nei portatori del genotipo “Nn” del tipo genetico *Pietrain vs 288* nei por-

¹⁰⁶ *Potenziale glicolitico*: parametro biochimico utilizzabile per predire l'“idoneità” della carne suina alla trasformazione in prodotti stagionati essendo esso correlato con il pH e con la capacità di ritenzione idrica, con il colore, con la resa di stagionatura (Nanni Costa et al., 2000). Gli enzimi maggiormente coinvolti sono: PKM2 (*Piruvate kinase muscle 2* = piruvato chinasi muscolare 2); PGAM2 (*Phosphoglycerate mutase 2, muscle* = fosfogliceromutasi 2 muscolare); PRKAG3 (*Protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit* = subunità gamma 3 non catalitica della proteina chinasi attivata dall'AMP).

¹⁰⁷ *Allele “n”*: esso, presente allo stato “omozigote”, è responsabile della “ipertermia maligna” nell'uomo (MH, *Malignant Hyperthermia*) e della “sindrome da stress” nel suino (PSS, *Porcine Stress Syndrome*); quest'ultima, tra l'altro, si manifesta con la “miopatia pallida, soffice, essudativa” (PSE, *pale, soft, exudative*), che influenza negativamente la qualità della carne suina soprattutto ai fini della sua trasformazione.

tatori “NN” dello stesso tipo genetico.

Una *probabile spiegazione* del diverso comportamento del genotipo “Nn” rispetto a quello “NN” potrebbe essere individuata nel fatto che l’allele “n” attiverebbe un elevato numero di segmenti di DNA *differentialmente espressi*, e quindi, sembrerebbe fungere da “gene master” capace di influenzare in modo determinante lo svolgersi delle *attività di “cascata” di segmenti di DNA* (Matassino, c.p. 2006). Infatti, secondo Webb et al. (1982) il segmento di DNA per la sensibilità all’alotano non influisce solo sulla qualità della carne, ma anche su altre caratteristiche importanti dal punto di vista economico, quali le prestazioni riproduttive, il grado di sopravvivenza *post-svezzamento* e il contenuto in carne magra.

L’identificazione di *SNP* in “geni candidati” ha interessato segmenti di DNA espressi nel tessuto *adiposo, epatico e muscolare*. Complessivamente, sono stati analizzati 110 segmenti di DNA e sono state individuate 148 mutazioni includenti: “sostituzione”, “inserzione” e “delezione” puntiformi. La valutazione dell’“associazione” tra *SNP* e caratteristiche qualitative della carne ha interessato soltanto 11 segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” riguardanti il *potenziale glicolitico* e alcune *proteine lisosomiali* (ad esempio *cathepsine*) o *loro inibitori* (ad esempio *cistatine*)¹⁰⁸; il risultato evidenzia che l’approccio del “gene candidato” contribuirebbe, in associazione con l’approccio della “genomica funzionale”, alla identificazione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” “utili” per un loro impiego ai fini del miglioramento genetico della “qualità” (*in senso lato*) della carne (Fontanesi, 2006).

A conferma di quanto riferito in precedenza (“gene candidato”), l’uso di procedure innovative (*luminometria*) può rappresentare uno strumento utile per l’“analisi funzionale” di *SNP* in “regioni regolative” di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” correlati alla qualità della carne suina. Relativamente al segmento di DNA codificante il recettore delle lipoproteine a bassa densità (*LDLR*)¹⁰⁹ sono state individuate *mutazioni puntiformi* originanti

¹⁰⁸ *Proteinasi lisosomiali o loro inibitori*: Cathepsina B (CTSB, *Cathepsin B*), Cathepsina D (CTSD), Cathepsina F (CTSF), Cathepsina H (CTSH), Cathepsina L (CTSL), Cathepsina Z (CTSZ), Cistatina B (CSTB, *cistatin B*), Cistatina C (CST3) che esplicano numerose funzioni biologiche: (a) *infra vitam*: (i) *eliminazione e riciclo* di sostanze, organuli intracellulari danneggiati nonché sostanze assunte dalla cellula; (ii) *conversione di alcuni proenzimi* nelle loro forme attive (insulina, albumina, paratormone, ecc.); (iii) *turnover proteico intra ed extracellulare*; (iv) *processi di cancerogenesi*; (b) *post mortem*: (i) *processi di conversione* del muscolo in carne con particolare riferimento alla frammentazione delle miofibrille; (ii) *variazione della consistenza* del prosciutto crudo.

¹⁰⁹ *LDLR*: *Low Density Lipoprotein Receptor* = *recettore delle lipoproteine a bassa densità*; recettore di

un aplotipo costituito da 2 loci: “LDLR 1-31” e “LDLR 55-59”¹¹⁰. Queste mutazioni influenzerebbero l’efficienza trascrizionale del segmento di DNA “LDLR” (Valentini, Crisà, 2006).

Mutazioni puntiformi e qualità della carne e del latte. Il dinamismo di scoperta di *mutazioni puntiformi*¹¹¹ è foriero di nuove acquisizioni di brevi segmenti di DNA con funzione sia regolatrice che codificante “polipeptide/i” influenzante/i le diverse modalità di espressione e, conseguentemente, la variabilità nelle manifestazioni fenotipiche. In questo contesto, particolare valore semantico assume *l’evoluzione molecolare intraspecifica* nel provocare anche una “deriva casuale” di segmenti di DNA che possono assumere un comportamento di “neutralità”; questo comportamento può provocare una dicotomia fra il paradigma “neutralista” (Kimura, 1967, 1968a e b) e il paradigma “panselezionista” che è ben rappresentata dall’espressione di Mayr (1963) «è estremamente improbabile che un qualsiasi gene (n.d.r. segmento di DNA codificante “polipeptideli”) rimanga neutrale di fronte alla selezione per un tempo illimitato». Indubbiamente questa ipotesi di Mayr è basata sostanzialmente su osservazioni a livello fenotipico, cioè a livello della forma e della funzione.

Oggi, è possibile indagare in modo più intimo sulla fisiologia dei vari segmenti di DNA, quindi sulla sua complessa struttura grazie alla biologia molecolare.

Uno dei supporti teorici della “neutralità dell’evoluzione molecolare” è offerto dall’uso delle equazioni differenziali parziali chiamate “equazioni di

superficie che svolge un ruolo importante nel mantenere l’omeostasi del colesterolo; alcune mutazioni a livello del segmento di DNA codificante tale recettore sono responsabili di un aumento del colesterolo plasmatico; nel suino sono state individuate regioni promotrici necessarie per la regolazione trascrizionale da parte degli steroli (Sekar, 2006).

¹¹⁰ “LDLR 1-31” e “LDLR 55-59”: i suffissi “1-31” e “55-59” indicano la regione del promotore a cui si legano i rispettivi fattori di trascrizione.

¹¹¹ *Mutazione puntiforme*: modificazione di una singola base della sequenza nucleotidica; la mutazione puntiforme può identificarsi con una: (a) *transizione*: sostituzione di una base pirimidinica con l’altra (C con T o viceversa) o di una base purinica con l’altra (A con G, o viceversa); (b) *trasversione*: sostituzione di una base nucleotidica purinica (G o C) con una base pirimidinica (A o T) o viceversa; (c) *delezione* di una singola base; (d) *inserzione* di una singola base. In relazione all’effetto su una proteina, la mutazione puntiforme può essere: (a) *di senso* (o *missense*): la variazione della base si traduce nella sostituzione di un amminoacido a carico della proteina; (b) *di terminazione (non sense)*: la modificazione della base provoca la sostituzione della tripletta di basi (*codone*) codificante un amminoacido con un codone di *stop*, il che si traduce nell’arresto della traduzione e quindi in un accorciamento della proteina; (c) *mutazione sinonima o neutra (stesso senso)*: la modificazione della base trasforma il codone in uno “sinonimo”, cioè in un codone che codifica sempre lo stesso amminoacido, per cui la sequenza amminoacidica della proteina rimane invariata; tale effetto è dovuto a una “degenerazione” del codice genetico. Una mutazione puntiforme viene considerata un SNP quando è presente nella popolazione in misura superiore dell’1%.

diffusione”¹¹².

La evoluzione molecolare è particolarmente evidente nell’“infinito” dinamismo del “proteoma” che altro non è che il risultato del dinamismo funzionale dei componenti il DNA a partire dalla sostituzione di almeno una base nucleotidica. Quasi certamente molti polimorfismi proteici non hanno dato, non danno e non daranno origine a vistosi effetti fenotipici visibili e rilevabili (stante le attuali metodiche di indagine), però essi contribuiscono a favorire nuovi equilibri nell’immenso e prodigioso laboratorio biochimico della singola cellula. Questa teoria della neutralità attribuisce indubbiamente ai segmenti di DNA codificanti “neutrali” una loro funzione nel senso che essi sono in grado di favorire e di contribuire alla “fitness” di un individuo vivente.

Probabilmente, le strategie impiegate dal DNA sono diverse a seconda se si considera l’evoluzione molecolare e quella fenotipica; in questo contesto si può presumere che i vincoli (*constraint*) siano anch’essi differenti nel considerare l’aspetto sia “teonomico” che “teleonomico” della sostanza vivente entro un determinato microambiente.

Secondo Kimura (1980), un principio base dell’evoluzione molecolare è: «quanto più debole è il vincolo funzionale su una molecola o su una parte di essa, tanto più alta è la velocità evolutiva della sostituzione di mutanti». Non bisogna dimenticare che il codice genetico è un codice “degenerato”, nel senso che triplette diverse possono dare origine alla formazione di uno stesso amminoacido (tranne che per la metionina e per il triptofano).

Il polimorfismo può essere considerato una fase dell’evoluzione molecolare e la “selezione bilanciatrix”, basata sulla superiorità della selezione “eterotica” o “vantaggio dell’eterozigote”, non può spiegare la *complessità* delle continue variazioni genetiche a livello popolazionistico.

Modelli matematici in grado di studiare quantitativamente, sulla base della genetica di popolazione, la “produzione” di mutanti sono stati messi a punto da Crow (1974), ma i risultati da trasferire in campo operativo sono lungi da una loro utilizzazione zootecnica.

Dato che l’allevamento è un’attività economica, il miglioramento della sua efficienza in termini di “economia fisiologica” dovrebbe prevedere l’individuazione di quei genotipi che, a parità di prestazione, hanno un indice di conversione alimentare favorevole (Matassino, 1978).

¹¹² *Equazioni di diffusione*: i modelli di diffusione permettono di descrivere il comportamento degli alleli mutanti considerando sia i *mutamenti casuali* verificatisi per *assortimento casuale* dei gameti (cellule germinali) nella riproduzione sia i *mutamenti deterministici* provocati da *mutazione* e da *selezione*.

Numerosi sono i segmenti di DNA in cui SNP interessanti “regioni regolative” e “non” *assumono un ruolo chiave*.

Un esempio di *mutazione puntiforme influenzante alcune caratteristiche qualitative della carne suina e riguardante “regioni regolative”* è quello a carico del segmento di DNA “FABP3” codificante la proteina H-FABP¹¹³; finora, per tale segmento di DNA sono state identificate tre *mutazioni puntiformi* di cui *una* a carico della “regione 5’ non tradotta” e *due* a carico del “secondo introne”; queste tre mutazioni sono caratterizzate da *diallelismo* (Gerbens et al., 1997); dato, quest’ultimo, successivamente confermato da Gerbens et al. (1998, 2000), da Russo et al. (2000), da Urban (2002) e da Matassino et al. (2007a) in tipi genetici suini diversi.

Liu et al. (2003) hanno evidenziato la presenza del segmento di DNA “FABP3” con struttura simile a quella dei mammiferi (4 esoni e 3 introni) nel pesce zebra (*Danio Rerio*); tuttavia, questo segmento di DNA si *esprimerebbe solo nel fegato e nell’ovario*, ma *non nel cuore, nel muscolo e nella ghiandola mammaria*.

Nel “suino” sono state identificate tre *SNP* nel segmento di DNA *codificante la miostatina* localizzate nella “*regione promotrice*”, nel *primo introne* e nel *terzo esone* di detto segmento (Jiang, 2002); tali *SNP* sono *associate a un maggiore incremento ponderale giornaliero*. Sempre relativamente alla “*miostatina*”, nel *bovino*, sono state individuate mutazioni puntiformi a carico sia della “*regione codificante*” che di quella “*promotrice*”, associate al fenotipo caratteristico “*doppia muscolatura*” o “*doppia groppa*”; in particolare, nel tipo genetico Marchigiana sono state identificate *una trasversione G→T* sul terzo esone in posizione nucleotidica 871 (Marchitelli et al., 2003) e *due trasversioni* (T→A e G→C) nella “*regione promotrice*” (Crisà et al., 2003); la trasversione G→T si estrinseca nella *genesì* di un codone di “*stop*” responsabile della sintesi di una *miostatina* mancante di 6 delle 9 cisteine normalmente presenti nel “*dominio*” carbossiterminale e, pertanto, di una “*miostatina non attiva*”. La funzione della miostatina è quella di impedire la crescita all’infinito del muscolo scheletrico attraverso 2 meccanismi (McPherron, Lee, 1997):

(a) *inibizione della proliferazione cellulare*;

(b) *inibizione della specializzazione delle cellule satelliti in fibra muscolare*

¹¹³ H-FABP: Heart-Fatty Acid binding Protein=proteina cardiaca legante gli acidi grassi; proteina coinvolta nel *trafficking* degli acidi grassi a livello del tessuto muscolare cardiaco e striato, nonché della ghiandola mammaria in lattazione; altre proteine appartenenti alla famiglia FABP sono: L (epatica), I (intestinale), A (adipocitica), E (epidermica), IL (ileale), B (cerebrale), M (mielinica), T (testicolare).

matura.

Venendo a mancare l'azione limitante della miostatina, si manifesta il fenotipo caratteristico “doppia muscolatura” o “doppia groppa” quale effetto di “iperplasia” durante la fase fetale e di “ipertrofia” nella fase *post*-natale (Kobolak, Gocza, 2002); l’“ipertrofia” sarebbe dovuta soprattutto all’incremento in dimensione della fibra muscolare a metabolismo glicolitico e a contrazione veloce (FG, *fast glycolytic fibre*). La miostatina, pur influenzando in modo specifico il tessuto muscolare, esplicherebbe la propria attività anche sul tessuto adiposo (McPherron, Lee, 1997), deprimendo la conversione dei *pre-adipociti* in *adipociti* (Kim et al., 2001).

Alcune SNP del segmento di DNA codificante l'enzima Stearoil-CoA Desaturasi (SCD)¹¹⁴ localizzate nella “regione 5’ non tradotta” influenzerebbero le *caratteristiche qualitative della carne* suina (Zhang, 2001); a oggi, queste mutazioni puntiformi in “regioni introniche” o “promotrici” non interesserebbero il *bovino* (Keating, 2005) mentre, considerando la regione “esonica” di questo segmento, Medrano et al. (2003) hanno individuato nel bovino 3 SNP, di cui 2 “silenti” e una “missenso”; la SNP “missenso” sarebbe responsabile di un gradiente nell’attività enzimatica. Conte et al. (2006), nella Frisone italiana, hanno evidenziato che la SNP “missenso” conferisce al latte una *maggiore presenza quantitativa di acidi grassi monoinsaturi*, con particolare riferimento all’acido *miristoleico* (C14:1). Tale SNP “missenso” influenza anche la *composizione acidica del grasso intramuscolare della carne* bovina comportando un incremento degli acidi grassi monoinsaturi (Taniguchi et al., 2004). Pertanto, una SNP svolge lo stesso ruolo in 2 biopoiesi diverse (produzione della carne e produzione del latte) con possibilità di una sua utilizzazione in determinati piani di miglioramento genetico.

Il segmento di DNA codificante la *leptina*¹¹⁵ nel *suino* presenta SNP nelle regioni “introniche” influenzanti le “caratteristiche qualitative della carne” (Kennes et al., 2001), mentre nel *bovino* alcune SNP interessanti sia la regione “promotrice” che quella del 2. “esone” influenzano diverse “manifestazioni fenotipiche”: la “fertilità”, il “bilancio energetico”, la *percentuale di tagli adi-*

¹¹⁴ *Enzima Stearoil-CoA Denaturasi (SCD)*: enzima costituito da 359 amminoacidi il quale svolge un ruolo “chiave” nel *metabolismo lipidico*; esso catalizza “la formazione di un doppio legame” in posizione *cis 9* di un ampio spettro di acidi grassi saturi e, in particolar modo, dell’acido stearico che viene desaturato ad acido oleico.

¹¹⁵ *Leptina*: ormone espresso nel tessuto adiposo e muscolare, nella placenta e nella ghiandola mammaria di varie specie animali svolgente un ruolo critico nella regolazione: (a) del peso corporeo inibendo l’assunzione del cibo e stimolando il consumo energetico; (b) dell’ematopoiesi; (c) dell’angiogenesi; (d) della risposta immune e infiammatoria.

posi e quella dei tagli carnosì, nonché il “contenuto proteico del latte” (Crews et al., 2004; Nkrumah, 2005; Schenkel et al., 2005; Liefers et al., 2005).

In accordo con Minelli (1990), non si può procedere soltanto accumulando continue conoscenze empiriche, ma è necessario formulare le basi concettuali che debbono avallare il perché, il come, il quando del verificarsi dei fenomeni, anche se complessi, e delle norme che li sottendono.

4.3.4. Prospettive della “genomica funzionale”

L'analisi del genoma in chiave sistemica sta rendendo possibile una conoscenza *innovativa* dei fenomeni biologici interessati, ad esempio, alla “scienza nutrizionale”, alla *tossicologia* e alla “farmacologia”, nonché uno sviluppo di nuove branche, quali, ad esempio, la *nutrigenomica* e la *nutrigenetica*, la *tossicogenomica*, la *farmacogenomica* e la *farmacogenetica*.

Nutrigenomica e nutrigenetica. Solo una visione “globale” (cioè “sistemica”) della problematica del rapporto “nutrizione-oma” facente perno su una innovata visione – molto sofisticata – di un inedito *capitolo biologico* rende possibile una conoscenza dinamica dei fenomeni interessati alla “scienza nutrizionale” (Matassino et al., 2006d ed e).

Ribadendo quanto già sostenuto (Matassino et al., 1991; Matassino, 1992a), alla luce *dell'incremento demografico dell'uomo e della sua variazione per categoria*, si rende sempre più indispensabile e auspicabile una visione che tenga conto di una alimentazione, o meglio di una *nutrizione differenziata per esigenze nutrizionali* (“meta nutrizionale”) in base allo *status* fisiologico dell'individuo (fasi dell'accrescimento e dello sviluppo, gravidanza, allattamento, senescenza, ecc.), al fine di realizzare una “personalizzazione” della nutrizione in termini di “nutrigenetica” e di “nutrigenomica”.

La “nutrigenetica” va intesa come variabilità della risposta individuale a un nutriente sulla base del patrimonio genetico dell'individuo stesso.

La “nutrigenomica” va intesa come *tipizzazione del genoma individuale* quale fattore capace di influenzare la modalità di utilizzazione di biomolecole “nutrizionali”, “extranutrizionali” e “salutistiche” presenti nell'alimento in un determinato microambiente.

La “nutrigenomica” ha come scopo lo studio delle interazioni tra i costituenti di un “regime alimentare” e l'espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”; interazioni che possono risolversi in “effetti benefi-

ci” oppure “avversi” per la salute umana o animale. L’obiettivo è quello di identificare “biomarcatori” in grado di predire gli effetti di componenti di un regime alimentare. Di particolare attualità è la identificazione di *effetti preventivi e protettivi* di “biomolecole” con funzione “nutrizionale”, “extranutrizionale” e “salutistica” contenute negli alimenti; identificazione che riveste particolare importanza nell’applicazione del Regolamento *Health and Nutrition Claims*¹¹⁶.

Nel settore zootecnico, l’importanza della *relazione tra genetica e nutrizione* è stata intuita da T.M. Bettini, il quale già nel 1976 aveva formulato il concetto di “genetica nutrizionale” evidenziando il ruolo fondamentale dell’interazione “genotipo-nutrizione” in condizioni ambientali (*fisiche e biotiche*) omogenee ai fini applicativi nelle varie biopoiesi (galattopoiesi, miopoiesi, ovopoiesi, tricopoiesi, ecc.).

Qualsiasi produzione animale può essere considerata la risultante di un numero più o meno grande di interferenze fra complessi biologici il cui ruolo può essere molteplice (innescatori, trasportatori, mediatori a diversi livelli, repressori, ecc.), ma dipendente dall’influenza di fattori genetici, ambientali e delle relative interazioni (Ferrando, Vaz Portugal, 1974).

Bettini (1977) auspicava che la genetica nutrizionale avesse una propria fisionomia di studio per la vastità dei problemi connessi che implicano il cointeressamento di altre discipline (la biochimica, la fisiologia, l’anatomia, l’istologia, le produzioni vegetali, la mangimistica, l’etologia, ecc.).

D’accordo con Bettini (1977) e Pilla (1977), l’esistenza di differenze notevoli entro la specie, qualitativamente e quantitativamente, nei processi nutrizionali è la ragione principale che deve spingere ad ampliare gli studi allo scopo di individuare quei meccanismi a base genetica responsabili della loro quota parte della varianza fenotipica totale. Indubbiamente, la problematica relativa non è semplice, ma il tutto va risolto entro la specie e, entro questa, in relazione alla funzione produttiva considerata.

La risposta variabile a un dato regime alimentare in funzione del tipo genetico è nota (Sellers et al., 1974); infatti, aumentando il contenuto energetico della razione, l’adipogenesi tende a aumentare nella femmina suina “Landrace francese”, a restare invariante in quella “Landrace belga” e a ridursi nella Piétrain.

¹¹⁶ *Regolamento Health and Nutrition Claims*: indicazioni sulle virtù *nutrizionali* e *salutistiche* degli alimenti; esso, adottato dal Consiglio dei Ministri dell’Unione Europea il 12 ottobre 2006, entrerà in vigore dal 1 luglio 2007; la *Food Standards Agency* del Regno Unito ha proposto le modalità per la compilazione della lista di *Health and Nutrition Claims* in accordo con l’articolo 13 del Regolamento.

Nel pollo, il rapporto ottimale “contenuto proteico/contenuto energetico” della razione alimentare varia in relazione al tipo genetico (Komiya et al., 1973).

La *velocità di accrescimento* e l'*indice di conversione alimentare* (ICA) nel pollo variano a seconda del “regime alimentare” utilizzato (Bettini, 1976), infatti:

- (a) il “tipo genetico 1930” a 8 settimane raggiunge:
 - (i) circa 400 g di peso vivo (PV) con un ICA di 3,9 se alimentato secondo la “formulazione mangimistica 1930”;
 - (ii) circa 850 g di PV (più del doppio) con un ICA di 2,2 (-44%) se alimentato secondo la “formulazione mangimistica 1960”;
- (b) il “tipo genetico 1960” perviene a:
 - (i) 580 g di PV con un ICA pari a 4,3 se alimentato con la “formulazione mangimistica 1930”;
 - (ii) ben 1.280 g di PV con un ICA di 2,15 se alimentato con la “formulazione mangimistica 1960”.

La lunghezza dell'apparato digerente e dei suoi tratti ha effetto sul risultato produttivistico in quanto i fenomeni connessi con la fisiologia della digestione e dell'assorbimento sono fortemente variabili in relazione al tipo genetico e al sesso (Matassino, 1978).

L'importanza di una analisi più approfondita per meglio conoscere e interpretare le differenze tra gli individui può dedursi dai risultati di ricerche sui profili metabolici. Questi, infatti, possono aiutare notevolmente a individuare il grado di idoneità dell'animale rispetto a una determinata attività produttiva in ben definite e note condizioni di allevamento e a suggerire le eventuali modifiche da attuare nelle tecniche di allevamento (sistema di tenuta, alimentazione, ecc.) per ottimizzare le condizioni in cui l'individuo deve produrre per rendere massimo il livello produttivistico aziendale. Nei limiti in cui l'idoneità è ereditabile, il miglioramento genetico sarebbe facilitato (Matassino, 1978).

In tale contesto, *l'attuale/futura politica agroalimentare deve/dovrà individuare* “mete nutrizionali” *peculiari* basate non più sui consumi medi nazionali ma piuttosto sui seguenti aspetti:

- (a) *variabilità nei comportamenti alimentari* legata alla multiculturalità;
- (b) *diversità in esigenze in nutrienti* in base allo stato fisiologico dell'individuo;
- (c) *grado di vulnerabilità di determinati gruppi di individui* identificabili con quelli a “elevato rischio”.

Qualsiasi strategia agroalimentare deve conciliarsi anche con una realtà produttiva zootecnica tendente a tutelare i tipi genetici autoctoni, dal momento che

questi ultimi rappresentano una fonte preziosa di variabilità indispensabile per implementare “regimi nutrizionali” differenziati.

Tossicogenomica. Uno degli approcci più promettenti da sviluppare nell'ambito dell'analisi del rischio per la “sicurezza alimentare” è la “tossicogenomica”, che si propone di *studiare la variazione dell'espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptideli” e “non” in un tessuto dovuta a esposizione a una sostanza tossica.*

Gli studi di tossicità “in vitro” diventano sempre di più una valida alternativa a quelli tradizionali permettendo di minimizzare il costo e il sacrificio che il modello animale comporta.

La “qualità igienico-sanitaria” è un *prerequisito* indispensabile di “sicurezza alimentare” e presuppone oltre all'*assenza* di “inquinanti biologici” anche l'*assenza* di elementi sia “tossici” che “nocivi” al benessere dell'uomo.

Come ribadito da Nardone (1997), è fondamentale la distinzione tra “tossicità” e “nocività”.

La “tossicità” va intesa come *caratteristica di una sostanza* che, oltre alla sua natura primaria, *durante l'attività metabolica (trasformazione) può interagire con altre sostanze diventando “tossica”,* cioè determinando *effetti biologici* dannosi “immediati” dopo la sua assunzione.

La “nocività” va intesa come *caratteristica di una sostanza* che, oltre alla sua natura primaria, anche se assunta a dosi inferiori a quelle che inducono l'effetto “tossico”, *può interagire con altre sostanze durante l'attività metabolica (trasformazione), determinando una risposta letale a distanza di tempo rispetto alla sua assunzione,* quale conseguenza ultima di effetti biologici dannosi “cumulativi”.

La *valutazione della “nocività”* assume un'importanza sempre crescente, con particolare riferimento alla ricerca negli alimenti di “eventuali tracce contaminanti” dei cosiddetti “interferenti endocrini (IE)”. Questi ultimi costituiscono un gruppo di sostanze molto eterogeneo dal punto di vista chimico, comprendente contaminanti ambientali identificabili con un prodotto di sintesi (*diossine, policlorobifenili, alchilfenoli, ecc.*) e/o con un prodotto naturale di organismi viventi (*micotossine e fitoestrogeni*); *caratteristica comune degli IE è quella di interferire con l'equilibrio endocrino o mediante interazione con i recettori estrogenici e androgenici o mediante alterazione del metabolismo ormonale* (Tait et al., 2006). Gli IE rappresentano uno degli aspetti più critici per l'analisi del *rischio in sicurezza alimentare* per le seguenti motivazioni:

- (a) *capacità* di indurre effetti a lungo termine sullo sviluppo, quali *sterilità e aumentata suscettibilità al cancro;*
- (b) *possibilità* di sinergismo tra IE legati a differenti componenti del “regime

alimentare”;

(c) *vulnerabilità* in alcune condizioni fisiologiche dell'individuo (gravidanza), o in categorie demografiche (neonati, bambini, ecc.).

La ricerca dei “fattori di rischio” legati all'esposizione da IE prevede l'individuazione di opportuni “biomarcatori” che possano fungere da “traccia” di eventi di varia natura (*molecolare, genetica, immunitaria, biochimica*, ecc.) quali conseguenza significativamente provata di un'alterazione fisiologica o di una variazione dell'espressione di segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i”. L'individuazione dei suddetti “biomarcatori”, che possono essere di *esposizione* e/o di *effetto* e/o di *suscettibilità*, può trarre notevole vantaggio dall'impiego delle varie branche della scienza “omica”.

Uno degli elementi chiave dell'approccio della *tossicogenomica* è l'*accertamento dell'effettivo significato biologico della modulazione nell'espressione di segmenti di DNA* sulla base del cosiddetto “ancoraggio fenotipico”. Quest'ultimo si riferisce all'analisi della *relazione* tra il “profilo di espressione di segmenti di DNA” e i “parametri” “convenzionali” di tossicità chimico-clinici e istopatologici (patie epatiche, livello di alcuni enzimi nel fegato o in altri tessuti o cellule) e/o altri indici “validati” di risposta a sostanze tossiche. *L'individuazione di questa relazione è una delle sfide principali della tossicogenomica.*

In conclusione, sebbene i progressi cognitivi siano già interessanti, l'impatto tossico è incerto nella maggior parte dei casi, per cui è necessario ampliare l'uso degli approcci biomolecolari per meglio comprendere il rischio di residui e di contaminanti degli alimenti destinati all'uomo e/o all'animale.

Farmacogenomica e Farmacogenetica. La problematica delle relazioni tra “farmaco” e “segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” o “non” va considerata in chiave di “farmacogenetica” e di “farmacogenomica”, le quali possono essere così intese:

- (a) “farmacogenetica”: *variabilità della risposta individuale a un farmaco in relazione al patrimonio genetico dell'individuo stesso*;
- (b) “farmacogenomica”: *tipizzazione del genoma individuale* quale fattore influenzante le diverse modalità di somministrazione di un farmaco.

La *farmacogenetica* si pone come interfaccia tra la genetica e la farmacologia nell'utilizzare *l'informazione genetica* di una popolazione o di un singolo individuo per prevedere l'efficacia e la sicurezza in termini di tossicità e/o di nocività di un determinato farmaco.

Un obiettivo a “lungo termine” della *farmacogenomica* è quello di prevedere farmaci e regimi di dosaggio “genotipo specifici” (Soria, 2006).

L'importanza dei fattori genetici nell'influenzare la risposta ai farmaci è nota sin dagli anni '50 (Hughes et al., 1954; Carson et al., 1956; Kalow,

1956), ma soltanto *a partire dal 1980 si sta individuando l'importanza del polimorfismo del DNA tra le possibili cause della eterogeneità di risposta ai farmaci* (Evans, Relling, 1999). Di particolare interesse è il polimorfismo di segmenti di DNA codificanti:

- (a) *enzimi* coinvolti nel metabolismo e nella biodisponibilità del farmaco all'organismo;
- (b) *recettori* dei farmaci;
- (c) *carrier* dei farmaci.

La determinazione del genotipo individuale o dell'aplotipo individuale a livello di un "locus" o di loci coinvolto/i nel metabolismo di un farmaco potrà permettere di prevedere con maggiore attendibilità la risposta alla sua somministrazione. Ad esempio, la differente risposta alla terapia antidepressiva (ri-captazione della serotonina) è funzione dello *status* di un *locus*, nel senso che l'"eterozigote" risponde meglio dell'"omozigote" (Smeraldi et al., 1998); nella fattispecie è stato considerato il *locus* biallelico del "promotore" del "segmento di DNA codificante la proteina di trasporto della serotonina". Gli effetti dei farmaci sull'organismo sono quasi sempre il frutto di espressione di molteplici segmenti di DNA codificanti proteine coinvolte in reti metaboliche complesse e le perturbazioni rappresentate da un trattamento con farmaco possono propagarsi in più direzioni. Pertanto, ciascuna reazione a un farmaco ha un caratteristico "profilo di espressione" di segmenti di DNA che può essere monitorato più facilmente con l'approccio *microarray*.

Un farmaco può indurre a livello cellulare una reazione di "compatibilità" oppure di "idiosincrasia"; la "compatibilità" comporta "effetti positivi" in quanto il farmaco rientra nei programmi metabolici di "base" della cellula, mentre la "idiosincrasia" è responsabile di "effetti negativi" perché non compatibile con il metabolismo cellulare.

Una problematica notevole della "farmacogenomica" e della "farmacogenetica" è rappresentata dal fatto che i "complessi di segmenti di DNA" implicati nella risposta ai farmaci possono essere diversamente modificati ("indotti" o "repressi") nelle loro attività da *fattori esterni* estremamente variabili *connessi allo stile di vita, al regime alimentare, ecc.* La possibilità di *prevedere la risposta a un farmaco*, sia in termini di *risultati terapeutici* che di eventuali *effetti collaterali*, dipende dalla *possibilità* di comprendere e di quantificare *per ogni individuo* sia la sua *capacità di risposta al farmaco*, sia l'*integrazione* fra il suo genoma e i fattori microambientali in cui egli è inserito; pertanto, la risposta di un individuo al farmaco può essere considerata un effetto del suo "epigenoma".

I concetti di "cronogenetica" e di "cronobiologia" potrebbero offrire le basi ai

fini di una migliore comprensione della variabilità dell'effetto temporale dei farmaci fornendo un valido contributo alla farmacogenomica in termini di "temporalizzazione della somministrazione di un farmaco" ("cronofarmacogenomica").

4.4. Integrazione "genomica-proteomica"

Nell'era *post*-genomica raccordare la genomica alla proteomica diviene sempre più "cogente", soprattutto alla luce della potenzialità che la stessa integrazione "genomica-proteomica" è in grado di offrire:

- (a) *acquisire conoscenze che permettano di colmare lo iato tra "genomica funzionale" e "biologia cellulare"*; conoscenze, che rappresentano la "chiave di volta" per la comprensione dei meccanismi d'azione del DNA nella realizzazione dello sviluppo e del funzionamento di un organismo;
- (b) *studiare i cambiamenti dei processi metabolici* di animali, di microrganismi e di piante in risposta a differenti condizioni ambientali; l'analisi differenziale dell'espressione dei segmenti di DNA" e del "proteoma" permette di studiare quali *proteine, relative isoforme multiple* e loro *frammenti* siano presenti in determinate condizioni ambientali; queste informazioni, oltre a definire le "reti cellulari" instaurate tra "segmenti di DNA" e "proteine" rispondenti a particolari stimoli, possono contribuire a identificare i "bersagli molecolari" di particolari fattori ambientali;
- (c) *contribuire alla tipizzazione della biodiversità*, consentendo l'identificazione e la caratterizzazione di *biomarcatori molecolari* di "unicità" genetica (a livello di *singolo individuo*) e di "specificità" (a livello di *prodotto*); *biomarcatori*, che sono alla base della conoscenza di effetti diversificati che possono interessare la qualità "nutrizionale", "extranutrizionale" e "salutistica" di un alimento, nonché il "livello di sicurezza" dello stesso;
- (d) *identificare proteine "nuove"*:
 - (i) *esogene*, come quelle che vengono eventualmente a essere sintetizzate negli *organismi transgenici* (OT) (altrimenti detti organismi geneticamente modificati, OGM) e che non sono presenti nei corrispettivi "convenzionali" (non transgenici)¹¹⁷;

¹¹⁷ *Identificazione di proteine "nuove"*: Lamacchia et al. (2004) nella linea "transgenica" di grano duro "Ofanto B688-1-2", caratterizzata dall'inserzione del "segmento di DNA" di tabacco codificante la *proteina rab1* "mutata", hanno evidenziato la presenza di un cluster "nuovo" di polipeptidi che potrebbe originarsi da: (a) *deposizione* di polipeptidi a causa della riduzione del "trafficking" proteico dal reticolo endoplasmatico ruvido verso l'apparato del Golgi per l'*instaurarsi* di una *via* di "trafficking" *aggiuntiva* basata su un percorso alternativo "extra Golgi"; (b) *sintesi* di nuovi polipeptidi.

(ii) *endogene*, come quelle non caratterizzate e quindi non presenti in *banca dati*.

La possibilità di identificare una proteina attraverso la ricostruzione della sua sequenza nucleotidica avvalorava l'importanza dell'integrazione tra la "genomica" e la "proteomica"; integrazione, che può essere ormai considerata un valido pilastro nelle future strategie del miglioramento genetico.

5. PROTEOMICA

La proteomica, quale identificazione e caratterizzazione del "proteoma", rappresenta un'importante pietra miliare dell'era *post-genomica* (Matassino, Occidente, 2003). Il concetto di proteomica deriva dall'acquisizione di conoscenze sul "proteoma" che, quale "insieme delle proteine nonché delle *relative isoforme multiple* e dei loro *frammenti* presenti in una cellula o in un organismo o in un sistema biologico in ogni istante del proprio ciclo vitale, rappresenta un sistema di informazione "altamente sofisticato", al pari di quello del DNA che lo codifica.

Il termine "proteoma" fu coniato nel 1994 da M.R. Wilkins¹¹⁸ per definire "il complemento proteico codificato da un genoma" anche se, come nozione, il termine era già apparso nella *biologia moderna* 13 anni prima, quando Anderson e Anderson (1981) proposero la costituzione di un "atlante delle proteine umane".

L'importanza della "proteomica" è chiaramente puntualizzata da Matassino e Occidente (2003) con le seguenti riflessioni:

- (a) l'*assioma* "un gene – una proteina" non è sempre valido; infatti, da un unico segmento di DNA codificante "polipeptide/i" si può generare un elevato numero di *forme proteiche con differente funzione metabolica* (anche di breve durata);
- (b) *la concentrazione di una proteina non è sempre correlata in maniera semplice all'attività trascrizionale del corrispondente segmento di DNA* che, nella sua espressione, è ulteriormente regolata a livello dei meccanismi che determinano la *stabilità* e la *compartimentalizzazione* in complessi proteici;
- (c) *l'azione dei segmenti di DNA con "effetto pleiotropico" influenza molteplici manifestazioni fenotipiche*, tra cui, ad esempio, l'accrescimento e lo sviluppo muscolare;

¹¹⁸ M.R. Wilkins: vicepresidente e direttore della divisione di bioinformatica presso la *Proteome Systems* di Sydney (Australia).

- (d) *l'analisi di un segmento di DNA codificante "polipeptideli" consente di determinare la sequenza amminoacidica della "proteina", ma non la sua "struttura terziaria" e/o "quaternaria";*
- (e) *l'approccio di "genomica funzionale" non riesce a fornire indicazioni sulle modificazioni che avvengono "a valle della trascrizione", né suggerimenti sulle modifiche post-traduzionali che, invece, potrebbero avere un ruolo significativo nella definizione delle caratteristiche qualitative di un alimento.*

Sulla base delle precedenti considerazioni si arguisce che una cellula non ha un "proteoma" unico e costante nel "tempo" e nello "spazio"; pertanto, sarebbe preferibile parlare di tanti "proteomi" quante sono le *differenti condizioni cellulari* e le *diversità cellulari*; un "proteoma completo" di un organismo andrebbe immaginato come un "insieme globale di tutti i proteomi cellulari" in quell'istante in un determinato microambiente. "Mappa proteomica" e "proteomica globale" sono termini frequentemente impiegati che riflettono le iniziative per razionalizzare la tassonomia degli innumerevoli "proteomi".

L'"interazione genoma-ambiente interno e/o ambiente esterno" è responsabile della genesi di un proteoma "dinamico" e "complesso".

Tale "dinamicità" è avvalorata, tra l'altro, anche dalla scoperta di un nuovo meccanismo regolante la "sintesi proteica" che risiede nei "corpi P" (*Processing Body*, corpi di riattivazione); meccanismo che contribuisce a rendere la cellula un'attenta "econda". La riutilizzazione dell'*mRNA* negli appositi "corpi P" rappresenta, infatti, un buon "sistema di riciclaggio"; finora, i "corpi P" venivano considerati strutture cellulari o "cestini" in cui gli *mRNA*, una volta tradotti in proteine, venivano modificati per essere distrutti; recenti ricerche, invece, hanno evidenziato che l'*mRNA* nei "corpi P" può essere *riattivato* e/o *riutilizzato* nella sintesi proteica; "riattivazione" e/o "riutilizzazione" che contribuisce/ono a rendere il "proteoma" ancor più "dinamico" e "complesso" (Brenques et al., 2005).

La complessità è imputabile anche alle diverse strategie attuate dalla cellula per eliminare proteine "mal assemblate" o "non funzionali" o, semplicemente, per abbassarne la loro concentrazione attraverso:

- (a) *degradazione enzimatica* svolta dai *lisosomi* che, all'occorrenza, demoliscono molecole "inutilizzate" attraverso alcuni enzimi (glicosidasi, idrolasi, lipasi, nucleasi, proteasi, ecc.) con il riciclo dei loro componenti;
- (b) *demolizione proteica citosolica* operata dal complesso macromolecolare "proteasoma" o "camera della morte", considerato una sorta di "inceneritore" o "spazzino cellulare" in quanto capace di degradare "complessi" di proteine purché "ubiquitina etichettate".

La complessità di un "proteoma" è chiaramente deducibile anche dall'e-

sistenza delle “numerosse modificazioni” a cui vanno incontro i “segmenti di DNA codificanti” e i “prodotti dell’espressione di tali segmenti”; infatti, “fenomeni microevolutivi” a livello del DNA (mutazioni puntiformi, inserzioni e/o delezioni di sequenze nucleotidiche), “meccanismi di regolazione” (*editing*, *splicing*, ecc.) a livello del *pre-mRNA* e dell’*mRNA*, nonché “modificazioni post-traduzionali” a carico di polipeptidi giustificano sia la “presenza di un numero più elevato di proteine” rispetto al numero di segmenti di DNA codificanti sia l’“eterogeneità delle proteine stesse”. Un esempio della *complessità* del “proteoma” è rappresentato dallo *splicing alternativo* il quale è responsabile di diversi “coscritti” di RNA originati da un unico segmento di DNA codificante; i “coscritti” quando “espressi” danno origine a un *set* di “proteine diverse solo nella dimensione molecolare” o a “isoforme multiple”. A oggi, si stima che una “tipica cellula” di alcuni mammiferi contiene: 15.000-23.000 segmenti di DNA codificanti *polipeptideli* (23.154: *cellula umana*); circa 50.000 molecole di *mRNA* rappresentative di 5.000 specie diverse di *mRNA* (circa 10 molecole di *mRNA* per specie di *mRNA*); circa 1 miliardo di molecole proteiche rappresentative di 100.000 proteine *differenti* (ogni proteina è presente mediamente con 10.000 copie; di queste “proteine diverse” circa 100 sono quelle più rappresentate, pari al 90% del suddetto miliardo). Lo “splicing alternativo” consentirebbe a organismi e a loro parti di svolgere *funzioni diverse* con un numero ridotto di segmenti di DNA codificanti ‘polipeptide/i’.

Schematicamente, la *complessità* proteica si manifesta attraverso:

- (a) “polimorfismo” per la presenza di *varianti proteiche* quali espressione di mutazioni a carico di *loci* (associati o non);
- (b) “versatilità” (variabilità funzionale);
- (c) “flessibilità” (variabilità strutturale).

Queste proprietà, le ultime due in particolare, consentono alle proteine di comunicare tra loro oltre che con altre biomolecole, nonché di assolvere a numerose funzioni: *catalitica*, *immunitaria*, *metabolica*, *protettiva*, *regolatrice*, *strutturale*, *trasportatrice*, ecc.

5.1. Proteomica “strutturale”

La proteomica, avvalendosi di metodiche di separazione ad alta risoluzione e di

analisi di spettrometria di massa (MALDI-TOF¹¹⁹ e nanoLC ESI-MS/MS¹²⁰), permette di *fotografare*, di *caratterizzare* e di *identificare* le proteine, le *relative isoforme multiple* e i loro *frammenti* presenti in una cellula *in ogni momento del suo ciclo vitale* indipendentemente dalla conoscenza delle sequenze nucleotidiche del DNA che le codificano (Matassino, Occidente, 2003; Matassino, 2005b).

Il primo approccio utile alla comprensione del “complesso universo proteico” è basato sulla “caratterizzazione strutturale” delle proteine e sulla loro “catalogazione” da cui non si possono trarre, però, informazioni relative alla loro “funzione biologica”. Ogni proteina presenta diversi livelli di organizzazione¹²¹ che si integrano originando la specifica conformazione tridimensionale: stato *nativo* da cui dipende la sua funzione. Ogni proteina presenta “motivi strutturali” dati dalla combinazione di strutture secondarie consecutive che, in proteine diverse, hanno un significato funzionale analogo; più motivi strutturali formano un complesso compatto e stabile: il “dominio” o “modulo”, il quale può essere formato o interamente da regioni configurate ad “*alfa-elica*” o interamente da regioni configurate a “*foglietto-beta*” o da un *insieme di regioni configurate ad “alfa-elica” e di altre a “foglietto-beta*”.

La proteomica *strutturale* produce un'enorme mole di “dati” la quale, per la sua gestione complessa, richiede l'utilizzazione della *bioinformatica* che, nella fattispecie, oltre a elaborare i risultati ottenuti dall'analisi proteomica, si occupa della costruzione di “modelli molecolari” per:

- (a) *chiare le proprietà funzionali di una proteina;*
- (b) *definire le condizioni chimico-fisiche per la formazione di complessi proteici;*
- (c) *predire la struttura tridimensionale (3D) sulla base dei principi termodinamici.*

Gli studi di cristallografia ai raggi x basati sulla conoscenza della struttura primaria e terziaria e applicati alla *titina* (proteina gigante del sarcomero)

¹¹⁹ MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight* = spettrometria di massa di ionizzazione e desorbimento laser assistita da matrice-tempo di volo.

¹²⁰ Nano LC ESI-MS/MS: *nano Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry/Mass Spectrometry* = nano cromatografia liquida accoppiata a uno spettrometro di massa con sorgente elettrospray e rivelatore tandem.

¹²¹ *Livelli di organizzazione*: si distinguono in: (a) struttura primaria, rappresentata dalla sequenza amminoacidica nella catena polipeptidica; (b) struttura secondaria, rappresentata dalla configurazione spaziale della catena polipeptidica (le principali sono due: l'“*alfa-elica*” e la struttura a “*foglietto beta*”); (c) *struttura terziaria*, rappresentata dalla *combinazione di più regioni configurate ad alfa-elica e/o a “foglietto-beta”* collegate tra loro da segmenti che formano regioni ad ansa che costituiscono in genere il “sito funzionale” della proteina; (d) struttura quaternaria, rappresentata da una struttura sovramolecolare (più catene polipeptidiche o subunità unite da legami non covalenti) la quale esplica una funzione non compatibile con la sola struttura terziaria.

hanno evidenziato, ad esempio, una conformazione di tipo *palindromico*¹²², osservata finora solo nel complesso “DNA-proteina” (Zou et al., 2006).

5.2. Proteomica “comparativa”

La *complessità* dipende non tanto dal “numero di proteine”, quanto dal “tipo di proteine” codificate, come è possibile rilevare allorché si effettua la comparazione di “proteomi base” di organismi diversi. Non deve sorprendere che in un *eucariote complesso*, quale la *Drosophila*, sia stato individuato finora un “proteoma base” costituito da un numero di proteine (8.065) per lo più comparabile a quello del nematode *Caenorhabditis Elegans* (9.453) nonostante esistano grandi differenze in termini di *complessità* di sviluppo e di forma somatica fra il “moscerino” e il “verme” (Rubin et al., 2000). Infatti, la maggiore *complessità* della *Drosophila* sarebbe spiegata dall’esistenza di un numero maggiore di “domini proteici” rispetto a quelli del nematode. I vertebrati sono caratterizzati da una “diversità proteica” notevolmente superiore rispetto agli invertebrati; nell’uomo il numero di domini proteici è di poco superiore (1.262) rispetto a quello di *Drosophila* (1.035); tuttavia, la maggiore *versatilità* e la notevole *interscambiabilità* dei domini propri della specie umana e della maggior parte degli animali di interesse zootecnico è responsabile dell’origine di molti più tipi diversi di proteine (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

5.3. Proteomica “funzionale”

Lo studio della “funzione biologica” di una proteina, cioè del ruolo che essa esplica nei processi fisiologici, è oggetto della *proteomica funzionale*.

Le principali applicazioni della *proteomica funzionale* sono indirizzate alla:

- (a) individuazione della funzione biologica di una proteina ancora sconosciuta;
- (b) comprensione della funzione biologica di una proteina nota;
- (c) definizione dei meccanismi molecolari che regolano le funzioni cellulari più importanti;
- (d) identificazione delle interazioni “proteina-proteina” nella formazione di complessi funzionali.

¹²² *Palindromo*: parola, numero o frase che mantiene lo stesso significato in entrambi i sensi di lettura (da sinistra verso destra o da destra verso sinistra).

Le tecniche proteomiche basate su elettroforesi bidimensionale consentono di visualizzare su gel ogni proteina, ogni relativa isoforma multipla e/o suoi frammenti, come *spot*; l'insieme degli *spot* costituisce il *pattern proteico caratteristico di un qualsiasi sistema biologico in una data condizione*. Il confronto di *pattern* proteici derivanti da "condizioni diverse entro lo stesso sistema" permette di definire la presenza di eventuali "proteine differenzialmente espresse"; ciò rappresenta un "punto cruciale" per la *comprensione dei meccanismi che sottostanno al funzionamento e all'adattamento di un qualsiasi sistema biologico a particolari condizioni*. Questo tipo di impostazione della *proteomica funzionale* si definisce "proteomica differenziale": *esigenza di comprendere una diversità di manifestazione fenotipica del prodotto di espressione del DNA in un determinato istante della vita di una cellula*. Inoltre, le proteine esplicano la loro funzione all'interno di un complesso "sistema metabolico" o "sistema cellulare" "lavorando in gruppo"; ciò starebbe a significare che la "sola caratterizzazione strutturale" di una proteina *non sarebbe utile* per lo studio dell'intero "complesso multiproteico". Pertanto, normalmente, *si ritiene che il risultato finale dell'approccio proteomico di maggiore interesse sia proprio quello di isolare e di caratterizzare la "rete" di proteine coinvolta in un determinato processo fisiologico definendone i meccanismi molecolari* con strategie che dovranno sempre più concretizzarsi in linee di ricerca identificabili in una visione di vero e proprio sviluppo della "biologia dei sistemi". Trattasi, quindi, di un nuovo approccio mirante a caratterizzare i sistemi biologici "dinamicamente" nel "tempo" e nello "spazio" con l'obiettivo principe di trovare "soluzioni migliori" a "sfide complesse" nell'ambito della medicina (umana e animale) e delle produzioni agroalimentari ai fini del *benessere* sia dell'uomo sia dell'animale (Matassino, 2005b).

5.3.1. Alcune applicazioni della proteomica

L'approccio proteomico si è sviluppato primariamente in *medicina umana* ove trova tuttora larga applicazione, soprattutto nella ricerca di proteine più o meno espresse o non espresse: una conoscenza esaustiva delle proteine circolanti nel plasma è il punto di partenza per una diagnostica sofisticata. Esistono, per esempio, prove convincenti che, tra le proteine del plasma, i "*detriti del catabolismo proteico*", pur presenti in quantità modeste, possono rappresentare "*pattern*" specifici di tumori della prostata e dell'ovaio e, pertanto, *assumono un ruolo fondamentale nel supportare la diagnostica clinica*. La proteomica permette di identificare, anche, *isoforme proteiche* che si hanno per *effetto promotore* da parte di *agenti chimici potenzialmente cancerogeni*, ad esempio

la diossina, in animali da laboratorio. L'uso della proteomica ha permesso di spiegare il ruolo della "macchina molecolare" nel *dirigere il ripiegamento di alcune proteine coinvolte nella genesi di gravi "patie"*. L'entità di manifestazione della proteina Hsp70¹²³ influenza il "ripiegamento" di proteine che sono alla base del "morbo di Parkinson" e di quello di "Alzheimer", i quali hanno appunto una causa in comune: un "non corretto ripiegamento di una particolare proteina" (Scheibel, Buchner, 2006).

L'*approccio proteomico* alla "biologia riproduttiva" apre ampie prospettive; ad esempio, potrebbe aiutare a risolvere alcuni problemi importanti di *infertilità sia maschile che femminile* o taluni problemi derivanti dall'*interazione del materiale seminale con i vari "tratti" dell'apparato genitale femminile*. Recentemente, Roncoletta et al. (2006) hanno rilevato utili *marker* di fertilità maschile (BSP¹²⁴ e aSFP¹²⁵) tra le proteine seminali evidenziando una maggiore presenza della BSP-A3 nei *tori Nellore con alta fertilità* (8,5 volte più abbondante) e di quella della aSFP nei *tori con bassa fertilità* (2,5 volte più abbondante). *Tali risultati confermano l'importante ruolo che riveste l'analisi bidimensionale comparativa delle proteine nel predire la fertilità dei "giovani tori" da includere nel "progeny test", permettendo una maggiore accuratezza nello scarto*. Moura et al. (2006) hanno osservato che l'*alta fertilità* del maschio di razze con spiccata *attitudine alla produzione lattea* è associata a una *più bassa manifestazione* di alcune *isoforme* della proteina *spermadesina* e a una *più elevata quantità* di altre (*osteopontina* 55 kDa e *fosfolipasi-A2* 58 kDa). Pertanto, *l'interazione tra le diverse proteine che costituiscono il liquido seminale spiegherebbe la differenza di "punteggio di fertilità" fra i riproduttori*. L'interazione della *testa dello spermatozoo* con ciascuna delle strutture associate all'ovocita durante la fertilizzazione, cioè lo *strato di cellule superficiali* (la zona pellucida e la membrana plasmatica) *riveste notevole importanza per l'identificazione del livello di "fertilità individuale"* (Strzeżek et al., 2005; Stein et al., 2006); grado

¹²³ Hsp70: *Heat shock protein* = proteina da *shock* termico; proteina che, oltre a intervenire nel "ripiegamento" di altre proteine, espleta una gran varietà di funzioni tra cui quella di "srotolare proteine ripiegate" e "trascinare le proteine nei punti della cellula dove devono svolgere le loro funzioni"; questa varietà di comportamenti ha stimolato diverse teorie sul funzionamento di Hsp 70. De Los Rios et al. (2006) *hanno messo in evidenza che un unico meccanismo presiede a tutte le sue funzioni*; trattasi del meccanismo di "trascinamento finalistico del mondo entropico", proprio del regno animale; questo è solo un esempio della potenzialità delle ricerche interdisciplinari che si muovono al confine tra la biologia e la fisica, in particolare nello studio del "protein folding" (ripiegamento della struttura primaria in una struttura secondaria e/o terziaria con acquisizione di caratteristiche funzionali).

¹²⁴ BSP: *Bovine Seminal Plasma protein* = proteina del plasma seminale bovina.

¹²⁵ aSFP: *acidic Seminal Fluid Protein* = proteina del fluido seminale acido.

di fertilità che potrà essere meglio definito grazie all'applicazione di metodi che proprie della "proteomica funzionale".

Nel campo della *nutrizione*, le indagini di proteomica e lo studio dell'espressione dei segmenti di DNA codificante "polipeptide/i" contribuiscono a comprendere (Matassino, 2006a):

- (a) *le basi dell'invecchiamento*;
- (b) *l'azione positiva di alcuni microrganismi*;
- (c) *gli eventuali effetti a breve termine (tossicità) e a medio/lungo termine (nocività) sul metabolismo umano* delle proteine espresse *ex novo* negli OT e negli alimenti da essi derivati;
- (d) il ruolo svolto dai nutrienti nello sviluppo di "patie".

Ad esempio, il recente grave caso della BSE¹²⁶ testimonia la necessità di *monitorare tutta la filiera produttiva*, dall'"ambiente animale" al *desco del consumatore*, con nuovi approcci. Grazie all'approccio proteomico, a oggi, sono state identificate ben 60 isoforme della *glicoproteina prionica* PRP^{c127}. I meccanismi con cui le *isoforme prioniche normali* si trasformano in quelle *patogene* (PRP^{sc})¹²⁸ responsabili della BSE sono stati chiariti da Castagna et al. (2002). Le isoforme *normali* e *patogene* hanno lo stesso peso molecolare, ma differiscono per la struttura terziaria e per quella quaternaria. La forma PRP^c presenta una conformazione prevalentemente *alfa-elicoideale (spirale regolare)*; la forma PRP^{sc}, invece, possiede una conformazione prevalentemente *beta-elicoideale (spirale stirata)* (Prusiner, 1995, 2004). Si intuisce, quindi, come la possibilità di poter riconoscere le *caratteristiche strutturali di una proteina e principalmente quelle conformazionali* sia importante e faciliti la comprensione dei meccanismi influenzanti e responsabili dell'allarmante "patia".

Nel *settore agro-alimentare*, come riportato da Matassino e Occidente (2003), le *potenzialità* e le *prospettive* offerte dalla *proteomica* stanno contribuendo a fornire approfondite conoscenze a livello molecolare dei "peculiari nutrienti" caratterizzanti uno specifico alimento; l'approccio proteomico mira a caratterizzare proteine presenti in un alimento di origine animale [carne, latte e loro derivati (salumi e formaggi)] o di origine vegetale al fine di individuare "marcatori biochimici" che, unitamente ad altri "parametri di qualità" (fisici, chimico-fisici, microbiologici, fisiologici e chimici), contribuiscono a:

- (a) *individuare le "specificità bioterritoriali"*;
- (b) *definire le caratteristiche "nutrizionali", "extranutrizionali" e "salutistiche"*;

¹²⁶ BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy = encefalopatia spongiforme bovina.

¹²⁷ PRP: Cellular Prion Protein = proteina prionica presente normalmente nelle cellule nervose.

¹²⁸ PRP^c: Scrapie Prion Protein = proteina prionica.

(c) *sviluppare test analitici validanti l'“autenticità dei prodotti alimentari”.*

Vari studi condotti sugli alimenti di *origine sia animale che vegetale* evidenziano che *i bioterritori, in virtù delle proprie diversità*, possono contribuire alla “diversificazione nutrizionale, extranutrizionale e salutistica” degli alimenti; in tale contesto, il prodotto “tradizionale tipico” assume un ruolo fondamentale per la *sostenibilità salutistica e sanitaria* per l'uomo, per l'animale, nonché per il *bioterritorio*, con riflessi positivi anche sulla *sostenibilità economica* (Matassino, 1996; Matassino, 2001b; Matassino, 2005a; Casabianca, Matassino, 2006). Il “monitoraggio proteomico” può fornire un notevole contributo al settore “agro-alimentare” per la tutela dell’“unicità” del prodotto e per la garanzia della “salubrità” dello stesso; contributo che diviene sempre più attuale, anche in linea con il regolamento dell'Unione Europea *Health and Nutrition Claims*. I “Claims” devono tener conto di parametri oggettivi e devono, inoltre, riportare informazioni “consolidate” e “validate scientificamente” che attestino il legame tra “alimenti” e “salute”; pertanto, si intuisce l'importante ruolo della proteomica nel definire “profili nutrizionali quali-quantitativi” e nel discriminare i cibi con “maggiore validità nutrizionale” da quelli con “minore valenza nutrizionale” (Matassino et al., 2006e).

Uno studio condotto su vacche di razza Frisona Italiana (Bernabucci et al., 2002) ha messo in evidenza come una variazione nella componente lattoproteica, durante la stagione calda, possa influenzare la qualità “casearia” del latte, con riduzione della resa e peggioramento della qualità del formaggio. Gli Autori hanno evidenziato come la “stagione” può essere responsabile della riduzione del contenuto in proteine totali del latte quale conseguenza del decremento del contenuto in caseina dipendente, a sua volta, da una diminuzione significativa ($P < 0,01$) del contenuto della alfa-caseina (1,36% in primavera e 1,12 in estate) e della beta-caseina (0,97% in primavera e 0,79 in estate).

Altro obiettivo importante della proteomica nel settore “agroalimentare” è *quello di comprendere meglio il biochimismo che regola i vari processi produttivi* mediante la determinazione quantitativa di *proteine indicatrici, o marcatori molecolari, che definiscano meglio uno stato di “normalità” o di “anormalità” della sequenza nelle varie fasi di una “filiera produttiva”*. Infatti, con l'approccio proteomico si possono ottenere vere e proprie *impronte digitali di mappe bi-dimensionali (m2D)* dei prodotti analizzati le quali, una volta registrate, vengono inserite in una banca dati di “bioimmagini”. *Ogni anomalia, riscontrata nelle m2D della stessa tipologia di prodotto esaminato, può essere caratterizzata a livello molecolare* mediante spettrometria di massa per stabilirne la *natura* ed eventualmente la *causa*; eventuali *discordanze fra la mappa del prodotto in esame e quella presente in banca dati* possono essere indicatrici di:

- (a) imitazione di prodotto;
- (b) diversa area geografica di produzione;
- (c) anomalie nei processi proteolitici dovute a eventuali patogeni e/o inquinanti;
- (d) diverso diagramma di flusso.

La continua semplificazione nell'uso degli strumenti innovativi di *post-ge-nomica* favorisce una sempre maggiore applicazione della proteomica anche ai fini del miglioramento del *benessere animale*, nonché della *qualità dei prodotti da essi ottenuti*.

Pertanto, la *proteomica* è di particolare utilità per *indagini di qualità dei prodotti di origine animale* (Matassino, Occidente, 2003; Matassino et al., 2006a, 2006e).

5.3.1.1. Cenni sul “Proteoma” della “carne”

Le caratteristiche qualitative della carne sono fortemente influenzate dalla individualità biologica dell'animale in vita. L'importanza di conoscere il percorso dell'animale allevato per una valorizzazione qualitativa delle produzioni ottenibili e l'influenza delle inscindibili relazioni tra tecniche di allevamento, benessere animale, qualità del prodotto e salute umana sono ampiamente documentate (Bettini, Matassino, 1961, 1963; Bettini, 1969; Bettini, Ferrara, 1970; Matassino, 1978, 1996, 2001b).

Per anni, per descrivere i meccanismi biologici responsabili della variabilità delle caratteristiche qualitative sono stati impiegati approcci di *genetica*, di *fisiologia*, di *biochimica*, di *biologia*, ecc. L'attenzione del Ricercatore era rivolta principalmente allo studio dell'effetto dei fattori (*genetici e ambientali*) che influenzano alcuni indicatori di qualità della carne (*tenerezza, colore, potere di ritenzione dell'acqua, quantità e qualità del tessuto adiposo, ecc.*). Grazie alle potenzialità della *genomica* e della *proteomica*, attualmente l'interesse è rivolto maggiormente alla conoscenza del *biochimismo molecolare del processo di trasformazione del muscolo in carne*. L'applicazione della *proteomica* alla scienza della carne è di grande interesse e il numero crescente di studi pubblicati lo testimonia; tale applicazione sta contribuendo a migliorare specialmente l'acquisizione di conoscenza sui fenomeni coinvolti nel “processo di intenerimento”.

Benché molteplici fattori biochimici influenzanti la “tenerezza” della carne siano già noti (Koohmaraie, 1996; Maltin et al., 2003) e benché diversi QTL (*Quantitative Trait Loci, loci* a effetto quantitativo discreto) siano stati individuati (Matassino, Rossi, 1998; Fontanesi, et al., 2006; Lipkin, et al., 2006), la comprensione della relazione esistente tra i complessi meccanismi *post mortem* e il loro effetto sulla tenerezza della carne desta sempre particolare attenzione

in quanto *la tenerezza è uno dei requisiti di maggiore importanza richiesti dal consumatore*. Non minore interesse riveste la comprensione dei meccanismi molecolari che influenzano l'“accrescimento” e lo “sviluppo muscolare” in relazione alle “caratteristiche qualitative della carne”. A tal proposito, *gli studi ben avviati a livello di proteoma, del metabolismo della crescita e dello sviluppo del tessuto muscolare in modelli animali come il topo, stanno fornendo un utile contributo alla conoscenza del metabolismo anche delle specie animali di interesse zootecnico*.

Muscolo e caratteristiche qualitative della carne. La presenza di una relazione tra alcune caratteristiche qualitative della carne e la composizione del muscolo in “tipi” di *fibra* nelle *specie animali di interesse zootecnico*, ipotizzata e supportata dai risultati di alcune ricerche, ha reso sempre più numerosi gli *studi finalizzati alla conoscenza della struttura del muscolo* (Ashmore, 1972; Matassino et al., 1986a e b; Dransfield et al., 2003).

Le prime ricerche distinguevano nei *muscoli scheletrici* la presenza di due “tipi” di fibra: tipo I e tipo II, successivamente denominati “*slow*” e “*fast*” sulla base della velocità di contrazione. Le fibre *fast* sono *caratterizzate dalla presenza di particolari isoforme di MHC*¹²⁹: IIa, IIb o IIx, mentre nelle fibre *slow* è *presente la MHC-I*. I due “tipi” di fibra differiscono anche per le MLC¹³⁰, per la *troponina T* e per la *tropomiosina* che, insieme, contribuiscono a *determinare una diversa velocità di contrazione* che ha un risvolto importante nel “processo di intenerimento” della carne. *La via metabolica utilizzata dai due tipi di fibra (slow e fast) per la produzione di energia è diversificata*. La fibra *fast* è essenzialmente *glicolitica*; infatti, essa presenta un'elevata attività degli enzimi “glicolitici” [ad esempio, piruvato chinasi, glucosio-3-fosfato deidrogenasi (G3PD)] a differenza di quella *slow* ove più intensa è l'attività degli enzimi “ossidativi” come la succinato deidrogenasi (SDH). Tale suddivisione risulta però troppo “rigida” anche perché *ciascuna fibra, durante la propria vita, può mutare il suo “fenotipo” in risposta a stimoli diversi, o a specifiche richieste funzionali, “temporaneamente” e “reversibilmente” oppure “in maniera definitiva”* (Matassino et al., 1986a e b, 1989, 1997).

Queste caratteristiche “metaboliche” e “biochimiche” variano a seconda del tipo di muscolo e possono avere un grande effetto sulla “qualità” del prodotto dal momento che la variabilità nella “tenerezza” della carne dipende sia da differenze nelle caratteristiche delle fibre muscolari (dimensioni e tipo), sia dal tenore in glicogeno e in collagene, sia dalle attività proteasiche.

¹²⁹ MHC: Myosin Heavy Chain = catena pesante della miosina.

¹³⁰ MLC: Myosin Light Chain = catena leggera della miosina.

I risultati di Renand et al. (2001) hanno indicato che *solo una quota* (al massimo un quarto) *della variabilità totale della “tenerezza” e del “sapore” della carne è correlata alla variabilità delle caratteristiche di struttura dei diversi muscoli della carne.*

Le “proteine contrattili” e gli “enzimi metabolici” nei muscoli *slow* e *fast* sono “differenzialmente manifesti”, analogamente ad altre proteine, quali ad esempio i fattori di trascrizione. Questi ultimi, poiché presenti in piccole quantità, non sono evidenziabili con tecniche elettroforetiche mono e bidimensionali; eppure, essi potrebbero avere grande importanza (Okumura et al., 2005).

I modelli animali con “fenotipi particolari” quali la “doppia muscolatura” (o “ipertrofia muscolare”) nel bovino (Fiems et al., 1995) e il “*callipige*” nell’ovino (Taylor, Koohmaraie, 1998) hanno contribuito a comprendere meglio la relazione tra “crescita muscolare” e “caratteristiche qualitative della carne” e, se ulteriormente indagati, potranno fornire informazioni utili ad approfondire alcuni meccanismi legati alla crescita muscolare, al metabolismo *post mortem* e alla “tenerezza” della carne.

Il “carattere” o manifestazione fenotipica “ipertrofia muscolare” è stato osservato, già a partire dal 1800, *in numerosi tipi genetici bovini da carne*; i soggetti portatori di “ipertrofia” si distinguevano per una *eccellente efficienza nell'utilizzazione degli alimenti e per incrementi ponderali giornalieri superiori alla media*. Inoltre, al carattere “ipertrofia muscolare” venivano associati una pressoché totale *assenza di grasso*, una buona “tenerezza” della carne e una struttura ossea assai più solida. Alcuni studi hanno confermato che i bovini “ipertrofici” forniscono una “carne più tenera” rispetto ai bovini “normali” (Boccard 1981; Bailey et al., 1982; Bouton et al., 1982). Negli ultimi anni, il carattere “ipertrofia muscolare” è stato osservato anche nel bovino Marchigiana nel quale, come già sottolineato, indagini citogenetiche hanno evidenziato una elevata incidenza della traslocazione *robertsoniana* allo stato cosiddetto “eterozigote”.

Analizzando i *pattern* proteomici derivati dal muscolo *semitendinosus* di tori Blu Belga, Bouley et al. (2005) e Picard et al. (2005) hanno rilevato la presenza rispettivamente, di 13 e di 17 proteine diversamente espresse nei tori “ipertrofici” e “non”, comprese le “proteine contrattili” e le “proteine metaboliche”. *Tale variabilità proteica, diversamente espressa nei due fenotipi*, potrebbe essere utilizzata come *marker* per l’ipertrofia muscolare. In particolare, maggiormente influenzate dalla “mutazione” della “miostatina” sono risultate le isoforme T della Troponina (TnT), responsabili dell’interazione con la Tropomiosina (Tm). Il complesso proteico “Troponina” è costituito da tre subunità: TnC, TnI e TnT; quest’ultima, *in vivo*, ha un ruolo strutturale

ben definito in quanto:

- (a) *incatena* le subunità TnI e TnC alla Tm;
- (b) *trasmette* i cambiamenti strutturali alla unità Tm-Tn;
- (c) *influenza* la comunicazione tra i filamenti di Tm.

Si comprende, dunque, come la “degradazione della TnT” sia sicuramente da mettere in relazione con il processo di rottura dell’integrità miofibrillare e, quindi, con l’“intenerimento della carne”. *Esistono, però, non meno di 20 isoforme di TnT derivanti da “splicing alternativo” e il ruolo fisiologico svolto da ciascuna di esse non è ancora del tutto chiarito.*

Bouley et al. (2005) hanno suggerito che la *miostatina* controlla principalmente la *proliferazione delle fibre muscolari fast glicolitiche* convalidando risultati di studi precedenti che associano l’*ipertrofia muscolare* a un’incrementata proliferazione di mioblasti secondari nei feti e a un elevato sviluppo di fibre muscolari glicolitiche negli animali adulti (Deveaux et al., 2003).

Metabolismo *post mortem* e caratteristiche qualitative della carne. *La comprensione della relazione tra metabolismo post mortem e qualità della carne è di grande interesse.* Tra i fattori in grado di influenzare notevolmente la “tenerezza” della carne vi sono la “glicolisi” e la “proteolisi” *post mortem*. Il ruolo che entrambi i fenomeni rivestono nel determinare il valore finale di “tenerezza” non è stato “chiaramente” e “completamente” definito anche se è risaputo che la frollatura influisce fortemente su tale caratteristica qualitativa e si ritiene che la *degradazione* e la *denaturazione* delle proteine durante la trasformazione *post mortem* del muscolo in carne ne siano la principale causa.

L’interesse nell’identificazione e nella caratterizzazione strutturale e funzionale delle proteasi e soprattutto dei prodotti della proteolisi ha portato a coniare il termine “degradomica” (Lopez-Otin, Overall, 2002). Uno dei primi prodotti di degradazione rilevati nel muscolo *post mortem* è un peptide di 30-32 kDa, identificato come frammento della Troponina T (TnT) (Muroya et al., 2003) e, poiché l’intenerimento procede simultaneamente con la degradazione della TnT, si è supposta una relazione positiva tra i due processi, almeno nel *bovino*. La TnT è, come precedentemente detto, una delle tre subunità responsabile dell’interazione con la tropomiosina (Tm) e, quindi, una sua degradazione è da mettere in relazione con l’intenerimento della carne.

Altre proteine muscolari sarcoplasmatiche, quali la *titina*, la *nebulina*, la *desmina*, la *filamina*, la *vinculina* e la *distrofina*, vengono degradate nel periodo *post mortem*, ma non risulta ancora completamente chiaro come la degradazione di tali proteine sia correlata alla “tenerezza” della carne. Pertanto, *una caratterizzazione più dettagliata delle proteine, delle relative isoforme multiple*

e dei loro frammenti, nonché lo studio del loro coinvolgimento nei cambiamenti molecolari che hanno luogo durante la frollatura, potrebbero essere di grande aiuto nella comprensione della relazione esistente tra “metabolismo post mortem” e “qualità della carne”.

Cambiamenti rispecchianti i reali eventi che si verificano durante il processo di frollatura interessano, nella carne suina, una ristretta *attività proteolitica del muscolo* (Lametsch, Bendixen, 2001).

Al contrario, sempre nel suino, il verificarsi di cambiamenti in 103 *spot* è stato rilevato da Lametsch et al. (2003); 26 di questi *spot* sono correlati con la “tenerezza”. In particolare, la degradazione di 9 peptidi dell’actina, su 20 identificati, è correlata con le caratteristiche qualitative della carne. Tuttavia, l’entità della demolizione dell’actina lascerebbe supporre che ciò non sia il principale meccanismo responsabile dell’intenerimento *post-mortem*.

Nel processo di variazione della “tenerezza” sono sicuramente coinvolte anche le *calpaine* e le *calpastatine* (Huang, Forsberg, 1998; Doumit, Koohmaraie, 1999) e il loro coinvolgimento è avvalorato anche dalla maggiore “durezza della carne” fornita dagli ovini con “fenotipo ipertrofico *callipige*”. Infatti, in questi soggetti, i cambiamenti strutturali *post-mortem* avvengono più lentamente a causa di una *bassa attività delle calpaine dovuta a un incremento dei livelli di calpastatine, naturali antagonisti delle calpaine*. L’evidenza che nel muscolo *post-mortem* l’attività della *m-calpaina* si mantiene costante, mentre quella della *μ -calpaina* rapidamente decade, suggerisce che quest’ultima sia maggiormente implicata nella proteolisi *post-mortem* (Veiseth et al., 2004). Anche nei *bovini Frisoni* una più elevata attività di *μ -calpaina* nel muscolo *supraspinatus* (ricco di fibre *slow*), rispetto al *longissimus* (ricco di fibre *fast*), ha suggerito un possibile legame tra la “degradazione delle proteine” e la “velocità di intenerimento post mortem” mediata dalla *μ -calpaina* e dai suoi inibitori (Koomarahie et al., 2002; Thygesen et al., 2005). Una più alta temperatura applicata al *rigor mortis* attiverebbe il “sistema” della *μ -calpaina* e accelererebbe il “processo di intenerimento” confermando il ruolo principe del sistema *μ -calpaina* nella proteolisi *post-mortem* (Hwang, Thompson, 2001; Rees et al., 2003).

La relazione tra cambiamenti nella “densità” degli *spot* e alcune caratteristiche qualitative del muscolo *longissimus* suino è stata descritta da Hwang et al. (2004): cambiamenti di parametri oggettivi quali “forza di taglio”, “perdita di acqua per gocciolamento” e “valore di luminosità” (L) coincidono con *modificazioni nella densità di 27 spot delle 133 proteine identificate durante la frollatura*; il beneficio dell’*immediato intenerimento* nonché l’effetto negativo sulla perdita di acqua per gocciolamento determinati da una elevata temperatura muscolare a pH 6,2 sarebbero soppressi dalle *basse temperature utilizzate*

durante la frollatura. Questi risultati sono coerenti con quanto rilevato in precedenti osservazioni, fatta eccezione per la *desmina* che si è rivelata un buon indicatore della proteolisi post-mortem e dell'intenerimento della carne (Wheeler e Koohmaraie, 1999; Muroya et al., 2004).

L'esistenza di un contributo sinergico delle *calpaine* e delle *proteinas* lisosomiali nell'intenerimento della carne durante il periodo post-mortem è stata descritta, sul prosciutto fresco, da Di Luccia et al. (2005); infatti, l'analisi delle mappe 2DGE, nelle prime 48 e 72 ore di frollatura, ha evidenziato la presenza di frammenti della catena pesante della miosina.

Una notevole complessità nel profilo qualitativo proteico del *fiocco sannita*¹³¹ è stata evidenziata da Matassino et al. (2004, 2006b e c) e da Inglese et al. (2006). Tale complessità è dovuta, oltre che alle principali proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari, anche ad alcune relative isoforme e loro frammenti derivanti dalla proteolisi: l'idrolisi avviene soprattutto a carico della frazione proteica miofibrillare e interessa in particolar modo le catene leggere della miosina. L'analisi bidimensionale delle frazioni miofibrillare e sarcoplasmatica dello stesso prodotto ha, inoltre, messo in luce un polimorfismo a carico delle proteine actina e *DJ-1*¹³²; polimorfismo che, dall'esame della letteratura a oggi consultata, risulterebbe per la prima volta evidenziato in carne suina stagionata.

Allo scopo di approfondire le conoscenze, relativamente alla specie caprina, riguardanti i cambiamenti fisico-chimici a carico della struttura miofibrillare del muscolo *Longissimus dorsi* sottoposto a diversi trattamenti post-mortem, è stata eseguita la caratterizzazione proteica della frazione miofibrillare: la carne stimolata con l'impiego del medio voltaggio (220v) e analizzata a 8 ore dalla morte dell'animale presenta valori di proteolisi non dissimili da quella frollata e analizzata dopo 48 ore di refrigerazione, mentre l'utilizzo del basso voltaggio (48v) comporta valori di proteolisi significativamente inferiori rispetto agli altri trattamenti utilizzati ($P < 0,001$) (Matassino et al., 2007b). Pertanto, prendendo in considerazione il livello di proteolisi muscolare, la tecnica di elettrostimolazione a medio voltaggio si è rivelata utile, nei limiti del campo di osservazione, nel diminuire il periodo di permanenza delle carcasse in cella refrigerata, senza comprometterne la proteolisi.

¹³¹ *Fiocco sannita*: prodotto stagionato composto dai muscoli *semimembranosus*, *biceps femoris* e *semitendinosus* nella proporzione di circa 31, circa 27 e circa 42% rispettivamente del Tipo Genetico Autoctono Antico (TGAA) suino "Casertana".

¹³² *DJ-1*: proteina il cui ruolo non è stato ancora completamente definito e che sembrerebbe avere funzione antiossidante; essa proteggerebbe, infatti, le cellule da stress ossidativo giocando un "ruolo chiave" nel morbo di Parkinson (Hedrich et al., 2004).

Di Luccia et al. (2004), confrontando la specie *bufalina* con quella *suina*, hanno evidenziato la “diversa suscettibilità” delle componenti proteiche all’attività proteolitica della “carne” e “derivati” delle suddette specie; le maggiori differenze legate alla “specie” risiedono nella frazione proteica *sarcoplasmatica* del *prodotto fresco e interessano*:

- (a) *le creatine chinasi* che, presenti come “due *spot*” ben definiti nella *carne suina*, sono concentrate in “unico grande *spot*” in quella *bufalina*;
- (b) *le aldolasi* che, presenti come “tre *spot*” ben definiti nella *carne suina*, sono concentrate in “unico grande *spot*” in quella *bufalina*;
- (c) *la mioglobina* che, presente sotto forma di un “unico *spot*” nella *carne suina* è rappresentata da “due *spot*” in quella *bufalina*.

Inoltre, per quanto attiene alla frazione proteica miofibrillare delle due “specie”, particolarmente interessante è la diversa eterogeneità osservata a livello delle catene leggere della miosina; le mappe bidimensionali suine mostrano una maggiore eterogeneità a carico delle *catene leggere della miosina 2*.

Di Luccia et al. (2005) e Picariello et al. (2006), *discriminando l'azione enzimatica endogena e microbica* sulla frazione miofibrillare e su quella sarcoplasmatica dei salumi “non fermentati” e “fermentati”, hanno osservato, nei prodotti fermentati, una evidente proteolisi della frazione sarcoplasmatica visibile nel prosciutto solo dopo 12 mesi di stagionatura. Questi risultati dimostrerebbero una maggiore suscettibilità della frazione proteica sarcoplasmatica e, per contro, una minore suscettibilità della frazione proteica miofibrillare all’azione degli enzimi microbici; fenomeno, questo, che sembrerebbe ascrivibile alla maggiore idrosolubilità e quindi alla maggiore disponibilità delle proteine sarcoplasmatiche rispetto a quelle miofibrillari. Quest’ultime rappresentano, essenzialmente, il substrato selettivo degli “enzimi endogeni” (catepsine B, D, H e L) i quali, proteolizzando tali proteine, conducono alla formazione di peptidi che, a loro volta, a opera degli enzimi microbici autoctoni o inoculati, vengono idrolizzati ulteriormente liberando amminoacidi responsabili del tipico *flavour* del prodotto finito; pertanto, la concentrazione di amminoacidi quali triptofano, tirosina e fenilalanina nel prosciutto dipende dall’attività proteolitica delle catepsine (Di Luccia et al., 2002; Sforza et al., 2001).

L’eccessiva attività degli enzimi proteolitici lisosomiali e soprattutto dell’enzima catepsina B è associata a un difetto nei prosciutti stagionati, indicato come “mollezza dei prosciutti”, caratterizzato da una consistenza molle e accompagnato da sapore e da colore alterato (Parolari et al., 1994). Un’indagine sui fattori di variazione dell’attività enzimatica della catepsina B ha indicato una notevole variabilità dello stesso enzima nella razza *Large White*

e ha messo in evidenza che parte di questa variabilità è attribuibile a polimorfismi genetici: presenza di 4 alleli che differiscono tra loro per mutazioni puntiformi (Russo et al., 2000). Per il difetto “mollezza dei prosciutti” i segmenti di DNA codificanti gli enzimi lisosomiali e i loro inibitori possono essere considerati candidati nell’influenzare in modo rilevante la variabilità della misura fenotipica dell’attività catepsinica. In aggiunta alla componente genetica, l’attività delle catepsine è influenzata anche da altri fattori.

Su prosciutti italiani (Parma, Parma disossato e San Daniele), per la catepsina H, è stata evidenziata la presenza di 6 differenti varianti molecolari, frutto di sostituzioni di amminoacidi e di modificazioni *post*-traduzionali, nonché la minore influenza del “diagramma di flusso” sull’attività enzimatica; l’eterogeneità della catepsina H potrebbe essere utilizzata come marcatore molecolare per individuare il tipo genetico di provenienza utilizzato per la produzione di un prosciutto (Di Luccia et al., 2002).

Nel contesto della caratterizzazione dei prodotti alimentari derivanti da “specie animali” diverse, le differenze in termini di numero di *spot*, nonché la diversità nell’eterogeneità osservata nelle frazioni sarcoplasmatica e miofibrillare potrebbero essere considerate “elementi discriminanti” per la *tracciabilità di filiera* utilizzabili, eventualmente, nell’identificazione dell’origine di un prodotto derivato. Inoltre, *l’approccio proteomico si rivela un utile strumento nella ricerca di “marker molecolari” come “indicatori” del diagramma di flusso nella “conservazione” e nella “stagionatura” della carne.*

In conclusione, dall’analisi della presenza e della funzione delle singole proteine nel muscolo infra vitam e durante il processo post mortem, si potranno trarre informazioni per lo sviluppo di metodi di miglioramento per la qualità della carne e per una produzione animale maggiormente sostenibile.

5.3.1.2. Cenni sul “Proteoma” del “latte”

Le proteine del latte, sin dagli anni ’50, sono state studiate con continuità. Negli ultimi anni la conoscenza di questo complesso “sistema proteico” è stata fortemente incrementata anche grazie ai progressi della “proteomica” *la quale, consentendo l’analisi simultanea di proteine anche da miscele complesse, potrà facilitare l’ulteriore e più approfondita conoscenza del “proteoma” del latte.*

La marcata relazione esistente tra le “varianti genetiche” e le “varianti proteiche” delle lattoproteine e le “caratteristiche casearie e non” del latte *ha reso, rende e renderà lo studio lattoproteico di fondamentale interesse.* In linea di massima, l’applicazione della strategia “proteomica” al latte ha un obiettivo generale declinabile nei seguenti punti:

- (a) *individuazione* del grado di variabilità dei *loci* lattoproteici;
- (b) *studio* della relazione tra “polimorfismo” e “qualità ‘casearia e non’ del latte”;
- (c) *identificazione* dei componenti il “caseoma” quale espressione delle attività enzimatiche.

La continua scoperta di sempre più numerose varianti genetiche e la crescente presenza di modificazioni *post*-traduzionali delle principali lattoproteine nonché i consistenti livelli di attività proteolitica responsabili dell’ottenimento di una vasta gamma di peptidi sollecitano una conoscenza sempre più approfondita del “proteoma” del latte; “proteoma” che, al pari di altri sistemi biologici, è ancora tutto da scoprire per trarre, poi, elementi utili per un loro trasferimento operativo. Infatti, un “livello addizionale di complessità” deriva dalle molteplici proteine “scarsamente presenti” la cui identificazione risulta problematica (O’Donnel et al., 2004).

Per una migliore comprensione delle relazioni tra il polimorfismo di un dato *locus* e un “carattere” d’importanza economica è bene tener presente che, nei ruminanti, i quattro segmenti di DNA codificanti le caseine sono organizzati in un *cluster* che nell’ordine include *alfa s1-caseina* (CSN1S1), *beta-caseina* (CSN2), *alfa s2-caseina* (CSN1S2) e *kappa-caseina* (CSN3); il “*cluster* caseinico” è localizzato sul cromosoma 6 nei *bovini* (Ferretti et al., 1990; Threadgill, Womack, 1990), nei *caprini* (Vaiman, et al. 1996) e negli *ovini* (Broad et al., 1994).

I segmenti di DNA che codificano le caseine sono stati tra i primi a essere isolati e sequenziati interamente, a riprova del grande interesse scientifico ed economico che suscitano nell’ambito della produzione casearia. I progressi delle nuove metodiche analitiche in biologia molecolare hanno permesso di dare uno slancio alle ricerche e di ampliare le conoscenze del settore, mutandone l’approccio allo studio. Si è passati dall’analisi fenotipica del “prodotto di un segmento di DNA codificante polipeptide/i” all’indagine a livello molecolare, dall’attenzione *del genotipo al singolo locus* allo studio dell’“aplotipo”.

La conoscenza a livello di “aplotipo” si rivela valida per:

- (a) il *miglioramento genetico* degli animali di interesse zootecnico;
- (b) la *salvaguardia della biodiversità* esistente;
- (c) la *valorizzazione delle proprietà nutrizionali e casearie* di alcuni “aplotipi”.

Il quadro “aplotipico” è discriminante, tra l’altro, il tipo genetico (Matassino et al., 1993; Boettcher et al., 2004) e ciò determina una “difficoltà oggettiva” nel comparare i risultati ottenuti in diversi tipi genetici; inoltre, nell’ambito di ogni popolazione, per fornire informazioni circa il reale effetto sulle produzioni si rende necessario, per ogni *aplotipo*, un ampliamento del

numero di animali tipizzati. L'approccio alla metodica dei *microarray* per la attribuzione del genotipo ai *loci* lattoproteici costituirebbe, come precedentemente detto, un valido strumento in quanto *permetterebbe di identificare genotipi globali in un'unica determinazione* (De Bellis et al., 2002).

L'importanza di esaminare il "genotipo globale" (*Global-gen*) ai *loci* lattoproteici, piuttosto che il genotipo al singolo *locus*, è stata già in passato evidenziata da Matassino et al. (1993) e da Zullo et al. (1994) per quanto concerne le relazioni *tra polimorfismo lattoproteico, caratteristiche quali-quantitative e caratteristiche "lattodinamometriche" del latte di bovini Frisona italiana e Bruna*. Gli Autori hanno evidenziato che, a parità di *Global-gen*, le caratteristiche quali-quantitative e casearie del latte presentano *valori statisticamente differenti tra Bruna e Frisona italiana dimostrando che lo stesso genotipo non si esprime allo stesso modo in entrambi i tipi genetici* e suggerendo l'esistenza di meccanismi differenti soprattutto di natura "interativa" tra i segmenti di DNA responsabili della sintesi delle lattoproteine nei due tipi genetici.

Per esempio, il "genotipo globale" BBA1A2BBBBBB [*loci* nell'ordine: *alfa s1-caseina* (CSN1S1), *alfa s2-caseina* (CSN1S2), *kappa-caseina* (CSN3), *β -lattoglobulina* (β -Lb) e *α -lattoalbumina* (α -La)], nella razza Frisona si esprime con un tenore in grasso pari al 3,30%, mentre nella razza Bruna con un tenore pari al 3,66% ($P < 0,05$); anche per quanto attiene alle proteine, da questo genotipo, si ottiene un incremento percentuale nella razza Bruna pari al 21% ($P < 0,01$) passando il contenuto in proteina da un valore medio del 2,87% nella Frisona a un valore del 3,48% nella Bruna. *Pertanto, per orientare la selezione verso valori ottimali di proteina, è necessario considerare, per ciascun tipo genetico, il Global-gen "ottimale": ad esempio, affinché si abbia una elevata percentuale di proteine nella razza Bruna bisognerebbe indirizzare la selezione verso il genotipo BBA1A2BBBBBB, mentre nella Frisona lo stesso effetto è raggiungibile orientando la selezione verso il Global-gen BBA1A2AABBAA che evidenzia un contenuto percentuale pari al 3,50%*. Il differente comportamento di espressione nei due tipi genetici si manifesta anche per le caratteristiche *lattodinamometriche*¹³³; infatti, entro il *Global-gen* BBA1A2BBBBAB, i valori di *T* e di *K10* risultano mediamente inferiori nella Bruna rispetto alla Frisona con un decremento pari a 10' ($P < 0,05$) e a 6,5 ($P < 0,001$), rispettivamente; il valore della *consistenza del coagulo* (*a20*), invece, risulta più elevato nella

¹³³ *Caratteristiche lattodinamometriche*: *T*=durata della fase enzimatica; *K*=velocità di coagulazione misurata dal tempo necessario affinché il tracciato lattodinamografico raggiunga un'ampiezza pari a 10mm (*K10*), o a 20 mm (*K20*) o a 30mm (*K30*); *a* = consistenza del coagulo misurata dopo 5 minuti dall'inizio della coagulazione (*a5*) dopo 10 minuti (*a10*), o dopo 20 minuti (*a20*) o dopo 30 minuti (*a30*).

Bruna rispetto alla Frisona ($P < 0,01$).

La complessa problematica della stima del *grado di relazione* tra il “polimorfismo lattoproteico” e le caratteristiche chimiche e lattodinamometriche va affrontata ai “diversi livelli” di “espressione genotipica” e di “manifestazione fenotipica” individuando i meccanismi di collegamento fra queste due ultime e ottimizzando il risultato del “sistema” modificando “opportunamente” il contributo del sistema stesso (Bettini, 1972; Matassino, 1978, 1983, 1985 e 1986; Pagnacco et al., 1983).

Partendo dalla consapevolezza che il 73% del latte commercializzato in Italia viene impiegato per la trasformazione casearia, *le proprietà del latte legate alla sua attitudine alla trasformazione assumono un ruolo di primo piano*. Il latte, per avere una buona “qualità casearia”, deve possedere determinate caratteristiche quali un buon contenuto di caseina, varianti potenzialmente favorevoli, un discreto contenuto di fosfato di calcio colloidale, un giusto grado di acidità titolabile, un moderato contenuto di cellule somatiche e un’ottima attitudine alla coagulazione; coagulazione intesa come buona reattività con il caglio, elevata capacità di rassodamento della cagliata e conseguente idonea capacità di contrazione ed eliminazione del siero, in modo da ottenere una massa caseosa strutturalmente omogenea, adeguatamente e uniformemente disidratata in tutte le sue parti; condizioni, queste, fondamentali affinché i processi fermentativi abbiano sia un avvio normale sia un andamento regolare durante l’intero periodo di maturazione del formaggio (Mariani et al., 1999).

Solo alcuni degli aspetti sopra citati possono essere affrontati nell’ambito dei programmi di selezione volti al miglioramento della “qualità casearia” del latte: uno di questi è sicuramente quello del miglioramento della “frazione caseinica” delle proteine. La *varietà di isoforme* in cui le principali proteine (in particolare le caseine calcio-sensibili) possono essere presenti nel latte è ampia. La presenza di isoforme ottenute da *splicing* “differenziale” o da una diversa entità di modificazioni *post-traduzionali* nonché da una naturale attività proteolitica degli enzimi endogeni contribuisce a rendere il *latte una miscela sempre più complessa* e interessante dal punto di vista nutrizionale, con proprietà “nuove” o comunque da indagare ulteriormente.

Le caseine sono presenti nel latte sotto forma di un complesso organico e minerale “complesso proteico eterogeneo fosforilato e glicosilato”: la micella; quest’ultima, di diametro variabile (20-600 nm), è a sua volta costituita da particelle sferiche denominate *submicelle*¹³⁴; dal punto di vista della composi-

¹³⁴ *Submicelle*: particelle sferiche formanti la micella costituite da una *parte esterna* rappresentata dalle *caseine più idrofile* [*alfa s1-caseina* (CSN1S1), *alfa s2-caseina* (CSN1S2), *kappa-caseina* (CSN3)] e da un *nucleo centrale idrofobo* costituito dalla *beta-caseina* (CSN2); nella costitu-

zione amminoacidica, le caseine si presentano ricche di prolina e di amminoacidi fosforilati mentre risultano relativamente povere di amminoacidi solforati (soprattutto cisteina). Tuttavia, considerando le proteine del latte nel loro complesso, questa carenza viene compensata dalla ricchezza in amminoacidi solforati delle sieroproteine.

Le caseine hanno la caratteristica di presentare, soprattutto nelle specie *bovina* e *caprina*, uno *spiccato polimorfismo* (tab. 6) che determina differenze nella loro struttura molecolare la quale si traduce in differenze nelle proprietà fisico-chimiche e biologiche delle stesse proteine. Le diverse varianti genetiche possono non essere tutte presenti in una data popolazione e, se lo fossero, potrebbero differenziarsi per la loro frequenza; a questa diversificazione fa riscontro una differente presenza quantitativa a livello del singolo individuo; presenza che, a livello di popolazione, si concretizza in un “gradiente fenotipico”.

Il polimorfismo ai *loci* lattoproteici, con particolare riguardo a quelli *caseinici*, dimostra l’elevata eterogeneità della frazione proteica; da ciò scaturisce l’importanza delle indagini “genomiche” e “proteomiche” volte a individuare tale eterogeneità e a chiarire l’influenza di questa variabilità sulle proprietà “chimico-fisiche” del prodotto ai fini di una migliore sua destinazione. Tali approfondimenti risulterebbero entrambi utili nel pianificare un miglioramento genetico della produzione di latte in grado di soddisfare le *dinamiche* e le *diversificate richieste* del mercato e del *moderno consumatore* (Matassino, 1992a).

Latte bovino. Le caseine presentano numerose varianti genetiche codificanti forme proteiche differenti per sostituzioni amminoacidiche che modificano la carica elettrica della proteina con evidenti ripercussioni su aspetti “funzionali” e “produttivi” (Marziali, Ng-Kwai-Hang, 1986; Mariani, Summer, 1999; Summer et al., 2002).

La *alfa s1-caseina* è costituita da 199 amminoacidi e rappresenta circa il 35% delle caseine; a oggi, sono state individuate 8 varianti genetiche (A, B, C, D, E, F, G e H) e altrettante varianti proteiche (tab. 6); la variante B è la più frequente nel *Bos taurus*. Gli alleli, a oggi identificati, sono associati a un “diverso livello di espressione” e quindi a un “diverso contenuto di proteine presenti nel latte”; ad esempio, il latte prodotto da soggetti portatori del genotipo BB al *locus* CSN1S1 fornirebbe una resa maggiore in formaggio

zione della submicella, le molecole CSN3 espongono i gruppi glicosidici all’esterno (verso il plasma latteo) mentre le molecole CSN1S1 e CSN1S2 si dispongono internamente alla micella in modo che i gruppi fosfato si leghino al calcio del fosfato colloidale, il quale funziona come legante tra ogni singola submicella.

mentre quello prodotto da soggetti GG fornirebbe una resa minore avendo il 55% di *alfa s1-caseina* in meno (Aleandri et al., 1990; Mariani et al., 1995).

La *alfa s2-caseina*, formata da 207 amminoacidi, è presente in ragione del 10-15% circa delle caseine totali. Finora sono state individuate 4 varianti genetiche (A, B, C, D) (tab. 6) di cui solo due, A e D, maggiormente presenti. La *alfa s2-caseina* risulta essere quella maggiormente idrofila essendo costituita da tre *cluster* di gruppi anionici che, tra l'altro, rendono tale proteina più sensibile al calcio e più suscettibile alla proteolisi basata sull'attività della *chimosina* e della *plasmina*. L'attività della *chimosina* e della *plasmina* è responsabile del rilascio di "peptidi bioattivi" alcuni dei quali dotati di attività antibatterica (Zucht et al., 1995).

La *beta-caseina*, costituita da 209 amminoacidi, rappresenta circa il 30-35% delle caseine totali. Essa ha un elevato polimorfismo: a oggi, sono state individuate ben 12 varianti genetiche a cui corrispondono altrettante varianti proteiche. Da tale proteina, in seguito all'azione della *plasmina*, si origina la "frazione gamma-caseina (γ -Cn)"; tale frazione è costituita dalle componenti *gamma* 1 (29-209), *gamma* 2 (106-209) e *gamma* 3 (108-209) (Green, Foster, 1974; Gordon, Groves, 1975); la concentrazione di queste componenti aumenta sia nella fase di asciutta sia in un latte con un numero di cellule somatiche superiore alla norma. Dal momento che è stata osservata anche una significativa correlazione positiva tra "quantità dei frammenti di gamma caseina" e "maturazione del formaggio" (*Parmigiano Reggiano e Grana Padano*), la frazione *gamma-caseina* è da considerare un "marcatore molecolare di qualità" (Addeo et al., 1994; Gaiaschi et al., 2000). Trieu Cuot e Addeo (1981) hanno evidenziato la formazione di una *quarta componente* della γ -Cn nel latte bufalino, risultata dalla scissione della *plasmina* al sito Lys68-Ser69 della *beta-caseina* (Ferranti et al., 1998). Recentemente, l'approccio proteomico ha consentito di individuare questa *quarta componente* anche nel latte di bufala congelato e nella cagliata nonché di misurarne la concentrazione fornendo un nuovo indicatore di discriminazione fra il latte bufalino e il latte bovino ove questa componente è assente (Di Luccia, c.p. 2007).

La *k-caseina* è una proteina costituita da 169 amminoacidi e svolge, per la sua idrofilicità, un ruolo importante nella stabilità della struttura micellare. Nel latte rappresenta circa il 12-15% delle caseine totali e presenta un elevato polimorfismo (tab. 6). La variante B svolge un ruolo fondamentale nella trasformazione casearia del latte. Infatti, come è noto, rispetto alla variante A, la B conferisce al latte un maggiore contenuto in *k-caseina* e una migliore attitudine alla trasformazione casearia: *il latte coagula in tempi minori, il coagulo rassoda più velocemente e ha una consistenza maggiore*.

Come è noto, oltre alle caseine, vi sono altre proteine con peso molecolare inferiore, dette *sieroproteine*, che costituiscono il 17% circa delle sostanze azotate totali. Esse sono ricche in amminoacidi essenziali e, in particolare, in amminoacidi solforati; vantano perciò un elevato valore biologico che le rende particolarmente interessanti per la formulazione di integratori a uso umano. Le sieroproteine si ritrovano nel siero a fine lavorazione e non concorrono, quindi, all'ottenimento del formaggio; nonostante ciò, anche alcune loro varianti giocano un ruolo importante nei riguardi delle caratteristiche casearie del latte. La principale sieroproteina è la *beta-lattoglobulina* assente nel latte umano; essa presenta 11 varianti genetiche (tab. 6), tra le quali le più frequenti sono la A e la B. I lattici prodotti da soggetti portatori della variante B hanno un maggiore contenuto in caseina e un indice di caseina nettamente più elevato (Aleandri et al., 1990). Il ruolo della *beta-lattoglobulina* non è ancora ben conosciuto; tuttavia, essa, allo stato nativo, è considerata il più potente allergene del latte bovino (Natale et al., 2004).

Latte caprino. L'elevato numero di varianti genetiche e di varianti proteiche che si evince dalla tabella 6 evidenzia la complessità dell'analisi delle caseine nella specie caprina.

L'*alfa s1-caseina* ha un elevato polimorfismo (Boulanger et al., 1984; Grosclaude et al., 1987; Brignon et al., 1989; Leroux et al., 1990; Martin, Leroux, 1994; Grosclaude e Martin, 1997; Bevilacqua et al., 2002; Ramunno et al., 2005) (tab. 6); i 17 alleli, a oggi identificati, sono associati a un "diverso livello di espressione" e quindi a un "diverso contenuto di proteine presenti nel latte" e sono raggruppabili, secondo Fox et al. (1992), in quattro classi:

- (a) "forte", comprendente gli alleli A, B1, B2, B3, B4, C, H, L, e M responsabili della produzione di almeno 3,5 g/l di *alfa s1-caseina*;
- (b) "intermedia", comprendente gli alleli E e I responsabili della produzione di almeno 1,1 g/l di *alfa s1-caseina*;
- (c) "debole", comprendente gli alleli D, F¹³⁵ e G responsabili della produzione di almeno 0,45 g/l di *alfa s1-caseina*;
- (d) "nulla", comprendente gli alleli 01, 02 e N che sono associati all'apparente assenza di *alfa s1-caseina*.

L'*alfa s2-caseina* ha un discreto polimorfismo (Lagonigro et al., 2004; Sacchi et al., 2005) (tab. 6); gli alleli, a oggi identificati, sono associati a un

¹³⁵ *Allele F*: alcuni studi hanno messo in evidenza che nel latte di soggetti portatori di tale allele viene liberato, per la maggiore attività lipasica, un maggior livello di acidi grassi a corta catena; fenomeno, quest'ultimo, che contribuirebbe al tipico *flavour* dei prodotti lattiero-caseari caprini.

“diverso livello di espressione” e sono raggruppabili, secondo Boulanger et al. (1984), Grosclaude et al. (1987), Lagonigro et al. (2001), Ramunno et al. (2001a e b), in tre classi:

- (a) “normale”, comprendente le varianti A, B, C, E ed F responsabili della produzione di almeno circa 2,5 g/l di *alfa s2-caseina*;
- (b) “intermedia”, comprendente la variante D responsabile della produzione di una quantità di *alfa s2-caseina* minore di 2,5 g/l;
- (c) “nulla”, includente l’allele 0 associato a un “contenuto nullo” di *alfa s2-caseina*.

La presenza dell’allele “nullo” influenza significativamente la composizione proteica del latte e il suo potere “allergenico”. Un test *in vitro* di allergenicità, condotto su latte prodotto da capre con genotipo:

- (a) omozigote normale (NN);
- (b) eterozigote per l’allele nullo (N0);
- (c) omozigote per l’allele nullo (00),

ha rivelato la maggiore allergenicità del latte prodotto da soggetti NN (Marletta et al., 2004).

La *beta-caseina* presenta un polimorfismo (tab. 6) frutto di mutazioni puntiformi (Neveu et al., 2002; Chessa et al., 2005; Cosenza et al., 2005). Gli alleli A, B e C sembrerebbero essere associati a un normale contenuto della proteina. La variante C sembra essere predominante nelle razze caprine italiane (Chessa et al., 2005). In particolare, a tale *locus* sono stati identificati *due diversi alleli “nulli”* influenzanti notevolmente la composizione del latte e l’attitudine alla caseificazione (Dall’Olio et al., 1989; Chianese et al., 1993; Mahè, Grosclaude, 1993; Ramunno et al., 1995; Grosclaude e Martin, 1997).

La *kappa-caseina* ha un elevato polimorfismo (Jann et al., 2004; Prinzenberg et al. 2005) (tab. 6).

Le principali sieroproteine (*alfa-lattoalbumina* e *beta-lattoglobulina*), di cui sono noti i dati strutturali, presentano sostituzioni puntiformi rispetto alle ortologhe bovine.

Nel tipo genetico Girgentana è stato riscontrato un contenuto percentuale variabile tra il 37 e il 57% per l’*alfa-lattoalbumina* e tra il 43 e il 63% per la *beta-lattoglobulina* (Chianese et al., 2000).

Latte Ovino. Per il latte ovino è stato osservato un quadro proteico meno complesso (tab. 6). *Ancora non è ben dimostrata l’associazione tra varianti genetiche e “diverso gradiente quantitativo di sintesi proteica”* (Erhardt, 1989; Chianese et al., 1996).

L'*alfa s1-caseina* ha un elevato polimorfismo (tab. 6) frutto di sostituzioni amminoacidiche puntiformi e/o di delezione di peptidi nella catena proteica (Davoli et al., 1990; Ceriotti et al., 2004). La presenza dell'allele D, sia allo stato omozigote che eterozigote, ha *una considerevole influenza sulla produzione di formaggio*, essendo associata a una *riduzione* del contenuto in caseine e a un *aumento* dei tempi di coagulazione; il latte proveniente da soggetti CC presenta un contenuto caseinico maggiore del 3,5% rispetto a quello proveniente da soggetti CD e maggiore dello 8,5% rispetto a quello proveniente da soggetti DD; inoltre, il latte dei soggetti CC presenta un rapporto "proteina-grasso" favorevole, un minore diametro delle micelle e, quindi, una migliore attitudine alla coagulazione.

L'*alfa s2-caseina*, a oggi, è caratterizzata da tre varianti genetiche e da altrettante varianti proteiche (tab. 6). Il polimorfismo proteico è stato identificato da Chessa et al. (2003) nella Gentile di Puglia; esso va caratterizzato con un approccio molecolare e va ulteriormente indagato in altri tipi genetici ovini.

La *beta-* e la *kappa-caseina* sono caratterizzate da tre e da due varianti genetiche, rispettivamente (tab. 6); per queste due proteine, a oggi, dalla letteratura consultata non emerge un polimorfismo proteico. Anche nel latte ovino, la *beta-caseina* è suscettibile all'azione della plasmina; l'attività di questo enzima aumenta nei latti prodotti da soggetti "mastitici" e da soggetti "a fine lattazione" rendendo maggiore la *presenza della beta-caseina* (e quindi di *gamma-caseine*) in tali latti.

Interessanti relazioni tra varianti genetiche lattoproteiche e caratteri di interesse economico sono stati descritti da Rampilli et al. (1992) e da Pirisi et al. (1999). *Tali effetti convalidano e supportano l'importanza di indagare ulteriormente la base molecolare dei polimorfismi "caseinici" e "non" nella specie ovina.*

Separazione e identificazione delle proteine. La complessa eterogeneità delle diverse frazioni caseiniche descritte è stata evidenziata mediante elettroforesi alcalina in prima dimensione e focalizzazione isoelettrica in seconda dimensione (Di Luccia et al. 1986; Chianese et al. 1995) ed è stata confermata, in diverse specie animali, anche dall'impiego di sistemi elettroforetici bidimensionali su gradienti di pH immobilizzati accoppiati alla spettrometria di massa (Galvani et al., 2000; Roncada et al., 2002; O'Donnell et al., 2004; Lindmark-Mansson et al., 2005). Con l'integrazione HPLC¹³⁶-MALDI-TOF è possibile oggi *evidenziare le diverse molecole co-migranti*: nuove isoforme delle proteine sia nel *latte di capra* che in quello *equino* sono state infatti evidenziate (Egito et al., 2002; Miranda et al. 2004). Anche l'impiego combinato di RP-HPLC/ESI-MS¹³⁷ è risultato particolarmente utile nel ri-

¹³⁶ HPLC: *High-Performance Liquid Chromatograph* = cromatografia liquida ad alta prestazione.

¹³⁷ RP-HPLC/ESI-MS: *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ioni-*

levamento e nella caratterizzazione di componenti minori presenti in *miscele proteiche complesse come il latte di capra* (Galliano et al., 2004; Cunsolo et al., 2005 e 2006).

A oggi, un limite alla conoscenza del *proteoma* del latte di animali di interesse zootecnico è la scarsa presenza delle specifiche proteine nei *database* utilizzati come riferimento per l'identificazione al MALDI-TOF¹³⁸; limite che è ancor più evidente nell'analisi di proteine che, pur "scarsamente presenti", hanno un ruolo non trascurabile nel biochimismo cellulare. L'identificazione di proteine "scarsamente presenti" nel latte è, *dunque, particolarmente problematica e richiede strategie operative che ne migliorino la risoluzione.*

Per ridurre questo limite di conoscenza, *specialmente a livello di peptide*, si sta ricorrendo a strategie operative adeguate. *L'applicazione delle procedure di "prefrazionamento" e di "separazione multipla"* abbinate alle diverse "tecniche della spettrometria di massa" rappresentano e rappresenteranno sempre più le "chiavi di successo" per la *proteomica del latte*. Ad esempio, l'immunoassorbimento¹³⁹, attuato da Yamada et al. (2002) su colostro e su latte bovino, ha permesso di rilevare e di identificare molte proteine "scarsamente presenti" quali l'apolipoproteina H.

Anche l'analisi di compartimenti subcellulari, a oggi realizzata con l'impiego di varie strategie di solubilizzazione, sta diventando sempre più attuale al fine di indagare la composizione proteica di alcune strutture cellulari; un esempio è dato dallo studio delle proteine della membrana dei globuli di grasso nel latte; proteine che, nel latte umano, rappresentano il 2-4% del contenuto proteico totale e la cui composizione è ancora sconosciuta (Cavaletto et al., 2002).

La limitata conoscenza dei vari "*proteomi*" di un latte sta a evidenziare la necessità di un notevole ampliamento degli studi del settore per quanto concerne sia l'individuazione di "*metodiche sofisticate*" (ma semplici da applicare) sia l'evidenziazione di *proteine, relative isoforme e loro frammenti.*

È verosimile che le tecniche di 2D-PAGE, in accordo con O' Donnell et

zation Mass spectrometry = spettrometria a elettrospray di ionizzazione di massa/cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa.

¹³⁸ *Identificazione delle proteine mediante il MALDI-TOF*: le proteine vengono identificate paragonando i pesi molecolari del peptide con i pesi molecolari teorici ottenuti dalla digestione "*in silico*" di tutte le proteine presenti nella banca dati (Mortz et al., 1994).

¹³⁹ *Immunoassorbimento*: strategia operativa per rimuovere dal latte e dal colostro, prima dell'analisi 2D-PAGE, le proteine altamente abbondanti quali le IgG la β CN, mediante l'impiego di opportune colonne con anti-IgG e anti β CN immobilizzati.

al. (2004), continueranno ancora a dominare l'analisi proteomica del latte per qualche tempo; esse, con la loro alta risoluzione, dovranno consentire una migliore separazione di isoforme proteiche caratterizzate dalle più lievi differenze. Questa separazione è da considerare elemento "chiave" nell'individuazione del "proteoma" di un *latte individuale* e, in particolar modo, nella conoscenza della *variabilità a livello di popolazione; variabilità che, conosciuta nelle sue componenti, costituisce la base per una successiva sua utilizzazione ai fini del miglioramento genetico*.

Le precedenti tecniche vanno opportunamente integrate con la conoscenza delle modificazioni *post-traduzionali*, specialmente nel settore lattiero-caseario. Queste modificazioni *post-traduzionali* (*fosforilazione*¹⁴⁰, *glicosilazione*¹⁴¹, *lattosilazione*¹⁴²) riguardanti primariamente, ma non esclusivamente, le caseine, vengono studiate con l'impiego della proteomica (Martin et al., 2002); le fosfovarianti, così come le glicovarianti, sono infatti distinguibili impiegando l'analisi 2D-PAGE e MALDI-TOF.

Holland et al. (2004) hanno identificato 10 diverse glicoforme di kappa-caseina permettendo anche di verificare la presenza e la quantità di fosforilazione a carico di ciascuna glicovariante separata dalla 2D-PAGE.

Alla luce dei suddetti risultati si evidenzia *la potenzialità della proteomica al fine di comprendere i vari cambiamenti a carico della struttura di proteine del latte dovuti alle varie fasi del "diagramma di flusso"* o processo di lavorazione a cui è sottoposto un latte. È indubbio che questi processi possono influenzare le caratteristiche *nutrizionali, extranutrizionali, salutistiche e sensoriali* del latte.

¹⁴⁰ *Fosforilazione*: aggiunta di un gruppo fosfato alla catena laterale polare degli amminoacidi di serina (Ser) o treonina (Thr) o tirosina (Tyr); tale processo conferisce idrofilità alla proteina; esiste un "codice di fosforilazione" o "sequenza di consenso" rappresentata dalla sequenza: "amminoacido acido-X- (Ser o Thr o Tyr)", ove X può essere un amminoacido qualsiasi.

¹⁴¹ *Glicosilazione*: aggiunta di una catena glucidica agli atomi di azoto (*N-glicosilazione*) e di ossigeno (*O-glicosilazione*) di alcuni amminoacidi; la *prima* è prevalente nelle proteine delle membrane dei globuli di grasso del latte e interessa i residui di asparagina mentre la *seconda* avviene prevalentemente all'interno della κ -caseina e interessa i residui di serina (Ser) e di treonina (Thr); nel caso della *N-glicosilazione* esistono due possibili "sequenze di consenso": "Asn-X- Ser" e "Asn-X- Thr", ove X può essere un amminoacido qualsiasi a eccezione della "prolina"; nel caso della *O-glicosilazione*, non esisterebbero "sequenze di consenso"; la glicosilazione può essere "naturale" o "indotta" da qualche fase del diagramma di flusso.

¹⁴² *Lattosilazione*: aggiunta di lattosio ai gruppi amminici di proteine (reazione di Maillard) con formazione di specie "lattosilate"; tale reazione è facilmente rilevabile con i moderni strumenti MS in quanto le "specie lattosilate" presentano un incremento della massa di 324 Dalton; tale incremento può essere correlato con la severità del trattamento effettuato.

L'“approccio differenziale”¹⁴³ può rappresentare uno *step* semantico ai fini del miglioramento della comprensione del biochimismo cellulare; approccio impiegato, fra l'altro, da Baeker et al. (2002) per analizzare il latte di bovine “sane” o “affette da mastite” rilevando, durante l'infezione, un marcato incremento di 4 proteine identificate come componenti del complesso proteico “prostaglandina sintetasi (PGDS)”; pertanto, l'impiego della determinazione dei livelli di PGDS, come *biomarker* per la mastite bovina, è da considerare un valido trasferimento operativo.

L'utilizzo di metodiche in grado di rilevare la presenza di lattoproteine a elevata omologia costituisce, fra l'altro, uno strumento di tracciabilità e di rintracciabilità di prodotti derivati dal latte utile, tra l'altro, a individuare l'origine del latte e quindi “eventuali frodi”.

Roncada et al. (2002) hanno utilizzato un “approccio differenziale” nella valutazione di lattici di capra differenti per i livelli di espressione dell'*alfa s1-caseina*: il latte prodotto da animali portatori di alleli “nulli” per l'*alfa s1-caseina* (L0), paragonato a quello prodotto da animali caratterizzati da alleli “forti” (LF), risulta *privo di alfa s1-caseina* e contiene *quantità minori delle altre caseine*. *Pertanto, grazie anche alla caratterizzazione proteomica del latte è possibile selezionare soggetti portatori di alleli “vantaggiosi” a seconda della destinazione del latte:*

- (a) *animali portatori di alleli “deboli” o “nulli” per l'alfa s1-caseina, fornendo un latte con minore o nullo tenore caseinico e quindi con “ridotto potere allergenico”, sarebbero più idonei a produrre un latte da destinare al consumo diretto dell'infante;*
- (b) *soggetti portatori di alleli “forti” sarebbero più idonei a produrre latte particolarmente vocato alla trasformazione casearia.*

La *richiesta di “alimenti” “funzionali” al “benessere” è sempre crescente*. Nell'ambito del miglioramento genetico, per far sì che questa domanda sia soddisfatta, l'individuazione di nuovi obiettivi di selezione può apportare un grande contributo. *Il processo di rinnovamento degli indici di selezione, volto a introdurre manifestazioni fenotipiche inerenti alla “funzione”, è in atto*. Il conseguimento di questi obiettivi, tuttavia, necessita di continue conoscenze di base relative a parametri genetici dei “caratteri” considerati e all'effetto dei principali fattori ambientali che agiscono sulla variabilità degli stessi.

Migliorare le conoscenze sulle relazioni tra “varianti genetiche” e “varianti

¹⁴³ “Approccio differenziale”: approccio consistente nel rilievo del profilo proteico in due gruppi di individui “estremi” per alcune manifestazioni fenotipiche al fine di individuare le principali differenze a livello di proteoma.

proteiche” e “caratteristiche casearie e non” del latte consentirebbe di agevolare la valutazione “dell’attitudine alla caseificazione” e “della qualità nutrizionale, extranutrizionale e salutistica” del latte fornendo agli operatori gli strumenti adatti per operare un corretto lavoro di selezione nelle popolazioni per questi caratteri.

6. CONCLUSIONI

1. La genomica e la proteomica funzionali costituiranno sempre di più un prodromo fondamentale per capire il remoto e complesso biochimismo presente nella poliedrica vita di una cellula di un qualsiasi essere vivente.
2. Il miglioramento genetico di una *biopoiesi* non può prescindere dal progredire di tali conoscenze, specialmente se viene implicato l’“aspetto fenotipico” della “qualità” del prodotto, considerata nei suoi *molteplici* e *innumerevoli* effetti sul “benessere del consumatore”. Questi effetti dipendono dal ruolo che i componenti “nutrizionali”, “extranutrizionali” e “salutistici” del prodotto di origine animale svolgono una volta ingeriti.
3. L’uomo non può essere considerato un’*entità biologica* “invariante” nel *tempo* e nello *spazio*, ma un “essere vivente” che richiede, lungo l’arco della sua vita (dall’embrione al feto al bambino all’adolescente all’adulto all’ultrasessantenne all’ultraottantenne all’ultracentenario), un “regime alimentare” diversificato al quale il “sistema allevatorio” deve rispondere con oculatezza, con competenza e con convinzione; la risposta del “sistema allevatorio” è ancora più impegnativa se si considera che il regime alimentare varia anche in relazione ad alcune funzioni “biologiche” (gravidanza, allattamento, attività agonistica, ecc.) e “intellettuali” esplicate quotidianamente.
4. Il futuro del “miglioramento genetico degli animali in produzione zootecnica” (MGAPZ) non può prescindere da una “visione sistemica”. La variabilità di una “manifestazione fenotipica” o “attributo” in termini cibernetici porta a considerare qualunque variazione oltre che sotto l’aspetto statico anche sotto quello dinamico; l’aspetto statico va posto in termini di categoria aristotelica tassonomica mentre quello dinamico è oggetto di studio dello zootecnologo, il quale è molto più interessato alla natura di questa variabilità; di qui l’utilità di una visione sistemica che parte dall’animale e va all’agroecosistema.
5. Considerazioni economiche, tecniche e genetiche interferiscono direttamente o indirettamente con il MGAPZ.
6. L’“arsenale molecolare” dell’animale in produzione zootecnica è la “dote”

per raggiungere “traguardi biopoietici innovativi e utili” specialmente per l’aspetto salutistico del consumatore che deve essere considerato un vero e proprio “co-produttore”.

7. Il “sistema allevatorio” e/o il “singolo allevatore”, operando secondo questa strategia, partecipa/ano pienamente all’“evoluzione costruttiva” dell’intero “sistema”.
8. Le nuove conoscenze evidenziano che i meccanismi molecolari alla base della vita sono integrati in sistemi complessi che funzionano “olisticamente”. La biologia del “2000” si sta qualificando principalmente come settore “biologico-molecolare”, ove la conoscenza di un “carattere” o “manifestazione fenotipica” nella sua “struttura” e nella sua “funzione” è *fondamentale* se non *indiscussa*. Il “carattere” è funzione degli effetti di diversi piani organizzativi: *submolecolare, molecolare, cellulare, tissutale, organico, organismico, biocenotico, ecosistemico*; ogni piano è *caratterizzato da norme proprie e da norme di vita di relazione con altri piani. A ogni successivo livello di organizzazione la complessità strutturale e funzionale aumenta*, arricchendosi “epigeneticamente”.
9. L’innovazione si basa su una “genomica” ove non sono più i soli segmenti di DNA codificanti “polipeptide/i” (cosiddetti “geni”) gli “unici protagonisti” del processo ereditario ma anche le “reti regolatrici” che ne governano l’espressione; espressione che si concretizza in una “manifestazione fenotipica”, la quale altro non è se non il prodotto di una *attività sistemica* del DNA.
10. “Segmenti di DNA” e “proteine” vanno considerati come componenti insostituibili di una vera e propria “rete cibernetica di informazione”, ove i segnali dell’ambiente “interno” ed “esterno” all’organismo nella regolazione di un meccanismo “molecolare-cellulare-biologico” evidenziano che l’“ambiente” e l’“organismo” costituiscono un’“unità” sempre meno inscindibile. Pertanto, alla luce dell’impostazione sistemica, qualsiasi essere vivente può essere considerato un organismo “cibernetico” identificabile con un vero e proprio “sistema biologico, aperto, dinamico, vincolato, neghentropico”.
11. La singola cellula non funziona, normalmente, come un semplice “sistema a cascata” (dal “genotipo” al “fenotipo”), ma come un “sistema complesso”. Con particolare riferimento agli aspetti funzionali del genoma, la rete di messaggi molecolari in un organismo può essere paragonata a un “sistema di circuiti” in cui i segmenti di DNA con funzione *regolativa* agiscono da “commutatori” o da “interruttori” (*switch*) che “accendono” o “spengono” l’attività trascrizionale

del DNA. Questi interruttori ricevono messaggi di ingresso (*input*) dall'ambiente *extra* e *intracellulare* e rispondono con messaggi di uscita (*output*) che si concretizzano nell'espressione del segmento di DNA interessato.

12. *I componenti del genoma opererebbero attraverso cascate di segmenti di DNA codificanti organizzate in reti ("network") molto complesse. La sequenza temporale di attivazione dei vari segmenti di DNA è, indiscutibilmente, legata alla "stabilità" dell'informazione che decade universalmente e progressivamente nel tempo, poiché il tempo "biologico" viene consumato e non sostituito; ciò comporta come "effetto finale" un esaurimento dell'arsenale di cui l'individuo è in possesso.*
13. *La "dinamica del fenomeno della complessità", legata anche alle continue acquisizioni della genomica e della proteomica, evidenzia l'esigenza di una visione sempre più integrata "genotipo-fenotipo" nel funzionamento di qualsiasi "entità biologica".*
14. *Si ritiene che la maggioranza dei "segmenti" a comportamento "pleiotropico" interessi soprattutto quelli coinvolti nello sviluppo e nelle risposte ormonali. La base "pleiotropica" di alcuni fenotipi, quale ad esempio la "doppia muscolatura" evidenzia l'importanza di verificare gli effetti fenotipici multipli quando si intraprendono programmi di selezione tendenti al miglioramento del rapporto massa muscolare/grasso affinché non siano compromessi altri aspetti produttivi e/o riproduttivi influenzati dalla pleiotropia.*
15. *Il concetto di "norma di reazione" non va considerato come l'espressione statica del cambiamento di un "carattere" (o "manifestazione fenotipica") ma come un fenomeno dinamico che si verifica in un determinato contesto microambientale sotto l'azione del "genoma". Stimoli ambientali possono portare alla espressione di una "variabilità genetica latente" e i fenotipi relativi, sortiti dall'ambiente dopo lo "screening" effettuato dalla selezione naturale, possono essere "assimilati geneticamente".*
16. *L'"assimilazione genetica" e la "capacitazione" sono indicative della importanza di mantenere elevato il livello di biodiversità quale strumento principe che permette alla natura di sincronizzarsi alla velocità dei cambiamenti ambientali; pertanto, la biodiversità è da considerarsi contemporaneamente sia anello di congiunzione con il passato sia base del divenire biologico; ogni essere vivente possiede una propria individualità che viene "codificata" nel proprio "genoma" e viene "costruita epigeneticamente".*
17. *Qualunque "filiera produttiva" basata sulla utilizzazione dell'animale in*

produzione zootecnica ha le sue fondamenta sulla relazione tra “biologia” e “poiesi”. La conoscenza delle interazioni tra le caratteristiche molecolari “peculiari” dei tipi genetici autoctoni, specialmente antichi (TGAA), e le caratteristiche del bioterritorio in cui essi sono inseriti è *fondamentale per il continuo miglioramento quali-quantitativo di una “biopoiesi”*.

18. La *complessità* dell'espressione fenotipica “produttività” suggerisce una revisione nel modo di considerare la “manifestazione fenotipica” o un “carattere” in un piano di miglioramento delle prestazioni degli animali in produzione zootecnica; in tale contesto, il “carattere” va inteso come una manifestazione di un particolare aspetto del fenotipo visto anche sotto un profilo “tecnologico” e, pertanto, non solo “biologico”.
19. È noto che il codice genetico è protetto da sistemi di informazione, di controllo e di retroazione. La “costruzione” di un “fenotipo” si realizza secondo livelli diversi di retroazione “positiva” e “negativa”, fortemente influenzati da *fenomeni epigenetici* dovuti a fattori sia *esogeni* che *endogeni* responsabili di un vero e proprio “epigenotipo” in base al quale *l'individuo non sarebbe un semplice mosaico di caratteri controllati dai segmenti di DNA codificanti “polipeptideli”, ma un sistema caratterizzato da mutue interazioni e da equilibri tra forze opposte*.
20. È noto che i vari “caratteri” o “manifestazioni fenotipiche” (comprese quelle comportamentali) di un organismo vivente sono ampiamente sottoposti all'effetto di una diversificata serie di “vincoli” (*constraint*) i quali, universali e fortemente interconnessi alle caratteristiche chimico-fisico-biologiche di qualsiasi essere vivente, agirebbero determinando sia i limiti che le forme di ogni processo evolutivo. Indubbiamente, questi vincoli interagiscono con la “selezione”, sia naturale che zootecnica; la relazione tra “selezione” e “*constraint*” è “reciproca”; questa “reciprocità” può condurre al sorgere di nuovi “fenotipi ereditabili”. Si può sinteticamente ritenere che i vincoli costituiscono una vera e propria rete che opera *direttamente* o *indirettamente* nell'influenzare una *manifestazione fenotipica* di un essere vivente ove “l'irriducibile complessità” riveste un ruolo non eludibile. Tutte le *manifestazioni fenotipiche*, plausibilmente, sarebbero il risultato di una manifestazione istruttiva dell'influenza dei *constraint*; *operatività* da ritenere il risultato dell'importanza di meccanismi epigenetici nel promuovere o meno una vera attività costruttiva “epigenetica”, la quale precederebbe la fase “selettiva” nel senso che favorirebbe gli organismi più consoni a evidenziare la loro “capacità al costruttivismo” (adattamento). A oggi, non è possibile definire unilaterale-

mente il significato di *constraint*. Probabilmente, i *constraint* operano in base a una complessa rete di cause che si influenzano reciprocamente in modo probabilmente bidirezionale e gli effetti, a loro volta, sono origine causale di altri effetti. Il modello ipotizzato si concretizza nel considerare l'interesse crescente dei "vincoli" nell'evoluzione; evoluzione che è sintetizzabile in due momenti ("costruttivo-organismico" e "selettivo-popolazionistico") i quali si alternano e interagiscono a ogni generazione o, meglio, a ogni variazione unitaria della media di generazioni presenti essendo la popolazione genetica normalmente a generazioni sovrapposte, con una tappa di olistismo continuo, il tutto operando secondo una funzionalità polare o una rete dei vari *constraint*.

21. Il DNA sarebbe solo un genoma "virtuale" nel senso che esso non specificherebbe "direttamente" il fenotipo, ma *solo il "possibile" fenotipo attrverso gli RNA*.
22. *Il "codice genetico" può essere ritenuto il "prototipo" di infiniti sistemi di vita fortemente flessibili grazie all'influenza dei fattori epigenetici* che sono identificabili con le interazioni "genotipo-ambiente". Il "sistema epigenetico" regola l'espressione dei segmenti di DNA nella fase sia *pre-trascrizionale* che *post-trascrizionale*.
23. *L'epigenetica* costituisce quella che potrebbe essere definita una "onnipervasiva collaborazione tra genotipo e fenotipo". *Uno "stato epigenetico" può essere trasmesso ai discendenti anche se con ereditarietà diversa da quella mendeliana*.
24. Gli *effetti epigenetici ereditabili* si possono identificare anche con la "epimutazione" e con la "paramutazione" (ad esempio, "superdominanza polare").
25. Il "sistema polifenico" può contribuire ad accrescere le conoscenze in merito agli effetti delle interazioni "genoma-ambiente".
26. Il comportamento "temporale", sia *qualitativo* che *quantitativo*, di ogni *segmento di DNA codificante* è funzione anche della "cronogenetica"; pertanto, tale "segmento" possiede anche una "quarta dimensione" che caratterizza la "durata" ("*chronon*") e la stabilità ("*ergon*") della sua informazione; conseguentemente, *nella variabilità della genetica formale è da considerare anche quella "temporale"*.
27. A livello sia "individuale" che "popolazionistico" si verificano *manifestazioni ripetitive* molto vicine temporalmente entro una "famiglia" (gruppo etnico legato da un certo grado di parentela) che possono essere definite "isocronismo familiare". La ritmicità dei fenomeni biologici è influenzata da fattori sia "interni" (*periodicità endogena*) che "esterni" (*sincroniz-*

zatori); queste variazioni ritmiche sono regolate e coordinate da “orologi biologici” (rilascio ormonale, sonno-veglia, ecc.); i vari “modelli di funzione biologica” costituiscono esempi validi (“accrescimento”, “ciclo riproduttivo”, “galattopoiesi” individuale e/o di popolazione, “ovodeposizione”, “sviluppo”, ecc.).

28. Il “funzionamento del DNA” può essere considerato di tipo “universale”, specialmente per quanto riguarda gli eucarioti; pertanto, i meccanismi scoperti nell’uomo di genomica “strutturale” e “funzionale” rappresentano un “modello estensibile” quasi certamente *agli animali in produzione zootecnica*, con particolare riguardo a quelli che occupano un gradino più elevato nella scala tassonomica. *Dal sequenziamento del genoma umano e dal continuo aggiornamento dei dati scaturiscono molti più interrogativi di quelli a cui si pensava di poter trovare una risposta.*
29. Il *confronto fra i genomi*, a oggi sequenziati, *sta evidenziando che organismi differenti condividono per lo più gli stessi segmenti di DNA codificanti “polipeptidi”.*
30. *L’elevato grado di omologia esistente tra i genomi lascerebbe supporre che “manifestazioni fenotipiche” anche molto complesse, proprie degli organismi che occupano un gradino elevato nella scala evolutiva, dipenderebbero non tanto dalla comparsa di “nuovi” segmenti di DNA, cioè di segmenti differenti per sequenza nucleotidica ma, probabilmente, dalla diversità nelle funzioni che gli “stessi segmenti” esplicano soprattutto nella dimensione “spazio-tempo” entro la specie.*
31. La struttura di un segmento di DNA e la sua localizzazione cromosomica influenzano il repertorio delle interazioni fra il DNA e l’ambiente (endogeno ed esogeno) cellulare conferendo contemporaneamente un’accurata sensibilità a un qualsiasi organismo vivente nei confronti dei cambiamenti ambientali.
32. L’evoluzione “concertata”, nota anche come “deriva molecolare”, costituisce uno strumento naturale in grado di favorire il funzionamento di dinamici meccanismi legati a *constraints* (vincoli) genetici. I segmenti di DNA sono anche soggetti a “riarrangiamento” a causa della trasposizione di una sequenza mobile (“trasposone”) e/o di uno *scambio cromatidico ineguale* (SCI). Un “riarrangiamento” spontaneo di segmenti di DNA si ha anche, probabilmente, con il verificarsi del fenomeno della *traslocazione robertsoniana*; quella 1;29 (*rob 1;29*), a oggi, sembrerebbe la più frequente nei bovini. Questa traslocazione comporterebbe effetti positivi su alcuni parametri nella produzione della carne: maggiore “incremento ponderale giornaliero medio”, migliore “conformazione delle masse mu-

- scolari”, miglioramento “quali-quantitativo dei tagli carnosì”.
33. Il livello di funzionalità del segmento di DNA è fondamentale ai fini della riduzione dei cosiddetti “errori di copiatura” dello stesso DNA. Effetti di questi errori possono essere la formazione di “pseudogeni” e la possibilità di aumento della variabilità sia di genotipi che di fenotipi. Uno “pseudogene” può esplicare un’attività sia di controllo dell’intensità di espressione sia di riparazione o di recupero (*back-up*) del *segmento vero di DNA codificante “polipeptideli”*.
 34. La concentrazione di trasposoni in determinate regioni del DNA (promotrici, introniche, ecc.) può esplicare un effetto sulla produzione quali-quantitativa del latte.
 35. Sempre più interessante anche ai fini *biopoietici* è la continua conoscenza della “fisiologia” dell’RNA grazie all’approccio molecolare (ad esempio, *microarray*); fisiologia che si concretizza in una vera e propria funzione “regolativa” dell’RNA. Infatti, l’uso di questa metodica e di altre sta permettendo al settore zootecnico di ampliare notevolmente la base per comprendere molti meccanismi e processi fisiologici complessi e influenzanti particolarmente una prestazione zootecnica di un soggetto allevato (*biopoiesi*, ecc.).
 36. Le risultanze acquisibili grazie alla biologia molecolare di approccio di tipo sistemico costituiscono e costituiranno sempre di più uno strumento indispensabile nell’utilizzazione della selezione o della introgressione assistita dal molecolare (SAM e IAM).
 37. La funzione regolatrice e quella codificante “polipeptide/i” di brevi segmenti di DNA influenzano sia la modalità di espressione che la conseguente variabilità di una “manifestazione fenotipica”, come ad esempio la scoperta di mutazione puntiforme.
 38. Nel vasto panorama ancora poco conosciuto del funzionamento di un genoma, la *nutrigenetica* è fortemente da considerare ai fini di incrementare l’efficienza del sistema biologico dell’animale in produzione zootecnica; *nutrigenetica* che, indiscutibilmente, è da integrare con la *farmacogenetica*.
 39. Le continue acquisizioni nel complesso funzionamento del DNA stanno contribuendo notevolmente a ottenere animali, specialmente d’interesse zootecnico, portatori di sequenze nucleotidiche: (a) “non funzionali o silenziati” che altrimenti sarebbero responsabili di anomalie e/o di patologie; questa condizione si realizza mediante: (i) *knock down: perdita funzionale* non associata all’*alterazione strutturale* (“silenziamento”) della sequenza interessata; nelle specie *bovina* e *caprina* il “silenziamento” del segmento

codificante la *proteina prionica* “normale” è responsabile di una considerevole riduzione della sintesi di detta proteina; (ii) *knock-out: perdita funzionale per alterazione strutturale* (“modificazione”) della sequenza interessata; nella specie *bovina* questa “perdita funzionale” è evidenziata dall’assenza di propagazione della *proteina prionica “patogenetica”* nel tessuto nervoso di soggetti resi *knock out* per il segmento codificante la *proteina prionica “normale”*; entrambi i metodi (*knock down* e *knock-out*) rappresentano tappe fondamentali di un percorso di profilassi nei confronti della BSE; (b) dotate di una funzione “nuova” nel senso che gli animali sono transgenici e forniscono latte e uova contenenti proteine “ex novo” funzionali *al benessere dell’uomo o dell’animale*, ad esempio molecole “farmaco”: fattori di coagulazione, proteina C, antitrombina III, fibrinogeno, albumina umana, ecc.

40. Nell’era *post-genomica*, raccordare la genomica alla proteomica diviene sempre più “*cogente*”, soprattutto alla luce della potenzialità che la stessa *integrazione “genomica-proteomica”* è in grado di offrire.
41. La proteomica, quale identificazione e caratterizzazione del “*proteoma*”, rappresenta un’importante pietra miliare dell’era *post-genomica*. Il “*proteoma*” può essere inteso come “insieme delle proteine” nonché delle *relative isoforme multiple* e dei loro *frammenti* presenti in una cellula o in un organismo o in un sistema biologico in ogni istante del proprio ciclo vitale.
42. La conoscenza del *proteoma* contribuisce, per esempio, alla: tipizzazione della biodiversità; individuazione di marcatori molecolari di “unicità” genetica (a livello di singolo individuo) e di “specificità” (a livello di prodotto) per meglio definire la “qualità nutrizionale”, “extranutrizionale” e “salutistica” di un alimento e del suo livello di “sicurezza alimentare”; identificazione di proteine “nuove”.
43. Grazie all’integrazione “genomica-proteomica” è stato acclarato che:
 - (a) l’assioma “un gene-una proteina” non è sempre valido;
 - (b) la concentrazione di una proteina non è sempre correlata in maniera semplice all’attività trascrizionale del corrispondente segmento di DNA;
 - (c) l’azione dei segmenti di DNA con “effetto pleiotropico” influenza molteplici manifestazioni fenotipiche, tra cui, ad esempio, l’accrescimento e lo sviluppo muscolare;
 - (d) l’approccio di “genomica funzionale” non riesce a fornire indicazioni sulle modificazioni che avvengono “a valle della trascrizione”.
44. Sulla base delle precedenti considerazioni, si arguisce che una cellula non ha un “proteoma” unico e costante nel “tempo” e nello “spazio”; pertanto, sarebbe preferibile parlare di tanti “proteomi” quante sono le *differenti con-*

dizioni cellulari e le diversità cellulari; un “proteoma completo” di un organismo andrebbe immaginato come un “insieme globale di tutti i proteomi cellulari” in quell’istante in un determinato microambiente.

45. L’“interazione genoma-ambiente interno e/o ambiente esterno” è responsabile della genesi di un proteoma “dinamico” e “complesso”.
46. La *complessità* proteica è sintetizzabile in: “polimorfismo” per la presenza di *varianti proteiche* quali espressione di mutazioni a carico di *loci* (associati o non); “versatilità” (variabilità funzionale); “flessibilità” (variabilità strutturale). Queste proprietà, le ultime due in particolare, consentono alle proteine di comunicare tra loro oltre che con altre biomolecole, nonché di assolvere a numerose funzioni: *catalitica, immunitaria, metabolica, protettiva, regolatrice, strutturale, trasportatrice*, ecc.
47. Lo studio della “funzione biologica” di una proteina è oggetto della *proteomica funzionale* che permette di: *individuare la funzione biologica di una proteina ancora sconosciuta, comprendere la funzione biologica di una proteina nota, definire i meccanismi molecolari che regolano le funzioni cellulari più importanti, identificare le interazioni “proteina-proteina” nella formazione di complessi funzionali*.
48. L’*approccio proteomico* alla “biologia riproduttiva” apre ampie prospettive; ad esempio, potrebbe aiutare a risolvere alcuni problemi importanti di *infertilità sia maschile che femminile* o taluni problemi derivanti dall’*interazione del materiale seminale con i vari “tratti” dell’apparato genitale femminile*, nonché *predire la fertilità dei “giovani tori” da includere nel “progeny test”, permettendo una maggiore accuratezza nello scarto*.
49. Nel settore *agro-alimentare*, le *potenzialità* e le *prospettive* offerte dalla *proteomica* stanno contribuendo a fornire approfondite conoscenze a livello molecolare dei “peculiari nutrienti” caratterizzanti uno specifico alimento. Tali nutrienti fungono da veri e propri “marcatori biochimici” che, unitamente ad altri “parametri di qualità” (fisici, chimico-fisici, microbiologici, fisiologici e chimici), contribuiscono a: (a) individuare le “specificità bioterritoriali”; (b) definire le caratteristiche “nutrizionali”, “extranutrizionali” e “salutistiche”; (c) sviluppare test analitici validanti l’“autenticità e l’“originalità” dei prodotti alimentari”; (d) individuare lo stato di “normalità” delle sequenze delle varie fasi di una *filiera produttiva*; pertanto, questi “biomarcatori” contribuiscono notevolmente all’applicazione del Regolamento dell’Unione Europea *Health and Nutrition Claims* che entrerà in vigore dal 1 luglio 2007.
50. La proteomica sta contribuendo notevolmente alla conoscenza dei com-

plexi meccanismi molecolari influenzanti l'accrescimento e lo sviluppo muscolare, specialmente in relazione alle caratteristiche qualitative della carne in quanto la variazione del metabolismo e del biochimismo muscolare influenza la "degradomica" proteica, che è funzione sia del *tipo genetico* che del "diagramma" del flusso produttivo.

51. Nella produzione latte, l'approccio proteomico permette di *individuare* il grado di variabilità dei *loci* lattoproteici, di conoscere meglio la relazione tra "polimorfismo" e "qualità casearia" e "non" del latte", di *identificare* i componenti il "caseoma" quale espressione delle attività enzimatiche.
52. A oggi, un limite alla conoscenza del *proteoma* degli animali di interesse zootecnico è la scarsa presenza delle specifiche proteine nei *database* utilizzati come riferimento per l'identificazione.
53. La *richiesta di "alimenti" funzionali al "benessere" è sempre crescente*. Nell'ambito del miglioramento genetico, per far sì che questa domanda sia soddisfatta, l'individuazione di nuovi obiettivi di selezione può apportare un grande contributo. *Il processo di rinnovamento degli indici di selezione, volto a introdurre manifestazioni fenotipiche inerenti alla "funzione", è in atto*. Il conseguimento di questi obiettivi, tuttavia, necessita di continue conoscenze di base relative a parametri genetici dei "caratteri" considerati e all'effetto dei principali fattori ambientali che agiscono sulla variabilità degli stessi.
54. Le nuove frontiere della selezione diventeranno sempre più ampie, ma anche più complesse; non è più rinviabile la valutazione dell'"efficienza biologica" dell'animale, variabile in relazione alle peculiari caratteristiche del microambiente di allevamento.
55. Il continuo innovarsi delle procedure di indagine della sostanza vivente, grazie specialmente all'apporto della bioinformatica, rappresenterà uno strumento "insostituibile" per scoprire le basi infinitesime della vita relazionale dei componenti la cellula e della cellula con tutte le altre cellule costituenti un organismo vivente. Questi infiniti scambi di informazione si realizzano variabilmente a seconda del contesto microambientale in cui l'essere vivente è inserito e opera; pertanto, si ha un vero e proprio sistema cibernetico caratterizzato da una infinità funzionale di meccanismi "biochimico-energetici" di "*feed-back*" o di "retroazione".
56. L'imprenditore zootecnico dovrà raggiungere sempre di più livelli "culturali" di un vero e proprio "pensatore strategico" capace di percepire e di interiorizzare le innovazioni informatiche in grado di guidarlo in un contesto rivolto a un incremento continuo di "complessità" cognitiva di livello specialmente biomolecolare quali-quantitativo; conseguente-

mente, intima deve essere l'integrazione fra le due variabili (qualitativa e quantitativa) caratterizzanti la fisiologia dei segmenti di DNA codificanti "polipeptide/i" o "non". Infatti, la "genetica quantitativa" e la "genetica molecolare" altro non sono che componenti di una stessa strategia produttiva; pertanto, la loro integrazione è sempre più da perseguire per raggiungere validi e dinamici traguardi, variabili temporalmente e spazialmente, di biopoiesi zootecniche.

57. L'evoluzione della conoscenza del *genoma*, del *trascrittoma*, del *proteoma*, del *glicoma*, del *lipidoma* e del *metaboloma*, sollecita, in modo cogente, una visione del MGAPZ in un quadro d'insieme ove gli aspetti abiologici, biologici e umani siano fortemente incorporati dal "sistema allevatoriale"; in questa visione l'autocoscienza dell'allevatore deve costituire sempre più elemento *fondante* per incrementare la sua capacità di conoscenza e di trasferimento di questa al campo imprenditoriale.
58. Parafrasando S. Agostino si può a buon diritto affermare che la nostra mente, che è limitata, mai potrà comprendere integralmente tutte le informazioni presenti in una "scatola nera" identificabile con una cellula che è da considerare un'entità infinita caratterizzata da una "irriducibile complessità".
59. Piace concludere con la riflessione espressa da uno di noi qualche anno fa: "è innegabile che si è di fronte a una continua "cascata di certezze documentate" e a un "fiume carsico di evidenze scientifiche".

ABSTRACT

Genetic improvement of *biopoiesis* (galactopoiesis, miopoiesis etc.) may not leave knowledge in progress in the field of functional genomics (epigenomics) and functional proteomics out of consideration. This knowledge has an increasing fundamental role especially if the phenotypic aspect of the product quality (content of nutritional, extranutritional and health biomolecules) in its different effects on consumer welfare is considered. Any consumer has to be considered more and more as 'co-producer'.

The authors point out that the "complexity" of the phenotypic expression "productivity" suggests a revision in the considering the phenotype, which is a product of a *systemic activity* of DNA. The DNA segments 'coding polypeptide/s' ('genes') or 'non coding polypeptide/s' have to be considered as irreplaceable components of a true 'cybernetic network'.

In the regulation of a molecular-cellular-biological mechanism the binomial 'environment – organism' constitutes a more and more indissoluble unit. The 'construction' of a phenotype is realized in accordance with several levels of positive and negative retroaction, strongly influenced by epigenetic phenomena recognizable with 'environment - genotype' interactions. The 'active RNA' confers an additional endowment of 'endogenous epigenetic information' to genetic information able to increase the variability of a phenotypic expression. The continuous knowledge about 'RNA physiology' possible

thanks to functional genomics approach (for example *microarray*) is increasingly interesting also in order to improve biopoiesis; this physiology is realized concretely through a true 'regulative' function of RNA.

Likewise other important genetic phenomena (dominance, epistasis, pleiotropy, etc.), the understanding of 'molecular mechanisms' underlying DNA expression according to variability of environmental conditions has still many gaps. An integration between formal and molecular genetics is necessary especially to improve acquisitions about the causes of phenotypic plasticity and its operative use. An 'omic' approach based on integration among genomics, epigenomics, transcriptomics, proteomics, lipidomics, glycomics, flavouromics and metabolomics might contribute to understand the various mechanisms with which genotype 'builds' phenotype. Thanks to molecular biology applied in systemic key, it is possible to acquire 'strategic molecular biomarkers' useful for molecular assisted selection and introgression (MAS and MAI). The marker biomolecules play an increasing role for poiesis tracking and effective safety estimation. The insertion of some biomarkers in proper selection indices may contribute to obtain a zootechnical production under the perspective of higher income for breeder, higher health value for consumer and for a continuous improvement of a 'life system'.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS M.D., KELLEY J.M., GOCAYNE J.D., DUBINICK M., POLYMERPOULOS M.H., XIAO H., MERRIL C.R., WU A., OLDE B., MORENO R.F., KERLAVAGE A.R., MCCOMBIE W.R., VENTER J.C. (1991): *Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project*, «Science», 252, pp. 1651-1656.
- ADDEO F., CHIANESE L., SACCHI R., SPAGNA MUSSO S., FERRANTI P., MALORNI A. (1994): *Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese*, «J. Dairy Res.», 61, pp. 365-374.
- AJMONE MARSAN P. (2006): *La tecnologia microarray per lo studio dei profili di espressione genica nelle razze suine: il fegato come sistema modello per il confronto tra disegni sperimentali*, Seminario progetto FIRB "Identificazione e analisi dell'espressione dei geni nel suino per lo studio e il miglioramento della produzione e della qualità della carne", Bologna, 27 ottobre 2006.
- ALEANDRI R. (1989): *I bovini da latte*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 129-136.
- ALEANDRI R., BUTTAZZONI L.G., SCHNEIDER J.C., CAROLI A., DAVOLI R. (1990): *The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability*, «J. Dairy Sci.», 73, pp. 241-255.
- ALLEMAN M., SIDORENKO L., MCGINNIS K., SESHADRI V., DORWEILER J.E., WHITE J., SIKKINK K., CHANDLER V.L. (2006): *An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize*, «Nature», 442, pp. 295-298.
- AMOSOVA O., COULTER R., FRESCO J.R. (2006): *Self-catalyzed site-specific depurination of guanine residues within gene sequences*, «PNAS», 103 (12), pp. 4392-4397.
- ANDERSON N.G., ANDERSON N. L. (1981): *Photo/essay. The human protein index*, «JAMA», 246 (22), pp. 2620-2621.
- ASHMORE C.R., ADDIS P.B., DOERR L. (1972): *Postnatal development of muscle fibre types in domestic animal*, «J. Anim. Sci.», 34, pp. 37-41.
- BAATZ M., WAGNER, G.P. (1997): *Adaptive inertia caused by hidden pleiotropic effect*, «Theor. Popul. Biol.», 51, pp. 49-66.
- BAEKER R., HAEBEL S., SCHLATTERER K., SCHLATTERER B. (2002): *Lipocalin-type prosta-*

- glandin D syntase in milk: a new biomarker for bovine mastitis*, «Prostaglandins & Other Lipid Mediators», 67 (1), pp. 75-88.
- BAI Q., MCGILLIVRAY C., DA COSTA N., DORNAN S., EVANS G., STEAR M.J., CHANG K.C. (2003): *Development of a porcine skeletal muscle cDNA microarray: analysis of differential transcript expression in phenotypically distinct muscles*, «BMC Genomics», 4, 8, <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/4/8>.
- BAILEY A.J., ENSER M.B., DRANSFIELD E., RESTALL D.J., AVERY N.C. (1982): *Muscle and adipose tissue from normal and double muscle cattle: Collagen types, muscle fiber diameter, fat cell size and fatty acid composition and organoleptic properties*, in King J.W.B., Menissier F. (Eds.), *Muscle hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production*, «Martinus Nijhoff», the Hague, 178.
- BALDWIN J.M. (1986): *A new factor in evolution*. «Am. Nat.», 30, pp. 441-541.
- BALTER M. (2000): *Was Lamarck just a little bit right?*, «Science», 288, p. 38.
- BAND M.R., OLMSTEAD C., EVERTS R.E., LIU Z.L., LEWIN H.A. (2002): *A 3800 gene microarray for cattle functional genomics: comparison of gene expression in spleen, placenta, and brain*, «Anim. Biotechnol.», 13, pp. 163-172.
- BAND M.R., EVERTS R.E., LIU Z.L., MORIN D.E., PELED J.U., RODRIQUEZ-ZAS S.L., LEWIN H.L. (2003): *Gene expression profiling of 17 cattle tissues reveals unique patterns related to tissue function*, Abstracts for the Plant and Animal XI Conference, p. 745.
- BARBIERI M. (1981): *The ribotype theory on the origin of life*, «J. Theor. Biol.», 91, pp. 545-601.
- BARBIERI M. (1998): *I codici organici. Il meccanismo chiave della macroevoluzione*, in *I nuovi paradigmi della biologia*, «Sistema Naturae», 1, pp. 9-40.
- BARTOLETTI A., TERRANOVA F. (2002): *I geni della longevità*, «Il Nuovo Medico d'Italia», 6, p. 3.
- BEHE M.J. (1996): *Intervista rilasciata al «The New York Times»*, 29 ottobre.
- BEREZIKOV E., GURUYEV V., VAN DE BELT J., WIENHOLDS E., PLASTERK R.H.A., CUPPEN E. (2005): *Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes*, «Cell», 120 (1), pp. 21-24.
- BERNABUCCI U., RONCHI B., BASIRICÒ L., PIRAZZI D., RUECA F., LACETERA N., NARDONE A. (2002): *Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows*, «Anim. Res.», 51, pp. 25-33.
- BERNABUCCI U., RONCHI B., BASIRICÒ L., PIRAZZI D., RUECA F., LACETERA N., NARDONE A. (2004): *Abundance of mRNA of Apolipoprotein B100, Apolipoprotein E, and Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Liver from Periparturient Dairy Cows*, «J. Dairy Sci.», 87, pp. 2881-2888.
- BERNABUCCI U., BASIRICÒ L., LACETERA N., MORERA P., RONCHI B., ACCORSI P.A., SEREN E., NARDONE A. (2006): *Photoperiod Affects Gene Expression of Leptin and Leptin Receptors in Adipose Tissue from Lactating Dairy Cows*, «J. Dairy Sci.», 89, pp. 4678-4686.
- BERNS K., HIJMAN E.M., MULLENDERS J., BRUMMELKAMP T.R., VELDS A., HEIMERIKX M., KERKHOVEN R.M., MADIREDO M., NIJKAMP W., WEIJELT B., AGAMI R., GE W., CAVET G., LINSLEY P.S., BEIJERSBERGEN R.L., BERNARDS R. (2004): *A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway*, «Nature», 428, pp. 431-437.
- BERTALANFFY L. VON (1940): *Der organismus als physikalisches system betrachtet*, «Die Naturwissenschaften», 28.
- BERTALANFFY L. VON (1971): *The history and status of general system theory*, in G.J. Klir, *Trends in general system theory*, «Wiley», New York.
- BETTINI T.M. (1955): *Il miglioramento degli animali*, «G. Barbera», Firenze, p. 498.

- BETTINI T.M. (1962): *La selezione fenotipica nelle popolazioni a generazioni sovrapposte*, «Ann. Fac. Agr.», Portici, Serie III, 27, p. 313.
- BETTINI T.M. (1963): *La selezione fenotipica nelle popolazioni a generazioni sovrapposte*, «Genetica Agraria», 16, pp. 365-392.
- BETTINI T.M. (1969): *L'animale uomo e gli altri animali: gli automi biologici*, «Prod. Anim.», 8 (3), pp. 233-255.
- BETTINI T.M. (1970): *Genetica ed efficienza produttiva nei bovini da latte*, «Prod. Anim.», 9, pp. 229-259.
- BETTINI T.M. (1972): *Concezioni moderne sulla validità dei cosiddetti gruppi etnici, anche ai fini dello sviluppo zootecnico*, in *Riproduzione animale e fecondazione artificiale*, «Edagricole», Bologna, pp. 23-44.
- BETTINI T.M. (1976): citato da Matassino D. (1978).
- BETTINI T.M. (1977): citato da Matassino D. (1978).
- BETTINI T.M. (1988): *Elementi di scienza delle produzioni animali*, «Edagricole», Bologna.
- BETTINI T.M., MATASSINO D. (1961): *Il ciclo di sostituzione dei genitori, la successione delle generazioni e l'età media dei genitori alla nascita dei figli*, «Genetica Agraria», 13, p. 121.
- BETTINI T.M., MATASSINO D. (1963): *Statistiche di generazione nelle piccole popolazioni a generazioni sovrapposte. VI: Confronto fra le popolazioni di 20, 40, 60, 80 e 100 femmine*, «Prod. Anim.», 2, pp. 167-202.
- BETTINI T.M., FERRARA L. (1970): *L'allevamento e le produzioni animali come "sistema"*, «Prod. Anim.», 9 (4), pp. 277-317.
- BETTINI T.M., FERRARA L., PROTO V., MATASSINO D. (1970): *Galattopoiesi: condizioni di stabilità e deformazioni*, «Prod. Anim.», 9 (4), pp. 319-324.
- BETTINI T.M., PROTO V., MATASSINO D., FERRARA L. (1969): *Funzioni galattopoietiche e dietologiche in una popolazione di 400 vacche da latte*, «Prod. Anim.», 8 (2), pp. 139-192.
- BETTINI T.M., MATASSINO D., NARDONE A., BOTTONI S., BORDI A. (1968): *L'individuazione delle aziende da latte in provincia di Cremona*, «Prod. Anim.», 7 (4), pp. 301-324.
- BEVILACQUA C., FERRANTI P., GARRO G., VELTRI C., LAGONIGRO R., LEROUX C., PIETROLÀ E., ADDEO F., PILLA F., CHIANESE L., MARTIN P. (2002): *Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new alpha (s1)-casein variant found in the goat species*, «Eur. J. Biochem.», 269 (4), pp. 1293-1303.
- BIDWELL C.A., KRAMER L.N., PERKINS A.C., HADFIELD T.S., MOODY D.E., COCKETT N.E. (2004): *Expression of PEG I and PEG II AS transcripts in normal and callipyge sheep*, «BMC Biology», 2, 17, <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/2/17>.
- BOARDMAN P.E., SANZ-EZQUERRO J., OVERTON I.M., BURT D.W., BOSCH E., FONG W.T., TICKLE C., BROWN W.R., WILSON S.A., HUBBARD S.J. (2002): *A comprehensive collection of chicken cDNAs*, «Curr. Biol.», 12, pp. 1965-1969.
- BOCCARD R. (1981): *Facta and reflexions on muscular hypertrophy in cattle: Double muscling or Culard*, «Meat Sci.», 2, pp. 1-28.
- BOETTCHER P.J., CAROLI A., CHESSA S., BUDELLI E., STELLA A., CANAVESI F., GHIROLDI S., PAGNACCO G. (2004): *Effects of casein haplotypes on production traits in Italian Holstein and Brown Cattle*, «J. Dairy Sci.», 87, pp. 4311-431.
- BOULANGER A., GROSCLAUDE F., MAHÈ M.F. (1984): *Polymorphisme des caséines $\alpha s1$ et $\alpha s2$ de la chèvre (*Capra hircus*)*, «Genet. Sel. Evol.», 16, pp. 157-176.
- BOULEY J., CHAMBON C., PICARD B. (2005): *Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*, «Proteomics», 4, pp. 1811-1824.
- BOUTON P.E., HARRIS P.V., SHORTHORSE W.R., ELLIS R.W., PHILLIPS D. (1982): *Comparison of some properties of beef from animals homozygous or heterozygous for muscular*

- hypertrophy*, «Meat Sci.», 6, p. 309.
- BRENGUES M., TEIXEIRA D., PARKER R. (2005): *Movement of eucaryotic mRNAs between polyosomes and cytoplasmic processing bodies*, «Science», 310, pp. 486-489.
- BRIGNON G., MAHÉ M.F., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B. (1989): *Sequence of caprine alpha s1-casein and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level, alpha s1-Cn A, B and C*, «Protein Seq. Data Anal.», 2 (3), pp. 181-188.
- BUFANO G. (1989): *Gli ovini da carne*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 151-158.
- BURNSIDE J., NEIMAN P., TANG J., BASOM R., TALBOT R., ARONSAJN M., BURT D., DELROW J. (2005): *Development of a cDNA array for chicken gene expression analysis*. B, «Genomics», 6 (1), 13, <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/6/13>.
- CAIRNS J., OVERBARGH J., MILLAR S. (1988): *The origin of mutants*, «Nature», 335, pp. 142-145.
- CARMELL M.A., ZHANG L., CONKLIN D.S., HANNON G.S., ROSENQUIST T.A. (2003): *Germline transmission of RNAi in mice*, «Nature Struct. Biol.», 10 (2), pp. 91-92.
- CARREL L., WILLARD H. (2005): *X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked genes expression in female*, «Annu Rev. Genomics Hum. Genet.», 6, pp. 69-92.
- CARSON J.A., NETTLETON D., REECY J.M. (2001): *Differential gene expression in rat soleus muscle during early work induced hypertrophy*, «FASEB J.», 16, pp. 207-209.
- CARSON P.E. ET AL. (1956): citato da Evans W. e Relling M.V. (1999).
- CARTWRIGHT C.T. (1982): *Application of system analysis to the genetics of beef cattle production systems*, Proc. II World Congress Genetics Applied Livestock Production, Ed. Garsi, Madrid.
- CARTWRIGHT C.T., ANDERSON F.M., BUCK N.G., NELSEN T.C., TRAIL J.M.C., PRACTHETT D., SANDERS C. (1982): *Systems modelling in cattle production*, «World Anim. Rev.», 41, pp. 40-46.
- CASABIANCA F., MATASSINO D. (2006): *Local resources and typical animal product*, Proc. 6th International Livestock Farming System Symposium, Benevento, 26-29 agosto 2003, in Rubino R., Sepe L., Dimitriadou A., Gibon A. (Eds.), *Livestock farming systems – Product Quality based on local resources leading to improved sustainability*, «EAAP», Publ. 118, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 9-26.
- CASTAGNA A., CAPOSTRINI N., FARINAZZO A., ZANUSSO G., MONACO S., RIGHETTI P.G. (2002): *Comparative two-dimensional mapping of prion protein isoforms in human cerebrospinal fluid and central nervous system*, «Electrophoresis», 23 (2), pp. 339-346.
- CASU S. (1989): *Gli ovini da latte*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 143-150.
- CAVALLETTO M., GIUFFRIDA M.G., FORTUNATO D., GARDANO L., DALLAVALLE G., NAPOLITANO L., GIUNTA C., BERTINO E., FABRIS C., CONTI A. (2002): *A proteomic approach to evaluate the butyrophilin gene family expression in human milk fat globule membrane*, «Proteomics», 2 (7), pp. 850-856.
- CAVALCHINI L., CEROLINI S. (1989): *Polli e altri volatili*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 191-197.
- CECH T.R., ZAUG A.J., GRABOWSKI P.J. (1981): *In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence*, «Cell», 27, pp. 487-496.
- CERIOTTI G., CHessa S., BOLLA P., BUDELLI E., BIANCHI L., DURANTI E., CAROLI A. (2004): *Single Nucleotide Polymorphisms in the ovine casein genes detected by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism*, «J. Dairy Sci.», 87, pp. 2606-2613.
- CHEN J.F., MANDEL E.M., THOMSON J.M., WU Q., CALLIS T.E., HAMMOND S.M., CONLON F.L., WANG D.Z. (2005): *The role of microRNA 1 and microRNA-133 in*

- skeletal muscle proliferation and differentiation*, «Nat. Genet.», 38, pp. 228-233.
- CHESSA S., BUDELLI E., GUTSCHER K., CAROLI A., ERHARDT G. (2003): *Simultaneous Identification of Five k-Casein (CSN3) Alleles in Domestic Goat by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism*, «J. Dairy Sci.», 86, pp. 3726-3729.
- CHESSA S., CASTIGLIONI B., CERIOTTI G., DE BELLIS G., PAGNACCO G. (2005): *Micro-array analysis applied to the study of milk protein loci in cattle*, Proc. of the ASPA 16th Congress, Torino, 28-30 giugno 2005, pp. 28-30.
- CHEVERUD J.M. (1984): *Quantitative genetics and developmental constraints on evolution by selection*, «J. Theor. Biol.», 110, pp. 155-172.
- CHEVERUD J.M. (1996): *Developmental integration and the evolution of pleiotropy*, «Am. Zool.», 36, pp. 44-50.
- CHIANESE L., GARRO G., FERRANTI P., MALORNI A., ADDEO F., RABASCO A., PONS P.M. (1995): *Discrete phosphorylation generates the electrophoretic heterogeneity of ovine β -casein*, «J. Dairy. Res.», 62, pp. 89-100.
- CHIANESE L., PORTOLANO B., TRONCONE E., PIZZOLONGO F., FERRANTI P., ADDEO F., ALICATA M.L., PILLA F., CALAGNA G. (2000): *The quality of Girgentana goat milk*, Proc. of 7th International Conf. on Goats, France, pp. 15-21.
- CHIANESE L., GARRO G., NICOLA M.A., MAURIELLO R., FERRANTI P., PIZZANO R., CAPPUCCIO U., LAEZZA P., ADDEO F., RAMUNNO L., RANDO A., RUBINO R. (1993): *The nature of β -casein heterogeneity in caprine*, «Lait», 73, pp. 533-547.
- CICOGLA M. (1989): *I bovini da carne*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 137-142.
- CLOP A., MARCQ F., TAKEDA H., PIROTTIN D., TODOIR X., BIBÈ B., BOUIX J., CAIMENT F., ELSÉN J.M., EYCHENNE F., LARZUL C., LAVILLE E., MEISH F., MILENKOVIC D., TOBIN J., CHARLIER C., GEORGES M. (2006): *A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep*, «Nat. Genet.», 38, pp. 813-818.
- COCKETT N.E., JACKSON S.P., SHAY T.L., NIELSEN D., MOORE S.S., STEELE M.R., BARENDSE W., GREEN R.D., GEORGES M. (1994): *Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep (Ovis aries) using bovine DNA markers*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91 (8), pp. 3019-3024.
- CONTE G., MELE M., CASTIGLIONI B., SERRA A., DEL VIVA M., CHESSA S., PAGNACCO G., SECCHIARI P. (2006): *Relationship between bovine SCD polymorphism locus and mammary gland resaturation activity*, Proc. of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, august, pp. 13-18.
- COSENZA G., PAUCIULLO A., GALLO D., DI BERARDINO D., RAMUNNO L. (2005): *A Ssp1 PRC-RFLP detected a silent allele at the goat CSN2 locus*, «J. Dairy Res.», doi: 10.1017.
- CREWS D.H., NKUMAH J.D., YU J., MOORE S.S. (2004): *Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin gene with feedlot and carcass characteristics of crossbred steers*, «Can. J. Anim. Sci.», 84, pp. 749-750.
- CRISÀ A., MARCHITELLI C., SAVARESE M.C., VALENTINI A. (2003): *Sequence analysis of myostatin promoter in cattle*, «Cytogenet. Genome Res.», 102, pp. 48-52.
- CROW J.F. (1974): citato da Kimura M. (1980).
- CUBAS P., VINCENT C., COEN E. (1999): *An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry*, «Nature», 401, pp. 157-161.
- CUNNINGHAM E.P. (1974): *Breeding goals for beef cattle*, «Ann. Genet. Sel. Anim.», 6, pp. 219-226.
- CUNSOLO V., MUCCILLI V., SALETTI R., MARLETTA D., FOTI S. (2006): *Detection and*

- characterization by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry of two truncated goat α 2-caseins*, «Rapid Commun. Mass Sp.», 20, pp. 1061-1070.
- CUNSOLO V., GALLIANO F., MUCCILLI V., SALETTI R., MARLETTA D., BORDONARO S., FOTI S. (2005): *Detection and characterization by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry of a goat β -casein associated with a CSN2 null allele*, «Rapid Commun. Mass Sp.», 20, pp. 2943-2949.
- DALL'OLIO S., DAVOLI R., RUSSO V. (1989): *A New Goat β -Casein Variant*, «Sci. E Tecn. Latt. Cas.», 40, pp. 24-28.
- DAMIANI G., FERRETTI L., GAMBERI C., SGARAMELLA V. (1989): *Le basi molecolari del miglioramento genetico*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 23-33.
- DAMIANI G., PANELLI S., DELLA FRANCA P. (2002): *Il ritmo della vita: l'iperciclo metabolico*, «Sistema Naturae», 4, pp. 279-320.
- DARRÉ R., QUEINNEC G., BERLAND H.M. (1972): *La translocation 1;29 des bovins*, «Revue Méd. Vét.», 123, p. 477.
- DAVIDSON E.H. (2001): *Genomic regulatory systems*, Academic Press, San Diego.
- DAVOLI R., ZAMBONELLI P., BIGI D., FONTANESI L., RUSSO V. (1999): *Analysis of expressed sequence tags of porcine skeletal muscle*, «Gene», 233, pp. 181-188.
- DAVOLI R., DALL'OLIO S., RUSSO V. (1990): *Evidence supporting attribution of ovine «welsh» variant TO α_{s1} -Casein*, «Sci. e Tec. Latt. Cas.», 41 (3), supplemento, pp. 327-333.
- DAVOLI R., FONTANESI L., ZAMBONELLI P., BIGI D., GELLIN J., YERLE M., MILC J., BRAGLIA S., CENCI V., CAGNAZZO M., RUSSO V. (2002): *Isolation of porcine expressed sequence tags for the construction of a first genomic transcript map of the skeletal muscle in pig*, «Anim. Genet.», 33, pp. 3-18.
- DE BELLIS L., GONZALI S., ALPI A., HAYASHI H., HAYASHI M., NISHIMURA M. (2000): *Purification and characterization of a novel Pumpkin Short-Chain Acyl-Coenzyme A Oxidase with structural similarity to Acyl-Coenzyme A Dehydrogenases*, «Plant Physiol.», 123 (1), pp. 327-334.
- DE LOS RIOS P., BEN-ZVI A., SLUTSKY O., AZEM A., GOLOUBINOFF P. (2006): *Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling*, «PNAS», 103 (16), pp. 6166-6171.
- DE LOS SANTOS et al. (2005): citato da Golding M.C. et al. (2006).
- DEVEAUX V., PICARD B., BOULEY J., CASSAR-MALEK I. (2003): *Location of myostatin expression during bovine myogenesis in vivo and in vitro*, «Reprod. Nutr. Dev.», 43, pp. 527-542.
- DIATCHENKO L., LAU Y.F., CAMPBELL A.P., CHENCHIK A., MOQUADAM F., HUANG B., LUKYANOV S., PUKYANOV K., GURSKAY N., SVERDIOV E.D., SIEBERT P.D. (1996): *Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries*, «PNAS», 93, pp. 6025-6030.
- DI LUCCIA A., MAURIELLO R., ADDEO F. (1986): *Identification of caprine casein variants by electrophoretic techniques*, «Protides Biol. Fluids», 34, pp. 903-905.
- DI LUCCIA A., PICARIELLO G., CACACE G., SCALONI A., FACCIA M. (2005): *Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry cured hams*, «Meat Sci.», 69, pp. 479-491.
- DI LUCCIA A., MAURELLI L., ALVITI G., LIUZZI V., CAPUTI JAMBRENGHI A. (2002): *Effect of the technological processing on residual enzymatic activity of cathepsins in typical italian hams*, Proc. of the 48th International Congress of Meat Science and Technology, Roma, 25-30 agosto, I, pp. 390-391.
- DI LUCCIA A., DI MARTINO V., CASSOTTA F., TRANI A., VARRICCHIO G., FACCIA M., SPAGNA MUSSO S., MATASSINO D. (2004): *A proteomic approach of proteolysis study in fermented dry cured sausages of buffalo meat*, Abstracts for 1st IPSO Congress, Verona,

- 27-28 maggio 2004, Poster n, p. 100.
- DOUMIT M.E., KOOHMARAIE M. (1999): *Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle*, «J. Anim. Sci.», 77, pp. 1467-1473.
- DRANSFIELD E., MARTIN J.F., BUCHART S., ABOUELKARAM S., LEPETIT J., COULIOLI J., JURIE C., PICARD B. (2003): *Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls*, «Anim. Sci.», 76, pp. 387-399.
- DULBECCO R. (2002): *Oltre il genoma: il Proteoma*, «ARS», 84, pp. 26-29, Dossier.
- EGITO A.S., MICLO L., LOPEZ C., ADAM A., GIRARDET J.M., GAILLARD J.L. (2002): *Separation and characterization of mares' milk alpha(s1)-, beta-, kappa-caseins, gamma-casein-like, and proteose peptone component 5-like peptides*, «J. Dairy Sci.», 85 (4), pp. 697-706.
- EIZINGER A., JUNGBLIET B., SOMMER R.J. (1999): *Evolutionary change in the functional specificity of genes*, «Trends Genet.», 15, pp. 197-200.
- ENARD W., PRZEWORSKI M., FISHER S.E., LAI C.S.L., WIEBE V., KITANO T., MONACO A., PÀABO S. (2002): *Molecular evolution of FOX2, a gene involved in speech and language*, «Nature», 418, pp. 869-872.
- ERHARDT G. (1989): *κ -Kasein in rindermilch-nachweis weiterer allele (kCN E) in verschiedener rassen*, «J. Anim. Breed. Gen.», 106, pp. 225-231.
- ERNST C.W., RILINGTON V.D., RANEY N.E., YAO J., SIPKOVSKY S.S., SAAMA P.M., TEMPELMAN R.J., COUSSENS P.M. (2002): *Use of cDNA microarrays to detect differentially expressed genes in developing pig skeletal muscle*, Abstracts for the Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference, January 2002, p. 702.
- EVANS W., RELLING M.V. (1999): *Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics*, «Science», 286, pp. 487-491.
- EVANS D.J., WHEELER D.E. (2000): *Expression profiles during honeybee caste determination*, genomebiology.com/2000/2/1/research/0001.1.
- EWERT K.K., EVANS H.M., ZIDOVSKA A., BOUXSEIN N. F., AHMAD A., SAFINYA C.R. (2006): *A Columnar Phase of Dendritic Lipid-Based Cationic Liposome-DNA Complexes for Gene Delivery: Hexagonally Ordered Cylindrical Micelles Embedded in a DNA Honeycomb Lattice*, «JACS», 128 (12), pp. 3998-4006.
- FALASCHINI A.F., BUTTAZZONI L., ALBANO A.G., TROMBETTA M.F., MOIOLI B. (1990): *Risultati di uno studio sugli effetti della traslocazione 1;29 nella razza bovina Romagnola*, «Taurus», 6, pp. 77-85.
- FABBRI G. (1989): *I libri genealogici*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 123-127.
- FERRANDO R., VAZ PORTUGAL A. (1974): citato da Matassino D. (1978).
- FERRANTI P., SCALONI A., CAIRA S., CHIANESE L., MALORNI A., ADDEO F. (1998): *The primary structure of water buffalo alpha(s1)- and beta-casein identification of phosphorylation sites and characterization of a novel beta-casein variant*, «J. Protein Chem.», 17 (8), pp. 835-844.
- FERRETTI, L., LEONE P., SGARAMELLA V. (1990): *Long range restriction analysis of the bovine casein genes*, «Nucleic Acids Res.», 18, pp. 6929-6833.
- FIEMS L.O., HOOFF J.V., UYTTERHAEGEN L., BOUCQUE C.V., DEMEYER D. (1995): *Comparative quality of meat from double muscled and normal beef cattle*, in Ouali A., Demeyer D., Smulders F. (Eds.): *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*, ECCEAMST Series, Utrecht, pp. 381-391.
- FIRE A., XU S., MONTGOMERY M.K., KOSTAS S.A., DRIVER S.E., MELLO C.C. (1998): *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*, «Nature», 391, pp. 806-811.
- FONTANESI L. (2006): *Identificazione e analisi di SNP in geni candidati per la qualità e la*

- produzione della carne suina*, Seminario progetto FIRB “*Identificazione e analisi dell'espressione dei geni nel suino per lo studio e il miglioramento della produzione e della qualità della carne*”, Bologna, 27 ottobre 2006.
- FONTANESI L., RUSSO V., SCOTTI E., ZAMBONELLI P., DALL'OLIO S., BIGI D., CANAVESI F., LIPKIN E., SOLLER M., DAVOLI R. (2006): *Analysis of bovine chromosome 20 for QTL affecting milk production and reproductive traits applying a selective milk DNA pooling strategy in the italian holstein population*, Proc. of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, August, pp. 13-18.
- FOX ET AL. (1992): citato da Roncada P. et al. (2002).
- GAIASCHI A., BERETTA B., POIESI C., CONTI A., GIUFFRIDA M.G., GALLI C.L., RESTANI P. (2000): *Proteolysis of β -Casein as a Marker of Grana Padano Cheese Ripening*, «J. Dairy Sci.», 84, pp. 60-65.
- GALLIANO F., SALETTI R., CUNSOLO V., FOTI S., MARLETTA D., BORDONARO S., D'URSO G. (2004): *Identification and characterization of a new β -casein variant in goat milk by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*, «Rapid Commun. Mass Spectrom.», 18, pp. 1-11.
- GALVANI M. ET AL. (2000): citato da Roncada P. et al. (2002).
- GAZZANIGA M. (2006): *Are human brains unique?*, The future of Science Conference – Second World Conference “Evolution”, Venezia, 20-23 settembre 2006, www.the-futureofscience.org.
- GE X., WU Q., WANG S.M. (2006): *SAGE detects microRNA precursors*, «BMC Genomics», 7, p. 285, <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/7285>.
- GEDDA L., BRENCI G. (1973): *Cronogenetica, l'eredità del tempo biologico*, Mondadori EST, Milano.
- GEESINK G.H., KOOHMARAIE M. (1999): *Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions*, «J. Anim. Sci.», 77, pp. 2685-2692.
- GERBENS F., RETTEMBERGER G., LENSTRA J.A., VEERKAMP J.H., TE PAS M.F.W. (1997): *Characterization, chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene*, «Mamm. Genome», 8, pp. 328-332.
- GERBENS F., JANSSEN A., VAN ERP A.J.M., HARDERS F., MEUWISSEN T.H.E., RETTENBERGER G., VEERKAMP J.H., TE PAS M.F.W. (1998): *The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pig*, «Mamm. Genome», 9, pp. 1022-1026.
- GERBENS F., DE KONING D.J., HARDERS F.L., MEUWISSEN T.H.E., JANSSEN L.L.G., GROENEN M.A.M., VEERKAMP J.H., VAN ARRENDONK J.A.M., TE PAS M.F.W. (2000): *The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pig*, «J. Anim. Sci.», 78, pp. 552-559.
- GERI G. (1989): *Le razze suine*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 177-182.
- GERSTEIN M., ZHENG D. (2006): *La vera vita degli pseudogeni*, «Le Scienze», 458, pp. 67-73.
- GHANE B., JUNEJA K. (1988): *In vivo prediction of meat quality in pigs by genetic markers*, Proc. of the Meeting “Pig carcass and meat quality”, Reggio Emilia, 2-3 June, 1988, pp. 113-125.
- GILAD Y. ET AL. (2003): citato da Gerstein M. e Zheng D. (2006).
- GILAD Y., WIEBE V., PRZEWORSKI M., LANCET D., PAABO S. (2004): *Loss of olfactory receptor genes coincides with the acquisition of full trichromatic vision in primates*, «Plos Biology», 2 (1), p. 124.
- GILAD Y., OSHLACK A., SMYTH G.K., SPEED T.P., WHITE K.P. (2006): *Expression profiling in pri-*

- mates reveals a rapid evolution of human transcription factors, «Nature», 440 (9), pp. 242-245.
- GIRARD L., FREELING M. (1999): *Regulatory changes as a consequence of transposon insertion*, «Dev. Genet.», 25, pp. 291-296.
- GOLDING M.C., LONG C.R., CARMELL M.A., HANNON G.J., WESTHUSIN M.E. (2006): *Suppression of prion protein in livestock by RNA interference*, «PNAS», 103, pp. 5285-5290.
- GORDON W.G., GROVES M.L. (1975): *Primary sequence of beta, gamma, and minor caseins*, «J. Dairy Sci.», 58, pp. 574-582.
- GOULD S.J. (1977): *Ontogeny and phylogeny*, Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- GOULD S.J. (1989): *A developmental constraint in Cerion, with comments on the definition and interpretation of constraint in evolution*, «Evolution», 43, pp. 516-539.
- GREEN M.L., FOSTER P.M.D. (1974): *Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants*, «J. Dairy Res.», 41, pp. 269-282.
- GRIFFITHS A.J.F., MILLER J.H., SUZUKI D.T., LEWONTIN R.C., GALBART W.M. (2000): *An introduction to genetic analysis*, W.H. Freeman, New York, 7^a edizione, (trad. it. *Genetica: principi di analisi formale*, Zanichelli, Bologna, 2002).
- GROSCLAUDE F., MARTIN P. (1997): *Casein polymorphism in the goat*, Proc. IDF Inter. Dairy Fed., Milk Protein Polymorphism Seminar (II), Bruxelles, B, pp. 241-253.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., BRIGNON G., DI STASIO L., JEUNET R. (1987): *A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat $\alpha s1$ -casein*, «Genet. Sel. Evol.», 19, pp. 399-412.
- GROSSE W.M., KAPPES S.M., MCGRAW R.A. (2000): *Linkage mapping and comparative analysis of bovine expressed sequence tags (ESTs)*, «Anim. Genet.», 31, pp. 171-177.
- HANSEN T.F. (2003): *Is modularity necessary for evolvability? Remarks on the relationship between pleiotropy and evolvability*, «Biosystems», 2189, pp. 1-12.
- HANSET R. (1974): citato da Matassino D. (1978).
- HARVEY A.J., SPEKSNIJDER J., BAUGH L.R., MORRIS J.A., IVARIE R. (2002): *Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens*, «Nat. Biotechnol.», 20, pp. 396-399.
- HATFIELD S.D., SHCHERBATA H.R., FISCHER K.A., NAKAHARA K., CARTHEW R.W., RUOHOLA-BAKER H. (2005): *Stem cell division is regulated by the microRNA pathway*, «Nature», 435, pp. 974-978.
- HEDRICH K., ESKELSON C., WILMOT B., MARDER K., HARRIS J., GERRELS J., MEIJA-SANTANA H., VIEREGGE, P., JACOBS H., BRESSMAN S.B., LANG A.E., KAN M., ABRUZZESE G., MARTINELLI P., SCHWINGER E., OZELLUS L.J., PRAMSTALLER P.P., KLEIN C., KRAMER P. (2004): *Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies*, «Mov. Disord.», 19 (10), pp. 1146-1157.
- HENDERSON C.R. (1975): *Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model*, «Biometrics», 31, pp. 423-466.
- HERBERT A., RICH A. (1999): *RNA processing and the evolution of eukaryotes*, «Nat. Genet.», 21, pp. 265-269.
- HIROTSUNE S., YOSHIDA N., CHEN A., GARRET L., SUGIYAMA F., TAKAHASHI S., YAGAMI K-I., BORIS A.W., YOSHIKI, A. (2003): *An expressed pseudogene regulates the messenger – RNA stability of its homologous coding gene*, «Nature», 423, pp. 91-96.
- HODIN J. (2000): *Plasticity and constraints in development and evolution*, «J. Exp. Zool.», 288 (2), p. 192.
- HOLLAND J.W., DEETH H.C., ALEWOOD P.F. (2004): *Proteomic analysis of κ -casein micro-heterogeneity*, «Proteomics», 4, pp. 743-752.
- HOUBAVY H.B., MURRAY M.F., SHARP P.A. (2003): *Embryonic stem cell-specific microR-*

- NA₅, «Dev. Cell», 5 (2), pp. 351-358.
- HUANG J., FORSBERG N. E. (1998): *Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation*, «PNAS», 95, pp. 12100-12105.
- HUGHES H.B. ET AL. (1954): citato da Evans W. e Relling M.V. (1999).
- HUTSLER J.J., GILLESPIE M.E., GAZZANIGA M.S. (1999): *L'evoluzione della specializzazione emisferica*, in *Frontiere della vita*, III, "Sistemi intelligenti", Treccani, pp. 29-40.
- HÜTTELMAIER S., ZENKLUSEN D., LEDERER M., DICTENBERG J., LORENZ M., MENG X., BASSELL G.J., CONDEELIS J., SINGER R.H. (2005): *Spatial regulation of β -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1*, «Nature», 438, pp. 512-515.
- HWANG I.H., THOMPSON J.M. (2001): *The interaction between pH and temperature decline early post-mortem on the calpain system and objective tenderness in electrically stimulated beef longissimus dorsi muscle*, «Meat Sci.», 58, pp. 167-174.
- HWANG I.H., PARK B.Y., KIM J.H., CHO S.H., LEE J.M. (2004): *Assessment of post-mortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus*, «Meat Sci.», 69, pp. 79-91.
- IACUANIELLO S., CASTIGLIONI B., GORNI C., STELLA A., RESTELLI G.L., MARIANI P., PAGNACCO G. (2006): *L'espressione genica differenziale in cosce con caratteristiche estreme per la qualità della carne*, Seminario progetto FIRB "Identificazione e analisi dell'espressione dei geni nel suino per lo studio e il miglioramento della produzione e della qualità della carne, Bologna", 27 ottobre 2006.
- INGLESE F., CASTELLANO N., PICARIELLO G., TRANI A., MATASSINO D. (2006): *Proteomics approach for definition of "molecular identity card" of traditional meat product (fiocco sannita) obtained from pig ancient autochthonous genetic type (AAGT) "Casertana". Preliminary results*, 2nd Seminar of the Scientific – professional Network on Mediterranean livestock Farming "Mediterranean Livestock production: uncertainties and opportunities", Saragozza (Spagna), 18-20 maggio 2006, Posters Session 2 (n. 35).
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2001), *Initial sequencing and analysis of the human genome*, «Nature», 409, pp. 860-921.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2004): *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*, «Nature», 431, pp. 931-945.
- IVANOVA N., DOBRIN R., KOTENKO I., LEVORSE J., DECOSTE C., SCHAFER X., LUN Y., LEMISCHKA I.R. (2006): *Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference*, «Nature», 442, pp. 533-538.
- JABLONKA E., LAMB M. J. (1989): *The inheritance of acquired epigenetic variations*, «J. Theor. Biol.», 139, pp. 69-83.
- JABLONKA E., LAMB M.J. (1995): *Epigenetic inheritance and Evolution. The Lamarckian dimension*, Oxford University Press, Oxford.
- JACOB F., MONOD J. (1961): *Genetic regulatory mechanisms and the synthesis of proteins*, «J. Mol. Biol.», 3, pp. 318-356.
- JAGOE R.T., LECKER S.H., GOMES M., GOLDBERG A.L. (2002): *Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation*, «FASEB J.», 16, pp. 1697-1712.
- JIANG Y.L., LI N., PLASTOW G., LIU Z.L., HU X.X., WU C.X. (2002): *Identification of three SNPs in the porcine myostatin gene (MSTN)*, «Anim. Biotechnol.», 13 (1), pp. 173-178.
- JANN O.C., PRINZENBERG E.M., LUIKART G., CAROLI A., ERHARDT. G. (2004): *High polymorphism in the kappa-casein (CSN3) gene from wild and domestic caprine species revealed by DNA sequencing*, «J. Dairy Res.», 71, pp. 188-195.
- JENSEN K., TALBOT R., PAXTON E., WADDINGTON D., GLASS E.J. (2006): *Development and validation of a bovine macrophage specific cDNA microarray*, «Genomics», 7, p. 224.

- JENSSEN T.K., LANGAAS M., KUO W.P., SMITH-SORENSEN B., MYKLEBOST O., HOVIG E. (2002): *Analysis of repeatability in spotted cDNA microarrays*, «Nucleic Acids Res.», 30, pp. 3235-3244.
- Ji H., WONG W.H. (2006): *Computational Biology: Toward Deciphering Gene Regulatory Information in Mammalian*, «Biometrics», 62, pp. 645-663.
- KAJIMOTO K., NARABA H., IWAI N. (2006): *microRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation*, <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/RNA.7228806>.
- KALOW W. (1956): citato da Evans W. and Relling M.V. (1999).
- KARLAS ET AL. (2004): citato da Golding M.C. et al. (2006).
- KATOH M., KATOH M. (2004): *Human FOX gene family*, «Int. J. Oncology», 25, pp. 1495-1500.
- KAUFFMAN S.A. (1969): *Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets*, «J. Theor. Biol.», 22, pp. 437-467.
- KAUFFMAN S.A. (1974): *The large scale structure and dynamics of genetic control circuits: an ensemble approach*, «J. Theor. Biol.», 44, pp. 167-190.
- KAUFFMAN S.A. (1993): *The origins of order*, Oxford University Press, Oxford.
- KEANE O.M., ZADISSA A., WILSON T., HYNDMAN D.L., GREER G.J., BAIRD D.B., MCCULLOCH A.F., CRAWFORD A.M., MCEWAN J.C. (2006): *Gene expression profiling of Naïve sheep genetically resistant and susceptible to gastrointestinal nematodes*; «BMC Genomics», 7, p. 42, <http://biomedcentral.com/1471-2164/7/42>.
- KEATING A., STANTON C., MURPHY J.J., SMITH T.J., ROSS R.P., CAIRNS M.T. (2005): *Isolation and characterization of the bovine Stearoyl-CoA desaturase promoter region in dairy cows*, «Mamm. Genome», 16 (3), pp. 1432-1777.
- KENNES Y.M., MURPHY B.D., POTHIER F., PALIN M.F. (2001): *Characterization of swine leptin (LEP) polymorphism and their association with production traits*, «Anim. Genet.», 32, pp. 215-218.
- KIM W.A., LIANG L., DEAN R.G., HAUSMAN D.B., HARTZELL D.B., BAILE C.A. (2001): *Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures*, «Biochem. and Biophys. Res. Commun.», 281, pp. 902-906.
- KIMURA M. (1967): *On the evolutionary adjustment of spontaneous mutation rates*, «Genetic Res.», 9, pp. 23-24.
- KIMURA M. (1968a): *Evolutionary rate at the molecular level*, «Nature», 217, pp. 624-626.
- KIMURA M. (1968b): *Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles*, «Genet. Res.», 11, pp. 247-269.
- KIMURA M. (1980): *La teoria della neutralità nell'evoluzione molecolare*, «Le Scienze», 137, pp. 34-43.
- KNIGHT C.G., ZITZMAN N., PRABHAKAR S., ANTROBUS R., DWEK R., HOBESTREIT H., RAINEY P.B. (2006): *Unraveling adaptive evolution: how a single point mutation affects the protein coregulation network*, «Nat. Genet.», 38 (9), pp. 1015-1022.
- KOBOLAK J., GOCZA E. (2002): *The role of the myostatin protein in meat quality – a review*; «Archives of Animal Breeding», 45, pp. 159-170.
- KOMIYAMA ET AL. (1973): citato da Matassino (1978).
- KOOHMARAIE M. (1996): *Biochemical factors regulating the toughening and tenderisation processes of meat*. «Meat Sci.», 43, pp. 193-201.
- KOOHMARAIE M., SHACKELFORD S.D., WHEELER T.L., LONERGAN S.M., DOUMIT M.E. (1995): *A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits*, «J. Anim. Sci.», 73, pp. 3596-3607.
- KOOHMARAIE M., KENT M.P., SHACKELFORD S.D., VEISETH E., WHEELER T.L. (2002):

- «Meat. Sci.», 62, pp. 345-352.
- KOTHAPALLI R., YODER S.J., MANE S., LOUGHRAN T.P. JR. (2002): *Microarray results: how accurate are they?*, «BMC Bioinformatics», 3, p. 22, <http://biomedcentral.com/1471-2105/3/22>.
- KUN A., SANTOS M., SZATHMARY E. (2005): *Real ribozymes suggest a relaxed error threshold*, «Nat. Genet.», 37 (9), pp. 1008-1011.
- KUROIWA Y., KASINATHAN P., MATSUSHITA H., SATHIYASEELAN J., SULLIVAN E.J., KAKITANI M., TOMIZUKA K., ISHIDA I., ROBL J.M. (2004): *Sequential targeting of the gene encoding immunoglobulin-μ and prion protein in cattle*, «Nat. Genet.», 36 (7), pp. 775-780.
- LACETERA N., BERNABUCCI U., SCALIA D., BASIRICÒ L., MORERA P., NARDONE A. (2006): *Heat Stress Elicits Different Responses in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Brown Swiss and Holstein Cows*, «J. Dairy Sci.», 89, pp. 4606-4612.
- LAGONIGRO R., PIETROLA E., D'ANDREA M., VELTRI C., PILLA F. (2001): *Molecular genetic characterization of the goat s2-casein E allele*, «Anim. Genet.», 32, pp. 391-393.
- LAGONIGRO R., BARONE C.M.A., GRAZIANO M., OCCIDENTE M., ZULLO A., MATASSINO D. (2004): *Caratterizzazione molecolare dell'allele F dell'alpha s2-caseina caprina e genotipaggio mediante PRC-RFLP*, Atti VI Conv. Naz. Biodiversità, Bari, 6-7 settembre 2001, III, pp. 1183-1187.
- LAMACCHIA C., DI LUCCIA A., LAMPARELLI S., SCHENA A., PADALINO L., FARES C., MAMONE G., FORMISANO A., PELELLA F., DI FONZO N., LA NOTTE E. (2004): *A proteome approach on the characterisation of protein composition of genetically modified durum wheat whole meal showing an altered trafficking and depositing of seed storage proteins*, International Symposium on Mass Spectrometry, Bari, 26-30 settembre 2004.
- LAMETSCH R., BENDIXEN E. (2001): *Proteome analysis applied to meat science: characterizing post-mortem changes in porcine muscle*, «J. Agric. and Food Chem.», 49 (10), pp. 4531-4537.
- LAMETSCH R., KARLSSON A., RESENVOLD A., ANDERSEN K., ROEPSTORFF P., BENDIXEN E. (2003): *Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness*, «J. Agric. and Food Chem.», 51, pp. 6992-6997.
- LANDE R. (1980): *The genetic covariance between characters maintained by pleiotropic mutations*, «Genetics», 94, pp. 203-215.
- LANDMAN O.E. (1991): *The inheritance of acquired characteristics*, «Annu. Rev. Genet.», 25, pp. 1-20.
- LASORELLA A., STEGMULLER J., GUARDAVACCARO D., LIU G., CARRO M.S., ROTHSCHILD G., DE LA TORRE-UBIETA L., PAGANO M., BONNI A., IAVARONE A. (2006): *Degradation of Id2 by the anaphase-complex couples cell cycle exit and axonal growth*, «Nature», 442, pp. 471-474.
- LEE J.T., STRAUS W.M., DAUSMAN J.A., JAENISCH R.A. (1996): *450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center*, «Cell», 86, p. 83.
- LEHNERT S.A., BYRNE K.A., WANG Y.H. (2004): *Development and application of a bovine Cdna microarray for expression profiling of muscle and adipose tissue*, «Aust. J. Exp. Agr.», 44 (11), pp. 1127-1133.
- LEROUX C., MARTIN P., MAHÈ M.F., LEVEZIEL H., MERCIER J.C. (1990): *Restriction fragment length polymorphism identification of goat alpha s1-casein alleles: a potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis*, «Anim. Genet.», 21 (4), pp. 341-51.
- LEWIS E.B. (1978): *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*, «Nature», 276, pp. 565-570.
- LEWONTIN R.C. (1993): *Biologia come ideologia*, Bollati Boringhieri, Torino.
- LEWONTIN R.C. (2004): *Il sogno del genoma umano e le altre illusioni della scienza*, Later-

- za, Bari-Roma.
- LI H. (2000): *Gene sequencing. China, Denmark team up to tackle the pig*, «Science», 290 (5493), pp. 913-914.
- LIANG P., PARDEE A.B. (1992): *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction*, «Science», 257, 967-971.
- LIEFERS. C., VEERKAMP R.F., TE PAS M.F., DELAVALD C., CHILLIARD Y., PLATJE M., VAN DER LENDE T. (2005): *Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows*, «Anim. Genet.», 36, pp. 111-118.
- LINDMARK-MANSSON H., TIMGREN A., ALDEN G., PAULSSON M.Y. (2005): *Two-dimensional gel electrophoresis of proteins and peptides in bovine milk*, «Int. Dairy J.», 15 (2), pp. 111-121.
- LIPARDI C., WEI Q., PATERSON B. (2001): *RNAi as random degradative PCRsiRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNA*, «Cell», 107 (3), pp. 297-307.
- LIPKIN E., STRAUS K., ELA E., FRIEDMANN A., MEDUGORAC I., FONTANESI L., BAGNATO A., DOLEZAL M., MEDRANO J.F., SOLLER M. (2006): *Linkage disequilibrium in four cattle populations*, Proc. of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, August, pp. 13-18.
- LIU M. ET AL. (2005): citato da Golding et al. (2006).
- LIU R.Z., DENOVAN-WRIGHT E.M., WRIGHT J.M. (2003): *Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (fabp3) from zebrafish (Danio rerio)*, «Eur. J. Biochem.», 270 (15), pp. 3223-3234.
- LOPEZ-OTIN C., OVERALL C.M. (2002): *Protease degradomics: a new challenge for proteomics*, «Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.», 3 (7), pp. 509-19.
- LUCIFERO M. (1989): *I caprini*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 159-164.
- LYON M. (1961): *Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus Musculus L.)*, «Nature», 190, pp. 372-3.
- MAHÈ M.F., GROSCLAUDE F. (1993): *Polymorphism of β -casein in the Creole goat of Guadeloupe: evidence for a null allele*, «Gènét. Sél. Evol.», 25, pp. 403-408.
- MALTIN C., BALCERZAK D., TILLEY R., DELDAY M. (2003): *Determinants of meat quality: tenderness*, «Proc. of the Nutrition Society», 62 (2), pp. 337-347.
- MARCHITELLI C., SAVARESE M.C., CRISÀ A., NARDONE A., MARSAN P.A., VALENTINI A. (2003): *Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene*, «Mamm. Genome», 14, pp. 392-395.
- MARIANI P., SUMMER A. (1999): *Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte*, «Sci. Tecn. Latt. Cas.», 50, pp. 197-230.
- MARIANI P., SUMMER A., FORMAGGIONI P., FOSSA E. (1999): *Contenuti di caseina, fosforo e urea e proprietà di coagulazione di campioni di latte di massa di vacche di razza Frisone Italiana caratterizzati da bassa acidità titolabile*, Atti Soc. It. Sci. Vet., 53, pp. 411-412.
- MARIANI P., SUMMER A., ANGHINETTI A., SENESE C., DI GREGORIO P., RANDO A., SERVENTI P. (1995): *Effetti dell'allele α_{s1} -Cn G sulla ripartizione percentuale delle caseine α_{s1} , α_{s2} , β e k in vacche di razza Bruna*, «Ind. Latte», 31 (4), pp. 3-13.
- MARLETTA D., BORDONARO S., GUASTELLA A.M., FALAGIANI P., CRIMI N., D'URSO G. (2004): *Goat milk with different α_{s2} -casein content: analysis of allergenic potency by REAST-inhibition assay*, «Small Rumin. Res.», 52, pp. 19-24.
- MARTIN P., LEROUX C. (1994): *Characterization of a further α s1-casein variant generated by exon skipping*, Proc. 24th International Society of Animal Genetics Conference, Prague, Abstract E43, pp. 88.

- MARTIN P., SZYMANOWSKA M., ZWIERZCHOWSKI L., LEROUX, C. (2002): *The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminants milk*, «Reprod. Nutr. Dev.», 42, pp. 433-459.
- MARZIALI A.S., NG-KWAI-HANG K.F. (1986): *Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk*, «J. Dairy Sci.», 69, pp. 1793-1798.
- MASINA P., RANDO A., DI GREGORIO P. (1989): *Polimorfismo e geni a effetto maggiore*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 91-99.
- MASOERO G. (1989): *I conigli*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 199-203.
- MATASSINO D. (1978): *Il miglioramento genetico degli animali in produzione zootecnica*, «Eserc. Accad. Agr. di Pesaro», Serie III, 9, pp. 33-98.
- MATASSINO D. (1983): *Nuove tecnologie per l'agricoltura. Materiali ed esperienze di sperimentazione didattica. Sezione Produzione animale*, Corso "Il sistema produzione del latte", IAL Cisl, Roma, pp. 155-268.
- MATASSINO D. (1984): *Problematiche del miglioramento genetico nei bovini*, in *Nuove frontiere della selezione per gli animali in produzione zootecnica*, Atti XIX Simp. Int. di Zootecnia, Milano, 15 aprile 1984, pp. 11-19.
- MATASSINO D. (1985): *Future strategie nel miglioramento genetico degli animali in produzione zootecnica*, Atti e Memorie della Accademia di Agricoltura Scienze e Lettere di Verona, Serie VI, 36, pp. 141-169.
- MATASSINO D. (1986): *Il contributo della selezione per una produzione commerciale nell'allevamento del bovino da latte*, Atti Conv. AIA XLI Fiera Int. bovino da latte, Cremona, 18 settembre 1986, pp. 1-31.
- MATASSINO D. (1988): *Genetic improvement of meat quality*, Proceedings of the Meeting "Pig carcass and meat quality", Reggio Emilia, 2-3 june, 1988, pp. 165-198.
- MATASSINO D. (1989a): *Miglioramento genetico degli animali domestici. Cenni storici*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 17-22.
- MATASSINO D. (1989b): *Biotechnologie: applicazioni e prospettive*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 101-122.
- MATASSINO D. (1989c): *Biotechniche innovative delle produzioni animali*, Convegno CNR, Ente Fiera del Levante, Sessione Biotechnologie, mimeografato.
- MATASSINO D. (1990): *Istituzione di un Centro nazionale per la conservazione del germoplasma degli animali in produzione zootecnica*, «Alto Tammaro», 2 (5), pp. 58-64.
- MATASSINO D. (1992a): *Il miglioramento genetico nei bovini per la produzione di latti finalizzati all'uomo*, Atti Conv. "Il ruolo del latte nell'alimentazione dell'uomo", Paestum, 24-26 ottobre 1991, Quaderni Frisona, maggio 1992.
- MATASSINO D. (1992b): *Impariamo dalla natura*. Atti Conv. "Progetto Ambiente", Colle Sannita (BN), 14-15 febbraio, «L'Allevatore», 48 (17), pp. 18-19.
- MATASSINO D. (1996): *L'animale autoctono quale bene culturale*, Atti Conv. "Ruolo del germoplasma animale autoctono nella salvaguardia del territorio", Bari, 17 settembre 1996, «Terra Pugliese», 45 (11-12), p. 3; «L'Allevatore», 53 (10), inserto, 1997.
- MATASSINO D. (1998): *Problematiche e applicazioni della clonazione degli animali in produzione zootecnica*, in *Rivoluzioni biotecnologiche in agricoltura*, «I Georgofili. Quaderni», VI, Firenze, 1997, pp. 29-70.
- MATASSINO D. (1999): *La clonazione ha un futuro in zootecnia?*, Atti Conf. Società Agraria di Lombardia, Milano, 5 dicembre 1997, «Bollettino dell'Agricoltura», 138, Serie III (3/4), pp. 11-102.
- MATASSINO D. (2001a): *Etica e biodiversità*, Atti VI Conv. Naz. "Biodiversità: opportunità di sviluppo sostenibile", Bari, 6-7 settembre 2001, I, 27-44, «ARS», 82, 2001;

- «L'Allevatore», 58 (1), supplemento, 2002.
- MATASSINO D. (2001b): *I parchi tra cultura, ecologia e turismo*, Atti Conv. "I parchi tra cultura, ecologia e turismo", S. Margherita Ligure (GE), 26 settembre 2000, «L'Allevatore», 57 (2), pp. 9-12; «Linea Ecologica», 33, p. 2, 2001.
- MATASSINO D. (2002): *Clonazione e gestione del genoma*, Atti Conv. "L'albero della vita che sta nel paradiso di Dio", Napoli, 18-19 febbraio 1999, in Colonnello P., Gallinaro R., Giustiniani P. (Eds.), *L'Albero della Vita – Biotecnologie tra fede e scienze*, Facoltà di Teologica dell'Italia meridionale, Sez. S. Tommaso d'Aquino, Napoli, pp. 81-160.
- MATASSINO D. (2004a): *Ambiente e biodiversità*, Atti Conferenza annuale *International Court of the Environment Foundation* (ICEF); Accademia dei Lincei, *Le nuove tecnologie a protezione dell'ambiente*, Roma, 1 luglio 2004; «ARS», 101, 2005, pp. 6-13; «Linea Ecologica», 37 (1), 2005, pp. 46-54.
- MATASSINO D. (2004b): *Le nuove frontiere della genetica: caratterizzazione della specificità di un prodotto tradizionale*, «ARS», 99, pp. 25-30.
- MATASSINO D. (2005a): *Cenni strategici di attività zootecniche*, Atti Accademia Nazionale di Agricoltura, 209, 2005; *Biodiversità e specificità territoriale*, Atti Seminario "Qualità e tracciabilità agroalimentare", San Bartolomeo in Galdo (BN), 17 marzo 2005, in Pagliarino E., Cannata G. (Eds.), *Quaderni. Orientamento e Occupazione nei territori rurali*, 3, Ed. Pacini, Pisa, pp. 9-60, 2005; *Elementi di nuove strategie per l'attività zootecnica*, «ARS», 102, pp. 9-17, 2005.
- MATASSINO D. (2005b): *Genomics and Proteomics for the identification of food nutritional and extranutritional quality*, Seminar on "Proteomics and Genomics techniques in the process of conservation of native animal genetics resources", Trakya University, Agricultural Faculty of Tekirdag, Tekirdag, 15-16 giugno.
- MATASSINO D. (2006a): *Interazioni fra nutrienti ed espressione genica*, Tavola Rotonda "Aspetti genetici: interazioni fra nutrienti ed espressione genica", Primo Congresso nazionale ARNA, Bologna, 23-25 marzo 2006, Atti Primo Congresso nazionale ARNA, «CLUEB», 56, 2006.
- MATASSINO D. (2006b): *Scienza omica ed eccellenza nutrizionale*, Tavola Rotonda "Biotecnologie e alimentazione umana", corso "Biotecnologie e Medicina", Torella dei Lombardi (AV), 4 luglio 2006.
- MATASSINO D., PILLA A.M. (1976): *Genetica e miglioramento degli ovini*, Atti II Conv. Naz. ASPA, Bari, 17-20 maggio, pp. 229-264.
- MATASSINO D., CAPPUCCIO A. (1998): *Costs of animal products and standard of living*, Proc. of 8th World Conference on Animal Production, Seoul, 28 June – 4 July 1998, Special Symposium & Plenary Sessions, pp. 559-591.
- MATASSINO D., ROSSI G. (1998): *Biotechnologies and genetic improvement*, Proc. of Third course on biotechnology of reproduction in buffaloes, under the auspices of 5th World Buffalo Congress. Caserta, 6-10 ottobre 1997, *Bubalus Bubalis*, 4 (2), supplemento, pp. 269-304.
- MATASSINO D., OCCIDENTE M. (2003): *La proteomica al servizio della sicurezza alimentare e della tracciabilità di un prodotto*, «ARS», 93, pp. 13-16.
- MATASSINO D., BORDI A., DONATO A., BOTTONI S. (1969): *L'individualità delle aziende da latte in provincia di Cremona. Anno 1969*, «Prod. Anim.», 8, pp. 209-232.
- MATASSINO D., DI BERARDINO D., BARONE C.M.A. (1985): *Anomalie cromosomiche nel bovino podolico allevato in Italia meridionale*, «Prod. Anim.», 4, n.s., pp. 55-71.
- MATASSINO D., ZUCCHI G., DI BERARDINO D. (1991): *Management of consumption, demand, supply and exchanges*. Proc. Symp. "On the eve of the 3rd millennium, the European challenge for animal production", Toulouse, 11 July 1990, «EAAP», 48, pp.

- 105-124.
- MATASSINO D., CAPPUCCIO A., GRASSO F. (1996): *Importanza del Focal Point per la conservazione e la valorizzazione degli animali in produzione zootecnica*, Atti Conv. "La conservazione della biodiversità in Umbria: situazione attuale e prospettive", Perugia, 28-30 maggio, L, supplemento, pp. 103-145.
- MATASSINO D., INCORONATO C., OCCIDENTE M. (2006a): *Biodiversità e filiere produttive zootecniche*, Atti VII Conv. Nazionale Biodiversità "L'agrobiodiversità per la qualificazione delle filiere produttive", Catania, 31 marzo – 2 aprile 2005, «Italus Hortus», 13 (2), 2006, pp. 70-91; «ARS», 104, 2005, pp. 29-37.
- MATASSINO D., BORDI A., DONATO A., BOTTONI S. (1969): *L'individualità delle aziende da latte in provincia di Cremona, Anno 1969*, «Prod. Anim.», 8 (3), pp. 209-232.
- MATASSINO D., BARONE C.M.A., MATTEI V., GRASSO F. (1986a): *La produzione di carne nel bovino podolico. V. Alcune caratteristiche strutturali della fibra muscolare*, «Prod. Anim.», 4 (1-4), n.s., pp. 71-86.
- MATASSINO D., BARONE C.M.A., MATTEI V., NAPOLITANO F. (1986b): *Confronto fra agnelli Ile de France (IF), Gentile di Puglia (GP) e derivati dall'incrocio IF x GP (F₁, F₂, F₃) nati in autunno e mattati a 36 e 56 giorni di età. I. Influenza dell'elettrostimolazione su alcune caratteristiche strutturali della fibra muscolare*, «Prod. Anim.», 4 (1-4), n.s., pp. 31-47.
- MATASSINO D., BETTINI T.M., DONATO A., BORDI A., COMBA G. (1972): *L'individualità delle aziende di bovini da latte in provincia di Brescia. Anni 1971 e 1972*, «Prod. Anim.», 11 (3), pp. 221-240.
- MATASSINO D., ZACCHI B., BORDI A., COSENTINO E., RUBINO R. (1974): *Galattopoiesi ed efficienza alimentare e riproduttiva in un grande allevamento di bovini da latte*, «Prod. Anim.», 13 (2-4), pp. 145-174.
- MATASSINO D., BARONE C.M.A., DURANTI E., CAIAZZO M., MATTEI V. (1989): *Le caratteristiche morfometriche della fibra muscolare e qualità della carne di daino*, «Prod. Anim.», 2 (3-4), Serie III, pp. 65-80.
- MATASSINO D., BARONE C.M.A., CASSOTTA F., INGLESE F., OCCIDENTE M. (2004): *Preliminary results of a proteomic study of "Fiocco" from ham of Casertana pork at the end of seasoning*, Proc. of 5th International Symposium on the Mediterranean Pig, Tarbes, France, 16-19 november, Résumés des communications, 60. «Options méditerranéennes», 2007, in *c.d.s.*
- MATASSINO D., CASSOTTA F., INGLESE F., PICARIELLO L., DI LUCCIA A. (2006b): *Etereogenità dell'actina nel "fiocco" del suino nero TGAA Casertana*, Atti VII Conv. Nazionale Biodiversità "L'agrobiodiversità per la qualificazione delle filiere produttive", Catania, 31 marzo – 2 aprile 2005, «Italus Hortus», 13 (2), pp. 843-845.
- MATASSINO D., INCORONATO C., INGLESE F., OCCIDENTE M., VARRICCHIO G. (2006d): *Biomolecole con valenza nutrizionale nei prodotti di origine animale*, Atti Conv. "L'oncologia nel segno dell'umanizzazione: le nuove prospettive della cura grazie ai benefici della natura, l'officina della nostra salute", Benevento, 18 novembre 2005, «ARS», 108, pp. 42-49 (I parte), 109, pp. 52-59 (II parte).
- MATASSINO D., RUBINO R., PILLA A.M., PELOSI A., GRASSO F., COSENTINO E. (1975): *Sincronizzazione degli estri ed attività enzimatica in ovini di razza Gentile di Puglia*, «Prod. Anim.», 14 (1), pp. 7-22.
- MATASSINO D., BARONE C.M.A., BUONO R., COLATRUGLIO P., ZULLO A., MASCIA M. (1993): *Protein polymorphism and quanti-qualitative characteristics of milk from Italian Friesian and Brown cows. I. Chemical composition*: «Prod. Anim.», 6, Serie III, pp. 75-109.

- MATASSINO D., BARONE C.M.A., COLATRUGLIO P., ANNUNZIATA S., D'OCCHIO C., OCCIDENTE M. (1997): *Effetto della traslocazione Rob 1/29 sulle caratteristiche strutturali e qualitative della carne in vitelloni di razza Marchigiana*, Atti XII Congr. Naz., Pisa, 23-26 giugno, pp. 153-154.
- MATASSINO D., BARONE C.M.A., CASSOTTA F., INGLESE F., OCCIDENTE M., DI LUCCIA A. (2006c): *Proteomics as tool for characterisation of meat products: "Fiocco sannita". Preliminary results*, in Greppi G.F., Bonizzi L., Roncada P. (Eds.), *Proceedings of 40th Symposium of animal production «From genome to proteome in animal science»*, Lodi, 29 settembre 2005, Ed. LeaBiotech, pp. 170-175.
- MATASSINO D., CASTELLANO N., INCORONATO C., INGLESE F., OCCIDENTE M., VARRICCHIO G. (2006e): *Alcune precisazioni semantiche e sintetiche sul ruolo "nutrizionale" ed "extranutrizionale" di "bioalimenti" peculiari di un "bioterritorio"*, «L'Allevatore», 62 (15-16); «ARS», 110, pp. 55-59.
- MATASSINO D., CASTELLANO N., INCORONATO C., OCCIDENTE M., RICCIARDI L., BARONE C.M.A. (2007a): *Genetic characterization at H-FABP loci and their effect on some meat characteristics in two pig genetic autochthonous genetic types (AAGTs): Calabrese and Casertana*, Proc. of 17th ASPA Congress, Alghero, 29 maggio – 1 giugno 2007, in *c.d.s.*
- MATASSINO D., CONSOLANTE D., INGLESE F., ZULLO A., DI LUCCIA A., BARONE C.M.A. (2007b): *Proteomic characterization of electrically stimulated and aged meat of heavy kids*, Proc. of 17th ASPA Congress, Alghero, 29 maggio – 1 giugno 2007, in *c.d.s.*
- MATASSINO D., COSENTINO E., DELL'AQUILA S., BORDI A., GRASSO F., RUBINO R., TAIBI L., PELOSI A. (1982): *Risultati preliminari dello studio di alcuni aspetti del profilo metabolico in ovini di razza Gentile di Puglia*, «Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Napoli», Portici, Serie IV, 16, pp. 101-112.
- MATTICK J.S. (2003): *Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein coding RNAs in the complex organisms*, Bioessays, 25 (10), pp. 930-939.
- MAZZIOTTA A., GENNARO G. (2002): *La Girgentana*, Ed. Ambiente e Vita, Sicilia.
- MAYR E. (1963): *Animal species and evolution*, 2v., Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.
- MEDRANO J.F., ISLAS-TREJO A.D., JOHNSON A.M. (2003): Data bank NCBI, access code AY241932.
- MCPHERRON A., LEE S.J. (1997): *Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene*, «PNAS», 94 (23), pp. 12457-12461.
- MINELLI A. (1990): *L'unità (problematica) della biologia evoluzionistica*, «Le Scienze», 266, p. 7.
- MIRANDA G., MAHÈ M.F., LEROUX C., MARTIN, P. (2004): *Proteomic tools to characterize the protein fraction of Equidae milk*, «Proteomics», 4 (8), pp. 2496-509.
- MORGAN H.D., SUTHERLAND H.G.E., MARTIN D.I.K., WHITELAW E. (1999): *Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse*, «Nat. Genet.», 23, pp. 314-318.
- MORTZ E., VORM O., MANN M., ROEPSTORFF P. (1994): *Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search*, «Biol. Mass. Spectrom.», 23, pp. 249-261.
- MOURA A.A., KOC H., CHAPMAN D.A., KILLIAN G.J. (2006): *Identification of proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach*, «J. Androl.», 27 (2), <http://www.andrologyjournal.org> doi:10.2164/jandrol.05089.
- MUROYA S., NAKAJIMA I., CHIKUNI K. (2003): *Amino acid sequences of multiple fast and slow troponin T isoforms expressed in adult bovine skeletal muscles*, «J. Anim. Sci.», 81, pp. 1185-1192.
- MUROYA S., KITAMURA S., TANABE S., NISHIMURA T., NAKAJIMA I., CHIKUNI K. (2004): *N-terminal amino acid sequences of troponin T fragments, including 30 kDa one, produ-*

- ced during postmortem aging of bovine longissimus muscle, «Meat Sci.», 67, pp. 19-24.
- NANNI COSTA L., LO FIEGO D.P., PANTANO A., RUSSO V. (2000): *Relationship between glycolytic potential and technological quality of meat, dry-cured Parma ham in the Italian heavy pig*, Proc. IV Simposio Internacional do porco Mediterraneo, Evora (Portogallo), 26-28 novembre 1998, «Options méditerranéennes», Serie A, 41, CIHEAM.
- NARDONE C. (1997): *Cibo Biotecnologico. Globalizzazione e rischio di sviluppo agro-alimentare insostenibile*, Ed. Hevelius.
- NATALE M., BISSON C., MONTI G., PELTRAN A., GAROFFO L.P., VALENTINI S., FABRIS C., BERTINO E., COSCIA A., CONTI A. (2004): *Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry*, «Mol. Nutr. Food Res.», 48 (5), pp. 363-369.
- NEEDHAM S. (1936): *Order and life*, Yale Univ. Press, New Haven, Conn.
- NEVEU C., MOLLÉ D., MORENO F. J., MARTIN P., LÉONIL J. (2002): *Heterogeneity of caprine beta-casein elucidated by RP-HPLC/MS: genetic variants and phosphorylations*, «J. Prot. Chem.», 21, pp. 557-567.
- NKRUMAH J.D., LI C., YU J., HANSEN C., KEISLER D.H., MOORE S.S. (2005): *Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behaviour, and measures of carcass merit*, «J. Anim. Sci.», 83, pp. 20-28.
- NOBIS W., REN X., SUCHYTA S.P., SUCHYTA T.R., ZANELLA A.J., COUSSENS P.M. (2003): *Development of a porcine brain cDNA library, EST database, and microarray resource*, «Physiol. Genomics», 16 (1), pp. 153-159.
- O'DONNELL R., HOLLAND J.W., DEETH H.C., ALEWOOD P. (2004): *Milk proteomics*, «Intern. Dairy J.», 14, pp. 1013-1023.
- OKUMURA N., HASHIDA-OKUMURA A., KITA K., MATSUBAE M., MATSUBARA T., TAKAO T., NAGAI K. (2005): *Proteomic analysis of slow-and fast-twitch skeletal muscles*, «Proteomics», 5 (11), pp. 2896-906.
- ORLANDO V. (1998): *La memoria storica nelle cellule: controllo epigenetico e struttura della cromatina in Drosophila*, «BioTec», 5, pp. 25-32.
- PADDISON P.J., CAUDY A.A., HANNON G.J. (2002a): *Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells*, «PNAS», 99, pp. 1443-1448.
- PADDISON P.J., CAUDY A.A., BERNSTEIN E., HANNON G.J., CONCKLIN D.S. (2002b): *Short hairpin RNAs (shRNA) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*, «Genes Dev.», 16, pp. 948-958.
- PADDISON P.J., SILVA J.M., CONCKLIN D.S., SCHLABACH M., LI M., ARULEBA S., BALIJA V., O'SHAUGHNESSY A., GNOJ L., SCOBIE K., CHANG K., WESTBROOK T., CLEARY M., SACHIDANANDAM R., MCCOMBIE W.R., ELLEDGE STEPHEN J., HANNON G.J. (2004): *A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals*, «Nature», 428, pp. 427-431.
- PAGEL M., KRAKAUER D.C. (1996): *Prions and the new molecular phenetics*, «Tr. Ecol. Evol.», 11, pp. 487-488.
- PAGNACCO G. (1989): *La valutazione genetica degli individui*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 81-90.
- PAGNACCO G. (2004): *Genetica animale applicata*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- PAGNACCO G., BOLLA P., NICOLIG V., CRIMELLA C., RAMPILI M. (1983): *Relazioni tra polimorfismi proteici del latte, parametri ambientali ed attitudine alla caseificazione: osservazioni preliminari*, Atti V Congr. Naz. ASPA, Gragnano del Garda (BS), 4-9 giugno, p. 453.
- PAROLARI G., VIRGILI R., SCHIVAZAPPA C. (1994): *Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in drycured hams normal and defective texture*, «Meat

- Sci.», 35, pp. 117-122.
- PERSUY M.A., PRINTZ C., MEDRANO J.F., MERCIER J. C. (1996): *One mutation might be responsible for the absence of beta-casein in two breeds of goats*, «Anim. Genet.», 27, p. 96.
- PERSUY M.A., PRINTZ C., MEDRANO J.F., MERCIER J.C. (1999): *A single nucleotide deletion resulting in a premature stop codon is associated with marked reduction of transcripts from a goat beta-casein null allele*, «Anim. Genet.», 30, pp. 444-451.
- PICARD B., BOULEY J., CASSAR-MALEK I., BERNARD C., RENAND G., HOCQUETTE J.F. (2005): *Proteomics applied to the analysis of bovine muscle hypertrophy*, in Hocquette J.F., Gigli S. (Eds.), *Indicators of milk and beef quality*, «EAAP», Publ. n. 112, pp. 379-390.
- PICARIELLO G., DE MARTINO A., MAMONE G., FERRANTI P., ADDEO F., FACCIA M., SPAGNA MUSSO S., DI LUCCIA A.M. (2006): *Proteomic study of muscle sarcoplasmic proteins using AUT-PAGE / SDS-PAGE as two-dimensional gel electrophoresis*, «J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.», 833 (1), pp. 101-108.
- PILLA A.M. (1977): citato da Matassino D. (1978).
- PILLA A.M. (1989a): *Elementi di metodologia statistica*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 35-48.
- PILLA A.M. (1989b): *Concetti di genetica*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 49-73.
- PILLA A.M. (2002): *Valutazione genetica e scelta degli animali*, Edagricole, Bologna.
- PILLA F. (2006): *Confronto dell'espressione genica (mRNA) in fenotipi estremi: Casertana e Large White durante lo sviluppo e alla macellazione*, Seminario progetto FIRB "Identificazione e analisi dell'espressione dei geni nel suino per lo studio e il miglioramento della produzione e della qualità della carne", Bologna, 27 ottobre 2006.
- PINARBASI E., ELLIOT J., HORNBY D.P. (1996): *Activation of a yeast pseudo DNA methyl-transferase by deletion of a single amino acid*, «J. Mol. Biol.», 257, pp. 804-13.
- PIRISI A., PIREDDA G., PAPOFF C.M., DI SALVO R., PINTUS S., GARRO G., FERRANTI P., CHIANESE L. (1999): *Effects of sheep as1-casein CC, CD, and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties*, «J. Dairy Res.», 66, pp. 409-419.
- PRINZENBERG E.M., GUTSCHER K., CHESSA S., CAROLI A., ERHARDT G. (2005): *Caprine kappa-Casein (CSN3) Polymorphism: New Developments in Molecular Knowledge*, «J. Dairy Sci.», 88 (4), pp. 1490-1498.
- PRUD'HOMME B., GOMPEL N., ROKAS A., KASSNER V.A., WILLIAMS T.M., YEH S-D., TRUE J.R., CARROLL S.B. (2006): *Repeated morphological evolution through cis-regulatory changes in a pleiotropic gene*, «Nature», 440, pp. 1050-1053.
- PRUSINER S. (1995): *Le malattie da prioni*, «Le Scienze», 319, pp. 22-29.
- PRUSINER S. (2004): *Sconfiggere la mucca pazza*, «Le Scienze», 433, pp. 36-44.
- RAIBLE F., RAIBLE K.T., OSOEGAWA K., WINCKER P., JUBIN C., BALAVOINE G., FERRIER D., BENES V., DE JONG P., WEISSENBACH J., BORK P., ARENDT D. (2005): *Vertebrate-Type Intron-Rich Genes in the Marine Annelid Platynereis dumerili*, «Science», 310, pp. 1325-1326.
- RAMPILLI M., LOCCI F., BARDIN M.G., BOLLA P., CAROLI A. (1992): *Stabilità termica del siero di latte ovino: effetto del genotipo β -lattoglobulinico*, Atti XXVII Simp. Int. Zoot., pp. 167-170.
- RAMUNNO L., MARIANI P., PAPPALARDO M., RANDO A., CAPUANO M., DI GREGORIO P., COSENZA G. (1995): *A major-effect gene for β -casein content in goat milk*, Atti XI Congr. Naz. ASPA, Grado (GO), Italia, pp. 185-186.
- RAMUNNO L., COSENZA G., PAPPALARDO M., LONGOBARDI E., GALLO D., PASTORE N., DI GREGORIO P., RANDO A. (2001a): *Characterization of two new alleles at the goat CSN1S2 locus*, «Anim. Genet.», 32, pp. 264-268.
- RAMUNNO L., LONGOBARDI E., PAPPALARDO M., RANDO A., DI GREGORIO P., COSENZA

- G., MARIANI P., PASTORE N., MASINA P. (2001b): *An allele associated with a non detectable amount of alpha2-casein in goat milk*, «Anim. Genet.», 32, pp. 19-26.
- RAMUNNO L., COSENZA G., RANDO A., PAUCIULLO A., ILLARIO R., GALLO D., DI BERNARDINO D., MOSINA P. (2005): *Comparative analysis of gene sequence of goat CSN1S1 F and N alleles and characterization of CSN1S1 transcript variants in mammary gland*, «Gene», 345 (2), pp. 289-99.
- RANGEL-FIGUEIREDO T., IANNUZZI L. (1993): *Frequency and distribution of rob (1;29) in three Portuguese cattle breeds*, «Hereditas», 119, pp. 233-237.
- RASSOULZADEGAN M., GRANDJEAN V., GOUNON P., VINCENT S., GILLOT I., CUZIN F. (2006): *RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse*, «Nature», 441, pp. 469-474.
- REES M.P., TROUT G.R., WARNER R.D. (2003): *Tenderness of pork m. longissimus thoracis et lumborum after accelerated boning. Part I. Effect of temperature conditioning*, «Meat Sci.», 61, pp. 205-214.
- RENAND G., PICARD B., TOURAILLE C., BERGE P. (2001): *Relationship between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls*, «Meat Sci.», 59, pp. 49-60.
- RESSOM H., WANG D., VARGHESE R., REYNOLDS R. (2003): *Fuzzy logic-based gene regulatory network*, The IEEE International Conference on Fuzzy Systems, Goerlitz (Germany), 10-12 september 2003.
- RICHT J.A., KASINATHAN P., HAMIR A.N., CASTILLA J., SATHIYASEELAN T., VARGAS F., SATHIYASEELAN J., WU H., MATSUSHITA H., KOSTER J., KATO S., ISHIDA I., SOTO C., ROBL J.M., KUROIWA Y. (2006): *Production of cattle lacking prion protein*, «Nat. Biotechnol.», 25, pp. 132-138.
- ROLLO C.D. (1994): *Phenotypes: their epigenetic, ecology and evolution*, Chapman and Hall, London.
- RONCADA P., GAVIRAGHI A., LIBERATORI S., CANAS B., BINI L., GREPPi G.F. (2002): *Identification of caseins in goat milk*, «Proteomics», 2, pp. 723-726.
- RONCOLETTA M., SILVA CARVALHO MORANI E., ESPER C.R., BARNABE V.H., FRANCESCHINI P.H. (2006): *Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes*, «Anim. Reprod. Sci.», 91, pp. 77-87.
- ROSSITER M.C. (1996): *Incidence and consequences of inherited environmental effects*, «Annu. Rev. Ecol. Syst.», 27, pp. 451-476.
- RUBIN H.M., YANDEIL M.D., WORTMAN J.R., MIKLOS G.L.G., NELSON C.R., HARIHARAN I.K., FORTINI M.E., LI P.W., APWEILER R., FLEISHMANN W., CHERRY J.M., HANIKOFF S., SKUPSKI M.P., MISRA S., ASHBURNER M., BIRNEY E., BOGUSKI M.S., BRODY T., BROKSTEIN P., CELNIKER S.E., CHERVITZ S.A., COATES D., CRAVCHIK A., GABRIELIAN A., GALLE R.F., GELBART W.M., GEORGE R.A., GOLDSTEIN L.S., GONG F., GUAN P., HARRIS N.L., GEORGE R.A., GOLDSTEIN L.S., GONG F., GUAN P., HARRIS N.L., HAY B.A., HOSKINS R.A., LI J., LI Z., HYNES R.O., JONES S.J., KUEHL P.M., LEMAITRE B., LITTLETON J.T., MORRISON D.K., MUNGALL C., O'FARREL P.H., PICKERAL O.K., SHUE C., VOSSHALL L.B., ZHANG J., ZHAO Q., ZHENG X.H., LEWIS S. (2000): *Comparative Genomics of the Eukaryotes*, «Science», 287 (5461), pp. 2204-2215.
- RUBINO R., DELL'AQUILA S., BORDI A., DI TARANTO F.P., MATASSINO D. (1975): *Sincronizzazione degli estri e quadro sieroproteico in ovini di razza Gentile di Puglia*, «Prod. Anim.», 14 (2), pp. 41-54.
- RUCKEBUSCH Y. (1983): *Stati di sonno negli animali domestici: variazioni spontanee e provocate*, Rassegna di Scienze Veterinarie 1, pp. 7-20.
- RUCKEBUSCH Y., GAUJOUX M. (1976): *Sleep-inducing effect of a high-protein diet in sheep*,

- «Physiol. Behav.», 17, pp. 9-12.
- RUSSO V. (1989): *I suini ibridi*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 183-189.
- RUSSO V., FONTANESI L. (2001): *Il miglioramento genetico animale: potenzialità dei metodi tradizionali e prospettive della genetica molecolare*, «Zoot. Nutr. Anim.», 27, pp. 253-284.
- RUSSO V., DAVOLI R., FONTANESI L., ZAMBONELLI P., NANNI COSTA L., LO FIEGO D.P., CAGNAZZO M., MILC J. (2000): *Ricerca di marcatori in geni candidati per il miglioramento della produzione e della qualità della carne suina*, Atti Giornata di Studio "Identificazione e utilizzazione di geni che influenzano la variabilità delle caratteristiche di interesse economico negli animali domestici", Pisa, 6 giugno 2000, pp. 40-56.
- RUSSO V., DAVOLI R., NANNI COSTA L., ZAMBONELLI P., FONTANESI L., BIGI D., COLOMBO M., SCHIAVINA S., BERETTI F., TASSONE F. (2006): *Identificazione e analisi dell'espressione dei geni nel suino per lo studio e il miglioramento della produzione e della qualità della carne*, Seminario progetto FIRB "Identificazione e analisi dell'espressione dei geni nel suino per lo studio e il miglioramento della produzione e della qualità della carne", Bologna, 27 ottobre 2006.
- RUTHERFORD S.L., LINDQUIST S. (1998): *Hsp90 as a capacitor for morphological evolution*, «Nature», 396, pp. 336-342.
- SACCHI P., CHessa S., BUDELLI E., BOLLA P., CERIOTTI G., SOGLIA D., RASERO R., CAUVIN E., CARIOLI A. (2005): *Casein haplotype structure in Five Italian Goat Breeds*, «J. Dairy Sci.», 88, pp. 1561-1568.
- SARÀ M. (1993): *Biological evolution: an holistic organism-centered approach* «Riv. Biol./Biol Forum», 86, pp. 347-359.
- SARÀ M. (1998): *Innovation and specialization in evolutionary trends*, «Riv. Biol./Biol Forum», 91, pp. 247-272.
- SARÀ M. (2002): *L'integrazione di genotipo e fenotipo alle soglie del 2000*, «Systema naturae», 4, pp. 181-208.
- SARÀ M. (2005): *L'evoluzione costruttiva*, Ed. UTET, Torino.
- SARÀ M., BAVESTRELLO G., CATTANEO-VIETTI R., CERRANO C. (1998): *Endosymbiosis in Sponges: relevance for epigenesis and evolution*, «Symbiosis», 25, pp. 57-70.
- SCAFFIDI P., MISTELI T. (2005): *Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome*, «Nat. Med.», 11, pp. 440-445.
- SCARDELLA P. (1989): *Metodi di selezione*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 75-90.
- SCHIEBEL T., BUCHNER J. (2006): *Protein aggregation as a cause for disease*, «Handb. Exp. Pharmacol.», 172, pp. 199-219.
- SCHELLER M., HUELSKEN J., ROSEMBAUER F., TAKETO M. M., BIRCHMEIER W., TENEN D. G., LEUTZ A. (2006): *Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation*, «Nat. Immunol.», 7, pp. 1037-1047.
- SCHENA M., SHALON D., DAVIS R.W., BROWN P.O. (1995): *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*, «Science», 270, pp. 467-470.
- SCHENKEL F.S., MILLER S.P., YE X., MOORE S.S., NKUMAH J.D., LI C., YU J., MANDELL I.B., WILTON J.W., WILLIAMS J.L. (2005): *Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle*, «J. Anim. Sci.», 83, pp. 2009-2020.
- SCHMALHAUSEN I.I. (1949): *Factors of evolution*, Blakiston, Philadelphia.
- SEAKAR N., MARTIN E. F-Z., RAUL U., JOHANNES D.V. (2006): *A novel functional interaction between the Sp1-like protein KLF13 and SREBP-Sp1 activation complex underlies regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Promoter function*, «J. Biol. Chem.», 281

- (6), pp. 3040-3047.
- SELLIERS P. ET AL. (1974): citato da Matassino D. (1978).
- SEO K., BEEVER J.E. (2001): *Monitoring gene expression in swine skeletal muscle*, Abstracts for the Plant and Animal Genomes IX Conference, January, W207.
- SFORZA S., PIGAZZANI A., MOTTI M., PORTA C., VIRGILI R., GALAVERNA G., DOSSENA A., MARCHELLI R. (2001): *Oligopeptides and free amino acids in Parma hams of known cathepsin B activity*, «Food Chem.», 75, pp. 267-273.
- SHORT R.E., MACNEIL M.D., GROSZ M.D., GERRARD D.E., GRINGS E.E. (2002): *Pleiotropic effects in Hereford, Limousin, and Piedmontese F2 crossbred calves of genes controlling muscularity including the Piedmontese myostatin allele*, «J. Anim. Sci.», 80, pp. 1-11.
- SIJEN T., STEINER F.A., THIJSSEN K.L., PLASTERK R.H.A. (2007): *Secondary siRNAs Result from Unprimed RNA Synthesis and Form a Distinct Class*, «Science», 315, pp. 244-247.
- SILVESTRELLI M. (1989): *Gli equini*, «L'Italia agricola», 126 (3), pp. 171-175.
- SIOLAS D., LERNER C., BURCHARD J., GE W., LINSLEY P.S., PADDISON P.J., HANNON G.J., CLEARY M.A. (2005): *Synthetic shRNA as potent RNAi triggers*, «Nat. Biotechnol.», 23 (2), pp. 227-231.
- SMERALDI E., ZANARDI R., BENEDETTI F., DI BELLA D., PEREZ J., CATALANO M. (1998): *Polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine*, «Molec. Psychiatry», 3, pp. 508-511.
- SMITH T.P., GROSSE W.M., FREKING B.A., ROBERTS A.J., STONE R.T., CASAS E., WRAY J.E., WHITE J., CHO J., FAHRENKRUG S.C., BENNETT G.L., HEATON M.P., LAEGREID W.W., ROHRER G.A., CHITKO-MCKOWN C.G., PERTEA G., HOLT I., KARAMYCHEVA S., LIANG F., QUACKENBUSH J., KEELE J.W. (2001): *Sequence evaluation of four pooled-tissue normalized bovine cDNA libraries and construction of a gene index for cattle*, «Genome Res.», 11, pp. 626-630.
- SOARES M.B., BONALDO M.F., JELENE P., SU L., LAWTON L., EFSTRATIADIS A. (1994): *Construction and characterization of a normalized cDNA library*, Proc. Natl Acad. Sci., USA, 91, pp. 9228-9232.
- SORIA M.R. (2006): *Progetto Genoma e Farmacogenomica*, Tavola Rotonda "Biotecnologie e alimentazione umana", Corso Biotecnologie e Medicina, Torella dei Lombardi (AV), 4 luglio 2006.
- STEFANON B., PALLAVICINI A., DEL MONEGO S. (2006): *Evoluzione dell'espressione genica nel tessuto muscolare durante la crescita in suini di tipo genetico diverso*, Seminario progetto FIRB "Identificazione e analisi dell'espressione dei geni nel suino per lo studio e il miglioramento della produzione e della qualità della carne", Bologna, 27 ottobre 2006.
- STEIN K.K., GO J.C., LANE W.S., PRIMAKOFF P., MYLES D.G. (2006): *Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions*, «Proteomics», 6, pp. 3533-3543.
- STEUNOU A-S., BHAYA D., BATESON M.M., MELENDREZ M.C., WARD D.M., BRECHT E., PETERS J.W., KÜHL M., GROSSMAN A.R. (2006): *In situ analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats*, «PNAS», 103 (7), pp. 2398-2403.
- STRZEŻEK J., WYSOCKY P., KORDAN W., KUKLINSKA M., MOGIELNICKA M., SOLIWODA D., FRASER L. (2005): *Proteomics of boar seminal plasma-current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction*, «Reprod. Biol.», 5 (3), pp. 279-290.
- SUH MI-RA, LEE Y., KIM J.Y., KIM S.K., MOON S-H., LEE J.Y., CHA K-Y., CHUNG H.M., YOON H.S., MOON S.Y., KIM V.N., KIM K.S. (2004): *Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs*, «Dev. Biol.», 270, pp. 488-498.
- SUCCI G., MOLteni L., DE GIOVANNI A. (1980): *Cytogenetical study of some Italian cattle*

- breeds in decreasing or in way of extinction*, 4th Eur. Coll. Cytogenet. Domest. Anim., p. 136.
- SUMMER A., MALACARNE M., MARTUZZI F., MARIANI P. (2002): *Structural and functional characteristics of modenese cow milk in parmigiano-reggiano cheese production*, «Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma», 22, pp. 163-174.
- TAIT S., MARANGHI F., MANTOVANI A. (2006): *Nuovi aspetti dell'analisi del rischio chimico in sicurezza alimentare*, «ARS», 108, pp. 25-30, Dossier.
- TANIGUCHI M., UTSUGI T., OYAMA K., MANNEN H., KOBAYASHI M., TANABE Y., OGINO A., TSUJI S. (2004): *Genotype of stearoyl – CoA desaturase is associated with fatty acids composition in Japanese Black cattle*, «Mammalian Genome Genes and phenotypes», 14, pp. 142-148.
- TAO W., MALLARD B., KARROW N., BRIDLE B. (2004): *Construction and application of a bovine immune-endocrine cDNA microarray*, «Vet. Immunol. Immunop.», 101 (1-2), pp. 1-17.
- TAYLOR R.G., KOOHMARAE M. (1998): *Effects of post-mortem storage on the ultrastructure of the endomysium and myofibrils in normal and callipyge longissimus*, «J. Anim. Sci.», 76 (11), pp. 2811-2817.
- TETTELIN H., MASIGNANI V., CIESLEWICZ M.J., DONATI C., MEDINI D., WARD N.L., ANGIUOLI S.V., CRABTREE J., JONES A.L., DURKIN A.S., DEBOY R.T., DAVIDSEN T.M., MORA M., SCARSELLI M., ROS I.M., PETERSON J.D., HAUSER C.R., SUNDARAM J.P., NELSON W.C., MADUPU R., BRINKAC L.M., DODSON R.J., ROSOVITZ M.J., SULLIVAN S.A., DAUGHERTY S.C., HAFT D.H., SELENGUT J., GWINN M.L., ZHOU L., ZAFAR N., KHOURI H., RADUNE D., DIMITROV G., WATKINS K., O'CONNOR K.J.B., SMITH S., UTTERBACH T.R., WHITE O., RUBENS C.E., GRANDI G., MADOFF L.C., KASPER D.L., TELFORD J.L., WESSELS M.R., RAPPUOLI R., FRASER C.M. (2005): *Genome analysis of multiple pathogenic isolates of Streptococcus agalactiae: implications for the microbial "pan-genome"*, «PNAS», 102 (39), pp. 13950-13955.
- THE CHIMPANZEE SEQUENCING, ANALYSIS CONSORTIUM (2005): *Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome*, «Nature», 437, pp. 69-87.
- THREAGILL D.W., WOMACK J.E. (1990): *Genomic analysis of the major bovine milk protein genes*, «Nucleic Acids Res.», 18 (23), pp. 6935-6942.
- THYGESEN U.H., FARNSWORTH K.D., ANDERSEN K.H., BEYER J.E. (2005): *How optimal life history changes with the community size-spectrum*, «Proc. Biol. Sci.», 272 (1570), pp. 1323-31.
- TRABESINGER-RUEF N., JERMANN T., ZANKEL T., DURRANT B., FRANK G., BENNER S.A. (1996): *Pseudogenes in ribonuclease evolution: a source of new biomacromolecular function?*, «FEBS Letters», 382, pp. 319-322.
- TRIEU-CUOT P., ADDEO F. (1981): *Occurrence of γ -caseins in buffalo milk*, «J. Dairy Res.», 48, p. 311.
- URBAN T., MIKOLÁŠOVÁ R., KUCIEL J., ERNST M., INGR I. (2002): *A study of associations of the H-FABP genotypes with fat and meat production of pigs*, «J. Appl. Genet.», 43 (4), pp. 505-509.
- USHIZAWA K., HERATH C.B., KANEYAMA K., SHIOJIMA S., HIRASAWA A., TAKAHASHI T., IMAI K., OCHIAI K., TOKUNAGA T., TSUNODA Y., TSUJIMOTO G., HASHIZUME K. (2004): *cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period*, «Reprod. Biol. Endocrinol.», 2, pp. 77.
- VAIMAN D., SCHIBLER L., BOURGEOIS F., OUSTRY A., AMIGUES Y., CRIBUI. E.P. (1996): *A genetic linkage map of the male goat genome*, «Genetics», 144, pp. 279-305.
- VALENTINI A., CRISÀ A. (2006): *Metodologie per l'analisi funzionale di mutazioni in geni*

- candidati per la qualità della carne suina*, Seminario progetto FIRB “Identificazione e analisi dell'espressione dei geni nel suino per lo studio e il miglioramento della produzione e della qualità della carne”, Bologna, 27 ottobre 2006.
- VEISETH E., SHACKELFORD S.D., WHEELER T.L., KOOHMARAIE M. (2004): *Indicators of tenderization are detectable by 12 h post-mortem in ovine longissimus*, «J. Anim. Sci.», 82 (5), pp. 1428-1436.
- VELANDER W.H., LUBON H., DROHAN W.N. (1997): *Animali transgenici per la produzione di farmaci*, «Le Scienze», 346, p. 64.
- VELCULESCU V.E., ZHANG L., VOGELSTEIN B., KINZLER K.W. (1995): *Serial analysis of gene expression*, «Science», 270, pp. 484-487.
- WADDINGTON C. H. (1942): *Canalization of development and the inheritance of acquired characters*, «Nature», 150, pp. 563-565.
- WADDINGTON C.H. (1957): *The strategy of the genes*, Allen & Unwin, London.
- WADDINGTON C.H. (1975): *The evolution of an evolutionist*, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
- WAGNER G.P. (1996): *Homology, natural kinds and the evolution of modularity*, «Am. Zool.», 36, pp. 36-43.
- WAGNER G.P., ALTENBERG L. (1996): *Complex adaptations and the evolution of evolvability*, «Evolution», 50, pp. 967-976.
- WALL R.J. (1998): *Biotechnology for the production of modified and innovative animal products; transgenic livestock bioreactors*, Proc. of 8th World Conference on Animal Production, Seoul, 28 June – 4 July 1998, Special Symposium & Plenary Sessions, p. 364.
- WEBB A.J., CARDEN A.E., SMITH C., IMLAH P. (1982): *Porcine stress syndrome in pig breeding*, Proc. of 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Ed. Garsi. Madrid, 5, pp. 588-608.
- WEBB D., CORTÉS-ORTIZ L., ZHANG J. (2004): *Genetic evidence for the coexistence of pheromone perception and full trichromatic vision in Howler monkeys*, «Mol. Biol. and Evol.», 21 (4), pp. 697-704.
- WHEELER T.L., KOOHMAIRE M. (1999): *The extent of proteolysis is independent of sarcomere length in lamb longissimus and psoas major*, «J. Anim. Sci.», 77, pp. 2444-2451.
- WEISMANN A. (1883): *Über das Problem der Vererbung*, Gustav Fisher, Jena.
- WEISMANN A. (1885): *Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung*, Gustav Fisher, Jena.
- WELCH J.J., WAXMAN D. (2003): *Modularity and the cost of complexity*, «Evolution», 57 (8), pp. 1723-1734.
- WITTWER M., FLUCK M., HOPPELER H., MULLER S., DESPLANCHES D., BILLETER R. (2002): *Prolonged unloading of rat soleus muscle causes distinct adaptations of the gene profile*, «FASEB J.», 16, pp. 884-886.
- WOLFFE A.P., MATZKE M.A. (1999): *Epigenetics: regulation through repression*, «Science», 286, pp. 481-486.
- WOOLF J., WANG Y. (2000): *A fuzzy logic approach to analyzing gene expression data*, «Physiol. Genomics», 3, pp. 9-15.
- WRIGHT S. (1968): *Evolution and genetics of populations; a treatise*, University of Chicago Press.
- WRIGHT S. (1980): *Genic and organismic selection*, «Evolution», 34, pp. 825-843.
- YAMADA M., MURAKAMI K., WALLINGFORD J.C., YUKI Y. (2002): *Identification of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry*, «Electrophoresis», 23, pp. 1153-

1160.

- YAO J., BURTON J.L., SAAMA P., SIPKOVSKY S., COUSSENS P.M. (2001): *Generation of EST and cDNA microarray resources for the study of bovine immunobiology*, «Acta Vet. Scand.», 42 (3), pp. 391-405.
- YAO J., COUSSENS P.M., SAAMA P., SUCHYTA S., ERNEST C.W. (2002): *Generation of expressed sequence tags from a normalized porcine skeletal muscle cDNA library*, «Anim. Biotechnol.», 13, pp. 211-222.
- YAO J., REN X., IRELAND J.J., COUSSENS P.M., SMITH T.P., SMITH G.W. (2004): *Generation of a bovine oocyte cDNA library and microarray: Resources for identification of genes important for follicular development and early embryogenesis*, «Physiol. Genomics», 19 (1), pp. 84-92.
- ZAMORE P.D., TUSCHL T., SHARP P.A., BARTEL D.P. (2000): *RNAi double stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*, «Cell», 107, pp. 309-321.
- ZHANG L., GE L., TRAN T., STENN K., PROUTY S.M. (2001): *Isolation and characterization of the human stearyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element*, «Biochem. J.», 357, pp. 183-193.
- ZHAO S., NETTLETON D., LIU W., FITZSIMMONS C., ERNEST C.W., RANEY N.E., TUGGLE C.K. (2003): *cDNA macroarray analyses of differential gene expression in porcine fetal and post-natal muscle*, Abstracts for the Plant and Animal XI Conference, p. 623.
- ZOU P., PINOTSIS N., LANGE S., SONG Y.H., POPOV A., MAVRIDIS I., MAYANS O.M., GAUTEL M., WILMANN M. (2006): *Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk*, «Nature», 439 (7073), pp. 229-233.
- ZUCHT H.D., RAID A.M., ADERMAN K., MAGERT H.J., FORSSMANN W.G. (1995): *Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity*, «FEBS Lett.», 372 (2-3), pp. 185-188.
- ZULLO A., BARONE C.M.A., COLATRUGLIO P., MACRÌ T., MATASSINO D. (1994): *Protein polymorphisms and quanti-qualitative characteristics of milk from Italian Friesian and Brown cows. II. Milk aptitude to cheese making*, «Prod. Anim.», 7, Serie III, pp. 49-84.

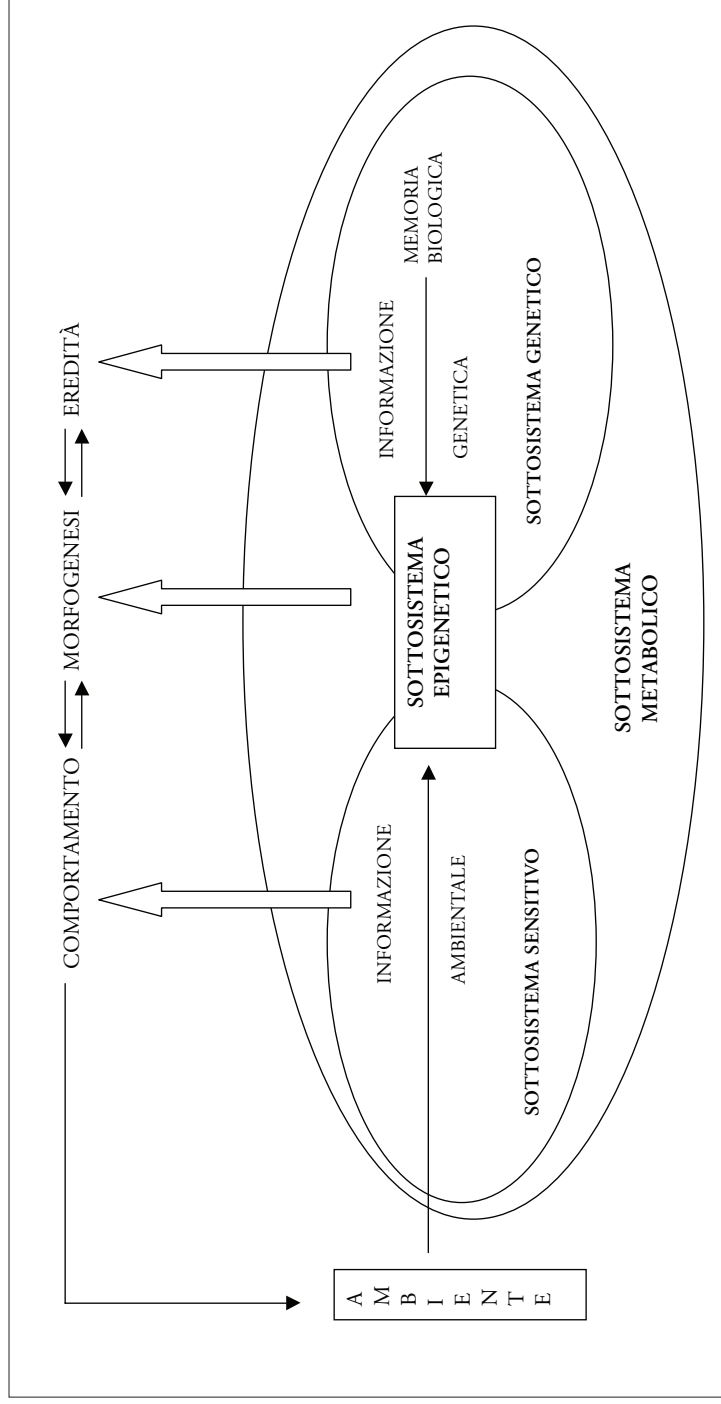


Fig.1 Schematizzazione di un sistema 'entità biologica' (Sarà, 2005; modificata)

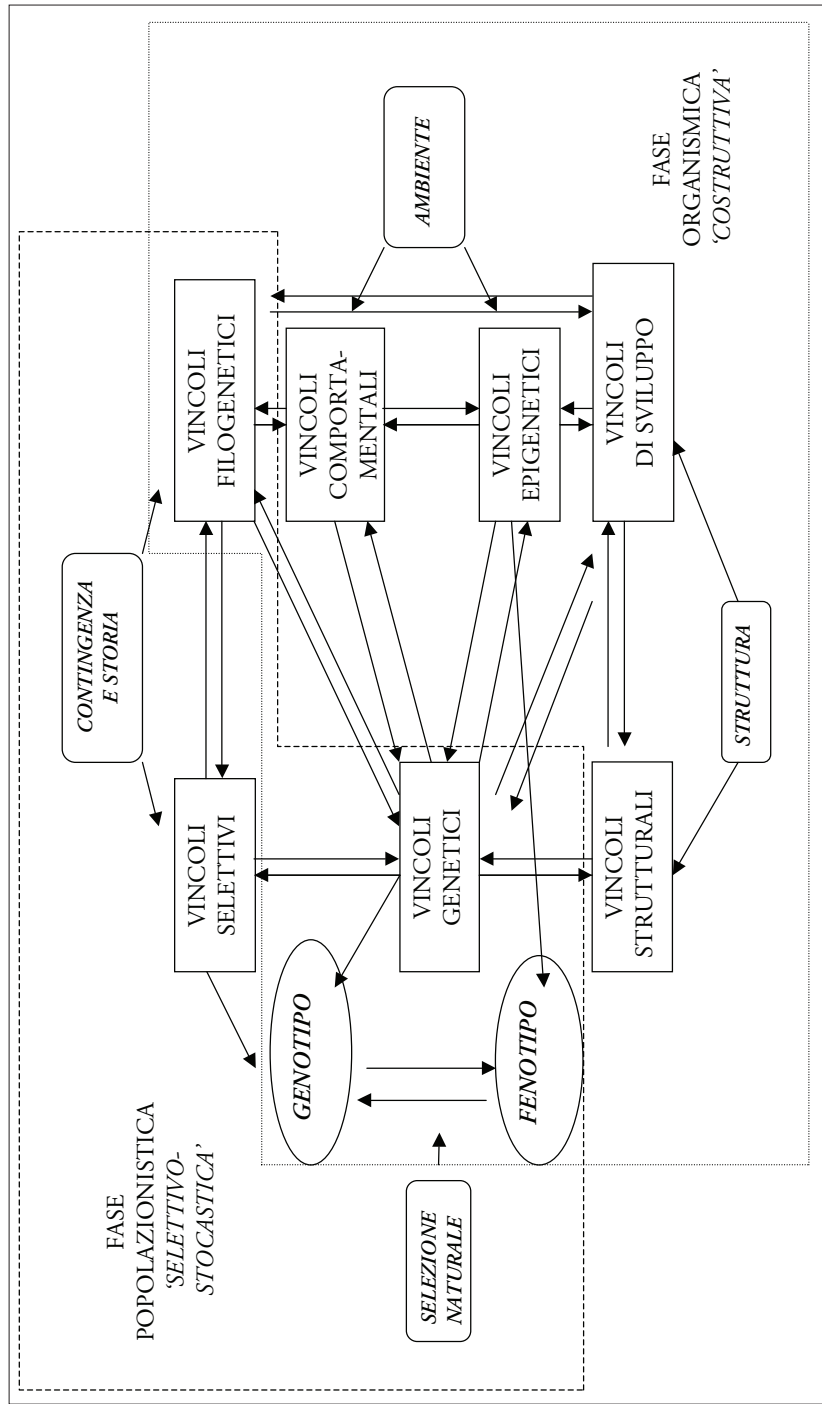


Fig. 2 Rete di 'vincoli' (constraints) e probabile 'sistema operativo' (Sara' 2005; modificata)

Caratteristiche del DNA		Incidenza %	
		12. '05	12. '06
1. Non Ripetitivo	1.1. Esoni	1,3 - 1,4	
	Segmenti codificanti 'polipeptideli' (cosiddetti 'geni').		
	1.1.1. Segmenti 'Housekeeping' → Espresi in tutte le cellule in quanto coinvolti in funzioni 'vitali' .		
	Ubiquitari o costitutivi.		
	1.1.2. Segmenti 'Tessuto-specifici' → Iperespressi in alcuni tessuti e ipoespressi in altri.		
	1.2.1. 'Riboswitch'	32,9 - 32,5	
	Parte di mRNA costituita da 2 componenti: una in grado di legarsi a una specifica proteina o composto chimico, l'altra codificante una proteina.		
	1.2.2. MicroRNA*		
	1.2.2.1 siRNA → 'Censura' l'espressione di un segmento di DNA codificante 'polipeptideli' grazie a un 'complesso di silenziamento' che degrada l'mRNA impedendone la traduzione.		
	1.2.2.2. stRNA → 'Censura' l'espressione di un segmento di DNA codificante 'polipeptideli' grazie a un 'complesso di silenziamento' che inibisce la sintesi della catena polipeptidica a livello di 'ribosoma'.		
	1.2.3. snRNA → 'Costituzione' dello 'spliceosoma' (complesso ribonucleoproteico) che interviene nel processo di splicing del pre-mRNA.		
	1.2.4. snoRNA → 'Partecipazione' alla 'formazione' delle snoRNP (small nucleolar ribonuclear protein = piccole particelle ribonucleoproteiche) costituenti l' 'editeosoma' (complesso ribonucleoproteico coinvolto nell'editing); lo snoRNA funge da 'guida' per l'appaiamento con la sequenza di RNA bersaglio, mentre le proteine catalizzano la modificazione chimica della sequenza dell'RNA.		
	1.2.5. Ribozima → - 'Autoreplicazione' (informativa) - 'Autocatalitica' (self-splicing).		
	Molecola 'strutturalmente' costituita da RNA.		
1.2. Introni			
Segmenti codificanti RNA 'attivo' o 'regolativo'			

* Il *microRNA*, oltre che da introni, può derivare anche dal riarrangiamento di molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA, *double stranded RNA*) *esogene* (a esempio di *origine virale*) oppure *endogene* (di origine *retrotrasposonica*). Il *microRNA* viene trascritto come *microRNA primario* (*pri-microRNA*= *primary miRNA*) a doppio filamento costituito di circa 1.000 nucleotidi; il *pri-microRNA*, a sua volta, viene convertito da una ribonucleasi *dsRNA*-specific (Drosha) in *pre-microRNA* di 60÷110 nucleotidi. Un *pre-microRNA*, tramite un *carrier* proteico (*esportina*), viene veicolato dal nucleo al citoplasma ove subisce un processo di 'maturazione' in un *microRNA* (20÷25 nucleotidi); questo *microRNA* viene inglobato in un complesso 'ribonucleoproteico' detto anche 'complesso di silenziamento' attivo nella sua funzione.

Schema 1 *Esemplificazione dell'organizzazione del genoma umano e incidenza percentuale dei suoi componenti a dicembre 2005 e 2006*

segue schema 1.

Caratteristiche del DNA		Incidenza %			
		12.'05	12.'06		
2. Ripetitivo	2.1. Duplicazioni segmentali**	2.1.1. Intracromosomiale Segmenti di 1.000÷2.000 bp duplicati e localizzati all'interno dello stesso cromosoma.	➔ 'Aumento' della 'instabilità' del genoma; geni di malattie (es. adeno-leucodistrofia).	4,3 - 4,4	
		2.1.2. Intercromosomiale Segmenti di 1.000÷2.000 bp duplicati e localizzati su cromosomi non omologhi.			
	2.2. Satelliti	2.2.1. Microsatellite Brevissimo segmento di DNA (5÷6 nucleotidi) ripetuto in <i>tandem</i> e distribuito uniformemente nel genoma.	➔ Contributo alla 'evoluzione' dei genomi; sede di elevata frequenza di 'delezione' o di 'inserzione' con conseguente riduzione o espansione del numero delle ripetizioni. ➔ Sequenza 'bersaglio' nella ricombinazione omologa.	3,0 - 3,1	
		2.2.2. Minisatellite Breve segmento di DNA (10÷100 nucleotidi) ripetuto in <i>tandem</i> non distribuito uniformemente nel genoma.			
		2.2.3. Macrosatellite Segmento di DNA (centinaia di kilobasi) ripetuto in <i>tandem</i> .			➔ 'Formazione' della eterocromatina costitutiva.
		2.3.1. Pseudogene non processato Copia di un segmento di DNA codificante polipeptide/i (cosiddetto 'gene funzionale') che in seguito a mutazione perde la sua funzione originaria: (a) localizzato sullo stesso cromosoma del cosiddetto 'gene funzionale'; (b) capace di accumulare mutazioni senza recare danno all'organismo; (c) contiene sia 'esoni' che 'introni'.			➔ 'Controllo' della espressione del segmento di DNA 'vero' o 'funzionale'. 'Riparazione' del suddetto segmento ('back-up' DNA = DNA 'di recupero' o 'di emergenza').
	2.3.2. Pseudogene processato Si differenzia dal precedente perché: (a) localizzato su un cromosoma differente da quello su cui si trova il cosiddetto 'gene funzionale' (b) originato in seguito a 'retrotrasposizione' (c) non contiene 'introni' in quanto originato da RNA ('processato').				

** La distribuzione delle 'duplicazioni segmentali' e il rapporto tra duplicazioni intracromosomiali e intercromosomiali variano ampiamente all'interno del genoma; il caso più estremo è rappresentato dal cromosoma Y che possiede un contenuto di 'sequenze duplicate' superiore al 25 % della sua lunghezza.

Schema 1

CROMOSOMA			'POLYPEPTIDE/I'					SEGMENTI DI DNA CODIFICANTI										'NON POLYPEPTIDE/I'					PSEUDOGENI		SNP ³ N (18)
NUMERO (1)	DIMENSIONE (bp) (2)	TUTTI (3)	NOTI 1		DESUNTI 2		TUTTI (8)	MICRO RNA		RNA RIBOSOMIALE		PICCOLO RNA NUCLEARE		PICCOLO RNA NUCLEOLARE		N (15)	% SU (8) (16)								
			N (4)	% SU (3) (5)	N (6)	% SU (3) (7)		N (9)	% SU (8) (10)	N (11)	% SU (8) (12)	N (13)	% SU (8) (14)												
1. Genoma nucleare																									
1	247.249.719	2.313	2.173	93,95	140	6,05	322	42	13,04	42	13,04	178	55,28	60	18,63	936.633	51								
2	242.951.149	1.481	1.387	93,65	94	6,35	200	23	11,50	24	12,00	116	58,00	37	18,50	871.755	40								
3	199.501.827	1.158	1.115	96,29	43	3,71	164	24	14,63	21	12,80	89	54,27	30	18,29	721.903	45								
4	191.273.063	887	831	93,69	56	6,31	131	21	16,03	13	9,92	81	61,83	16	12,21	752.388	32								
5	180.857.866	985	924	93,81	61	6,19	133	19	14,29	22	16,54	74	55,64	18	13,53	662.091	23								
6	170.899.992	1.132	1.104	97,53	28	2,47	140	17	12,14	16	11,43	82	58,57	25	17,86	722.671	81								
7	158.821.424	1.062	998	93,97	64	6,03	136	31	22,79	14	10,29	64	47,06	27	19,85	612.977	48								
8	146.274.826	804	732	91,04	72	8,96	114	18	15,79	14	12,28	61	53,51	21	18,42	564.793	19								
9	140.273.252	959	922	96,14	37	3,86	95	26	27,37	11	11,58	43	45,26	15	15,79	552.064	66								
10	135.374.737	854	820	96,02	34	3,98	105	16	15,24	17	16,19	64	60,95	8	7,62	571.051	52								
11	134.452.384	1.452	1.363	93,87	89	6,13	136	26	19,12	19	13,97	51	37,50	40	29,41	555.234	61								
12	132.349.534	1.138	1.075	94,46	63	5,54	135	22	16,30	15	11,11	77	57,04	21	15,56	522.830	38								
13	114.142.980	368	359	97,55	9	2,45	64	14	21,88	9	14,06	29	45,31	12	18,75	398.645	41								
14	106.368.585	737	677	91,86	60	8,14	162	50	30,86	14	8,64	42	25,93	56	34,57	342.073	52								
15	100.338.915	722	659	91,27	63	8,73	159	15	9,43	6	3,77	43	27,04	95	59,75	325.830	34								
16	88.827.254	964	917	95,12	47	4,88	80	14	17,50	13	16,25	39	48,75	14	17,50	357.266	25								
17	78.774.742	1.301	1.209	92,93	92	7,07	115	29	25,22	10	8,70	47	40,87	29	25,22	305.435	56								
18	76.117.153	322	287	89,13	35	10,87	68	9	13,24	5	7,35	42	61,76	12	17,65	307.417	8								
19	63.811.651	1.477	1.432	96,95	45	3,05	103	71	68,93	6	5,83	14	13,59	12	11,65	237.101	45								
20	62.435.964	627	612	97,61	15	2,39	72	16	22,22	8	11,11	32	44,44	16	22,22	315.702	29								
21	46.944.323	290	270	93,10	20	6,90	24	6	25,00	3	12,50	10	41,67	5	20,83	163.398	9								
22	49.691.432	582	523	89,86	59	10,14	51	20	39,22	2	3,92	18	35,29	11	21,57	196.344	24								
X	154.913.754	915	880	96,17	35	3,83	166	58	34,94	19	11,45	64	38,55	25	15,06	413.743	80								
Y	57.772.954	113	90	79,65	23	20,35	25	2	8,00	6	24,00	14	56,00	3	12,00	50.447	2								
1. tutti	3.080.419.480	22.643	21.359	94,33	1.284	5,67	2.900	589	20,31	329	11,34	1.374	47,38	608	20,97	11.459.791	961								
2. Genoma mitocondiale																									
3. Genoma nucleare + mitocondiale																									
2.	16.571	15	13	0,00	0	0,00	2	0,00	2	100,00	0	0,00	0	0,00	0	0	0								
3. 1 + 2	3.080.436.051	22.658	21.372	91,77	1.284	5,67	2.902	589	20,30	331	11,41	1.374	47,35	608	20,95	11.459.791	961								
1 Il segmento di DNA viene definito 'noro' quando il suo prodotto proteico o il segmento di DNA complementare (cDNA) rientra nei <i>database</i> internazionali specie-specifici: UniProt (<i>Universal Protein Resource</i>), RefSeq (<i>Reference sequence</i>), UniProt/TrEMBL (<i>Universal protein resource/Translated EMBL database</i>).																									
2 Il segmento di DNA viene definito 'desunto' quando è caratterizzato sulla base della similarità scaturita dal confronto o con una proteina o con una sequenza di DNA complementare (cDNA) o con una sequenza nucleotidica EST (<i>Expressed Sequence tag</i>) di una specie strettamente correlata dal punto di vista filogenetico.																									
3 SNPs: <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> = polimorfismo del singolo nucleotide.																									

1 Il segmento di DNA viene definito 'noto' quando il suo prodotto proteico o il segmento di DNA complementare (cDNA) rientra nei *databases* internazionali specie-specifici: UniProt (*Universal Protein Resource*), RefSeq (*Reference sequence*), UniProt/TrEMBL (*Universal protein resource/Translated EMBL database*).

2 Il segmento di DNA viene definito 'desunto' quando è caratterizzato sulla base della similarità scaturita dal confronto o con una proteina o con una sequenza di DNA complementare (cDNA) o con una sequenza nucleotidica EST (*Expressed Sequence tag*) di una specie strettamente correlata dal punto di vista filogenetico.

3 SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms* = polimorfismo del singolo nucleotide.

Tab. 1 Genoma umano. Dimensione in paia di basi (bp), numero di segmenti di DNA codificanti 'polipeptidici' ('geni') 'noti' e 'desunti' e 'non polipeptidici', pseudogeni processati e SNP, disintimamente per cromosoma (Fonte: 'database Ensembl', dicembre 2006)

EUCARIOTI	DIMENSIONE DEL GENOMA IN PAIA DI BASI (BP)									
	STIMATO				SEQUENZIATO					
	DICEMBRE		VARIAZIONE		DICEMBRE		VARIAZIONE			
	2005	2006	N	%	2005	2006	N	N	(7) - (6)	%
	N (2)	N (3)	(3) - (2) (4)	(4)/(2) (5)	N (6)	N (7)			(8)	(8)/(6) (9)
(1)										
1. MAMMIFERI										
I.1. BOS TAURUS (BOVINO) ¹	2.618.420.681	2.642.506.507	24.085.826	0,92	1.741.208.718	3.144.226.132			1.403.017.414	80,58
I.2. CANIS CANIS (CANE) ¹	2.385.199.138	2.384.996.543	-202.595	-0,01	2.359.708.512	2.531.673.953			171.965.441	7,29
I.3. HOMO SAPIENS SAPIENS (UOMO)	3.272.187.692	3.253.037.807	-19.149.885	-0,59	3.076.798.458	3.093.120.360			16.321.902	0,53
I.4. MACACHUS MULATTA (MACACO) ¹	1.086.312.961	3.093.871.206	2.007.558.245	184,80	2.690.992.326	3.097.179.960			406.187.634	15,09
I.5. MUS MUSCULUS (TOPO) ¹	2.267.775.209	2.661.205.088	393.429.879	17,35	2.604.449.128	2.567.242.967			-37.206.161	-1,43
I.6. ORYCTOLAGUS CUNICULUS (CONIGLIO) ^{1,2}	0	2.076.044.328	2.076.044.328	-	0	3.473.602.370			3.473.602.370	-
I.7. PAN TROGLODYTES (SCIMPANZE) ¹	2.733.948.177	2.928.563.828	194.615.651	7,12	2.733.223.211	3.350.417.645			617.194.434	22,58
I.8. RATTUS RATTUS (RATTO) ¹	2.718.897.321	2.507.066.654	-211.830.667	-7,79	2.482.775.711	2.718.897.321			236.121.610	9,51
2. PESCI										
2.1. DANIO RERIO (PESCE ZEBRA)	1.688.467.974	1.762.844.710	74.376.736	4,40	1.630.263.986	1.626.044.047			-4.219.939	-0,26
2.2. TAKIFUGU RUBRIPES (PESCE FUGU)	393.296.343	393.296.343	0	0,00	393.296.343	393.296.343			0	0,00
2.3. TETRAODON NIGROVIRIDIS (PESCE PALLA) ²	0	342.403.326	342.403.326	-	0	402.240.326			402.240.326	-
3. UCCELLI										
3.1. G. GALLUS (GALLO E GALLINA)	1.054.197.620	1.050.947.331	-3.250.289	-0,31	1.053.973.890	1.100.480.441			46.506.551	4,41
4. INSETTI										
4.1. ANOPHELES GAMBIAE (ZANZARA)	278.253.050	278.253.050	0	0,00	278.215.782	273.093.681			-5.122.101	-1,84
4.2. APIS MELLIFERA (APE)	228.567.597	228.567.597	0	0,00	224.720.104	224.720.104			0	0,00
4.3. DROSOPHILA MELANOGASTER (MOSCIERINO DELLA FRUTTA)	132.576.936	132.576.936	0	0,00	132.571.620	132.576.936			5.316	0,004
5. NEMATODI										
5.1. CAENORHABDITIS ELEGANS (NEMATODE)	100.292.134	103.015.908	2.723.774	2,72	100.285.598	100.281.235			-4.363	-0,004

¹ La dimensione del genoma sequenziato supera quella del genoma stimato a causa di possibili assemblaggi non definitivi interessanti il DNA ripetitivo.

² Le specie *Oryctolagus cuniculus* e *Tetraodon nigroviridis* sono state inserite nel ‘*database Ensembl*’ a partire dall’anno 2006.

Tab. 2 Alcuni eucarioti. Dimensione del genoma e sua variazione percentuale rispetto all’anno 2005 (Fonte: ‘database Ensembl’, dicembre 2005 e 2006)

SEGMENTI DI DNA CODIFICANTI POLIPEPTIDE/1 ('GENI')													
EUCARIOTI	NOTI ¹				DESUNTI ²				TUTTI (NOTI + DESUNTI)				
	DICEMBRE		VARIAZIONE		DICEMBRE		VARIAZIONE		DICEMBRE		VARIAZIONE		
	2005	2006	N	%	2005	2006	N	%	2005	2006	N	%	
	N	N	(3) - (2)	(4)/(2)	N	N	(7) - (6)	(8)/(6)	N	N	(11) - (10)	(12)/(10)	(13)/(10)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
1. MAMMIFERI													
I.1. BOS TAURUS (BOVINO)	3.972	5.790	1.818	45,77	19.259	17.441	-1.818	-9,44	23.231	23.231	0	0,00	
I.2. CANIS CANIS (CANE)	7.977	14.121	6.144	77,02	10.224	5.193	-5.031	-49,21	18.201	19.314	1.113	6,12	
I.3. HOMO SAPIENS SAPIENS (UOMO)	20.134	21.372	1.238	6,15	1.878	1.284	-594	-31,63	22.012	22.656	644	2,93	
I.4. MACACHUS MULATTA (MACACO)	729	874	145	19,89	20.941	21.171	230	1,01	21.670	22.045	375	1,73	
I.5. MUS MUSCULUS (TOPO)	20063	22992	2929	14,60	5.550	1.450	-4100	-73,87	25.613	24442	-1171	-4,57	
I.6. ORYCTOLAGUS CUNICULUS (CONIGLIO) ³	-	495	-	-	-	14.946	-	-	-	15441	-	-	
I.7. PAN TROGLODYTES (SCIMPANZE)	13.897	994	-12.903	-92,85	8.578	20.241	11.663	135,96	22.475	21.235	-1.240	-5,52	
I.8. RATTUS RATTUS (RATTO)	13.571	16.468	2.897	21,35	8.381	6.841	-1.540	-18,37	21.952	23.309	1.357	6,18	
2. PESCI													
2.1. DANIO RERIO (PESCE ZEBRA)	9.923	15.959	6.036	37,82	12.954	8.989	-3.965	-100,00	22.877	24.948	2.071	9,05	
2.2. TAKIFUGU RUBRIPES (PESCE FUGU)	719	719	0	0,00	21.289	21.289	0	0,00	22.008	22.008	0	0,00	
2.3. TETRAODON NIGROVIRIDIS (PESCE PALLA) ³	-	28.005	-	-	0	0	0	-	-	28.005	-	-	
3. UCCELLI													
3.1. G. GALLUS (GALLO E GALLINA)	3.914	10.197	6.283	160,53	14.716	6.518	-8.198	-55,71	18.630	16.715	-1.915	-10,28	
4. INSETTI													
4.1. ANOPHELES GAMBIAE (ZANZARA)	788	1.163	375	47,59	12.114	12.114	0	0,00	14.364	13.277	-1.087	-7,57	
4.2. APIS MELLIFERA (APE)	3.239	3.239	0	0,00	13.576	13.576	0	0,00	13.448	16.815	3.367	25,04	
4.3. DROSOPHILA MELANOGASTER (MOSCIERINO DELLA FRUTTA)	13.767	4.751	-9.016	-65,49	9.288	9.288	0	0,00	13.767	14.039	272	1,98	
5. NEMATODI													
5.1. CAENORHABDITIS ELEGANS (NEMATODE)	19.723	20.060	337	1,71	-	-	-	-	19.723	20.060	337	1,71	

¹ Il segmento di DNA viene definito 'noto' quando il suo prodotto proteico o il segmento di DNA complementare (cDNA) rientra nei *database* internazionali specie-specifici: UniProt (*Universal Protein Resource*), RefSeq (*Reference sequence*), UniProt/TrEMBL (*Universal protein resource/Translated EMBL database*).

² Il segmento di DNA viene definito 'desunto' quando identificato sulla base della similarità scaturita dal confronto con una proteina o una sequenza di DNA complementare (cDNA) o una sequenza nucleotidica EST (*Expressed Sequence tag*) di una specie strettamente correlata dal punto di vista filogenetico.

³ Le specie *Oryctolagus cuniculus* e *Tetraodon nigroviridis* sono state inserite nel '*database Ensembl*' a partire dall' anno 2006.

Tab. 3 *Alcuni eucarioti. Numero di segmenti di DNA codificanti 'polipeptideli' ('geni') 'noti' e 'desunti': variazione percentuale rispetto all'anno 2005 (Fonte: 'database Ensembl', dicembre 2005 e 2006)*

GENERE	SPECIE	CELLULA/TESSUTO/ORGANO	OLIGONUCLEOTIDI O CDNA (COMPLEMENTARY DNA) UTILIZZATI, N	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
BOS	TAURUS	Tessuto immunitario-endocrino	167	Tao et al., 2004
		Leucociti	< 1000	Yao et al., 2001
		Ovaio	2.000	Yao et al., 2004
		Macrofagi	5.026	Jensen et al., 2006
		Milza, placenta, cervello	3.800	Band et al., 2002
		Placenta e utero	4.000	Ushizawa et al., 2004
		Muscolo, tessuto adiposo	9.222	Lehnert et al., 2004
GALLUS	GALLUS	24 Tessuti (9 embrionali a vari stadi di sviluppo e 15 adulti)	~ 13.000	Burnside et al., 2005
OVIS	ARIES	27 Tipi di tessuto	20.000	Keane et al., 2006
SUS	SCROPHA	Muscolo scheletrico	< 1000	Yao et al., 2002
		Muscolo scheletrico fetale e post-natale	768	Ernst et al., 2002
			327	Zhao et al., 2003
			3.500	Bai et al., 2003
		Cervello	< 1000	Nobis et al., 2003
		Tessuti vari a diversi stadi di sviluppo	26.868	Li, 2000

Tab. 4 *Microarray. Numero di oligonucleotidi o di cDNA (complementary DNA) utilizzati a oggi per verificare la loro espressione in alcune cellule, tessuti o organi di alcune specie animali di interesse zootecnico*

EUCARIOTI	EST		
	NUMERO	RILASCIO	
		DATA	NUMERO
1. MAMMIFERI			
1.1. BOS TAURUS (BOVINO)	201.174	18.06.06	12.0
1.2. CANIS CANIS (CANE)	97.227	17.06.06	7.0
1.3. HOMO SAPIENS SAPIENS (UOMO)	1.083.935	4.07.06	17.0
1.4. MUS MUSCULUS (TOPO)	990.637	3.07.06	16.0
1.5. RATTUS RATTUS (RATTO)	184.194	21.06.06	14.0
1.6. SUS SCROFA (MAIALE)	153.863	20.06.06	12.0
2. PESCI			
2.1. DANIO RERIO (PESCE ZEBRA)	150.322	23.06.06	17.0
3. UCCELLI			
3.1. GALLUS GALLUS (GALLO E GALLINA)	189.251	17.06.06	11.0
4. INSETTI			
4.1. ANOPHELES GAMBIAE (ZANZARA)	36.783	1.02.05	8.0
4.2. APIS MELLIFERA (APE)	11.324	4.05.04	4.0
4.3. DROSOPHILA MELANOGASTER (MOSCHERINO DELLA FRUTTA)	42.538	14.06.06	11.0
5. NEMATODI			
5.1. CAENORHABDITIS ELEGANS	30.919	22.09.04	9.0

Tab. 5 Alcuni eucarioti. Numero di sequenze EST (expressed sequence tag= etichette di sequenze espresse) identificate nel genoma (Fonte: database TIGR- GENE INDEX)

LOCUS	BOVINI				CAPRINI				OVINI			
	VARIANTI				VARIANTI				VARIANTI			
	GENETICHE		PROTEICHE		GENETICHE		PROTEICHE		GENETICHE		PROTEICHE	
	N	DENOMINAZIONE	N	DENOMINAZIONE	N	DENOMINAZIONE	N	DENOMINAZIONE	N	DENOMINAZIONE	N	DENOMINAZIONE
ALFA S1- CASEINA	8	A, B, C, D, E, F, G, H	8	A, B, C, D, E, F, G, H	17	A, B1, B2, B3, B4, C, D, E, F, G, H, I, L, M, 01, 02, N	17	A, B1, B2, B3, B4, C, D, E, F, G, H, I, L, M, 01, 02, N	6	A, B, C, D (Welsh), E, F	5	A, B, C, D (Welsh), E
ALFA S2- CASEINA	4	A, B, C, D	4	A, B, C, D	7	A, B, C, D, E, E ₀	5	A, B, C, E, F	3	A, B, C	3	A, B, C
BETA -CASEINA	12	A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I	12	A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I	7	A, A1, B, C, D, 0, 0'	4	A, B, C, D	3	BETA- 1, BETA- 2, BETA- 3	1	BETA
KAPPA - CASEINA	11	A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J	11	A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J	16	A, B, B', B'', C, C', D, E, F, G, H, I, J, K, L, M	16*	A, B, B', B'', C, C', D, E, F, G, H, I, J, K, L, M	2	A, B	1	KAPPA
BETA - LATTOGLOBULINA	11	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W	11	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W	2	A, B	1	-	2	A, B	3	A, B, C
ALFA-LATTOALBUMINA	3	A, B, C	3	A, B, C	2	A, B	1	-	2	A, B	2	A, B
*delle 16 varianti, 3 sono il frutto di mutazioni silenziose												

Tab. 6 Varianti genetiche e proteiche delle lattoproteine in alcune specie di interesse zootecnico (Fonte: M. Blasi, c.p. 2006)

Selezione degli animali – Identificazione dei prodotti

La qualità di un prodotto di origine animale, secondo la norma UNI EN ISO 8402, è definita come l'insieme delle caratteristiche di un prodotto o di un servizio che conferiscono ad esso la capacità di soddisfare esigenze espresse o implicite. Le esigenze che la qualità deve soddisfare sono di carattere primario (bisogno biogenico): aspettative nutrizionali, salute, sicurezza, ecc., sia soggettive del consumatore (bisogno psicogenico): confort, dietetiche culinarie, gastronomiche, durata, ecc.

Innanzitutto è bene ricordare che le caratteristiche qualitative della carne, sia che esse siano definite dalla normativa vigente che dal produttore, sono condizionate da:

- a) *genetica degli animali*: razza, tipo genetico, sesso, caratteristiche legate al genoma, ecc.;
- b) *tecnica di allevamento*: alimentazione, sanità, management, ambiente, strutture ecc.;
- c) *tecnologie industriali*: macellazione, lavorazione, confezionamento, refrigerazione, conservazione, ecc.

L'indirizzo politico contenuto nel documento di programmazione del Ministero delle politiche agricole e forestali consente di mettere in evidenza le linee per la valorizzazione di prodotti di qualità derivanti dall'allevamento delle specie di interesse zootecnico.

Tali linee indicano che esiste uno stretto rapporto tra:

- la razza;
- il sistema di allevamento;
- l'alimentazione zootecnica.

* *Dirigente Ministero Politiche Agricole e Forestali- Ufficio QPA V Produzioni animali*

Le specie e le razze allevate in ambienti diversi non hanno prestazioni uguali, così come razze diverse allevate nello stesso ambiente. L'ambiente in questo contesto rappresenta quindi un sistema produttivo che è praticamente la combinazione di clima, topografia, livelli nutrizionali, sistemi sanitari, metodi di allevamento.

Considerata l'interazione genetica-ambiente, nel caso dell'allevamento degli animali si può affermare che non esiste una razza migliore in assoluto per tutti gli ambienti e che ogni razza ha una nicchia ambientale entro la quale darà i migliori risultati. Una gestione efficiente delle risorse animali corrisponde pertanto alla ricerca e valorizzazione della razza giusta per il sistema produttivo di una regione considerata.

È logico che vada accertata l'esistenza di una variazione genetica o diversità genetica e vi siano le condizioni organizzative e le capacità tecnico-scientifiche per selezionare all'interno di una specifica razza.

La strategia da perseguire è quindi quella di operare la selezione nello stesso ambiente in cui la razza dovrà essere allevata, abbinando la migliore razza disponibile con il sistema produttivo realmente utilizzato.

La razza va presentata, quindi, come: parte integrante del territorio e dello stile di vita locale.

La possibilità della caratterizzazione della produzione mediante fattori di differenziazione di natura ambientale (alimentazione, tecniche di allevamento, ecc.) o genetica (caratteristiche qualitative legate a particolari razze locali) ha condotto alla messa a punto di sistemi di rintracciabilità della qualità animale-prodotto. Si stanno così sviluppando tecniche legate al DNA per l'accertamento della specifica qualità di un animale, anche a livello selettivo, e di un prodotto di origine animale, così come si stanno diffondendo sistemi di rintracciabilità, basati sempre sul DNA, lungo tutta la filiera dall'animale al prodotto, per legare i risultati della selezione e del modello di allevamento alla qualità del prodotto.

Qualora si intendano fornire per il prodotto informazioni circa i sistemi di allevamento degli animali, vanno predisposti appositi disciplinari o protocolli redatti sulla base degli orientamenti dettati dalla consolidata esperienza e riferiti a forme di allevamento al pascolo o al brado, o stabulazione all'aperto o stallina.

Per quanto riguarda poi le informazioni sulle tecniche di allevamento, la conoscenza della tipologia di alimentazione zootecnica riveste grande rilevanza per il consumatore. Anche in questo caso vanno realizzati appositi disciplinari o protocolli che assicurino la rintracciabilità sulla qualità della razione alimentare zootecnica, sull'esclusione dalla stessa di grassi animali o di foraggi e mangimi contenenti OGM, o ancora sull'uso ridotto di antibiotici

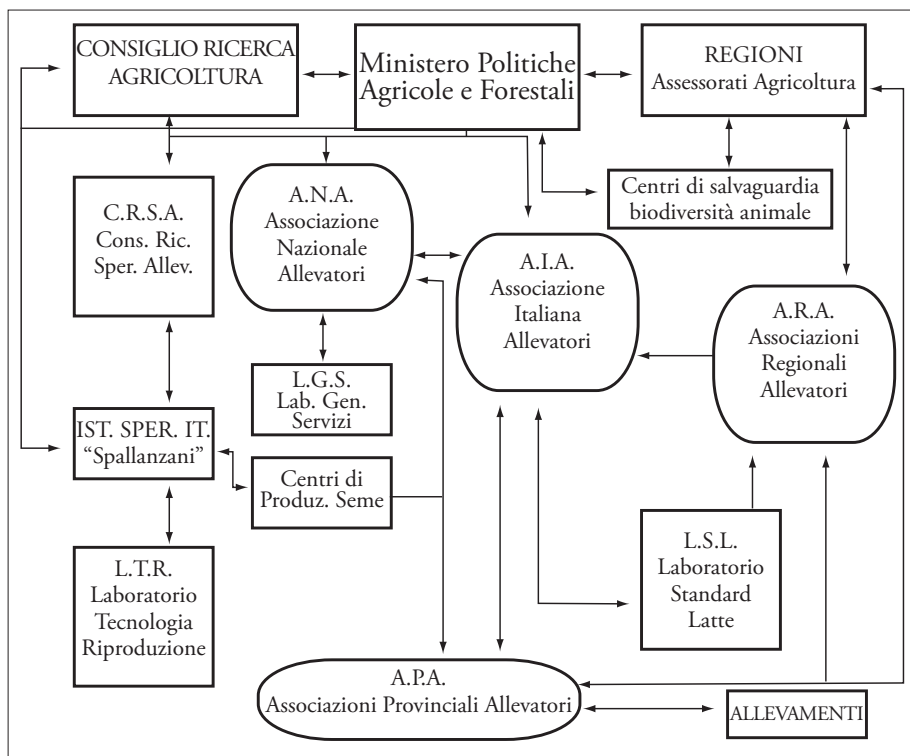


Fig. 1 *Il sistema del miglioramento genetico in Italia*

e fattori di crescita.

Volendo descrivere un modello per esprimere il carattere di un prodotto (fenotipo) va considerato non solo il genotipo allevato, ma anche l'ambiente di allevamento e, conseguentemente, la quantità e la qualità del prodotto stesso vanno misurate secondo la componente genetica ed in base all'effetto che l'ambiente determina sulla stessa quantità e qualità.

Nello sviluppo di politiche di marchi che contraddistinguono un prodotto agroalimentare con riferimento alla razza allevata va considerato che l'identificazione del prodotto medesimo, sia che si tratti di carne o lattiero-caseario, garantisce la sua riconoscibilità da parte del consumatore, costituisce la premessa per un maggior valore aggiunto, consente la rintracciabilità della materia prima e del processo produttivo, e facilita una più equa distribuzione dello stesso valore aggiunto lungo tutta la filiera produttiva, aumentando il potere commerciale del settore primario.

L'indirizzo politico contenuto nel documento di programmazione del Ministero delle politiche agricole e forestali mette in evidenza la necessità che

esista uno stretto rapporto tra:

- a) miglioramento genetico con obiettivi di differenziazione delle produzioni;
- b) conservazione della biodiversità in funzione di tutela delle diverse specificità territoriali nonché come fonte di potenzialità biologica;
- c) potenziamento della ricerca;
- d) promozione e sviluppo del collegamento tra i risultati selettivi ed i sistemi di produzione, per il conseguimento di prodotti di qualità;
- e) tutela del territorio;
- f) valorizzazione dei prodotti.

Il sistema del miglioramento genetico italiano vede all'opera una pluralità di soggetti, le cui funzioni e interazioni possono essere sintetizzate secondo lo schema della figura 1. Senza entrare nel dettaglio di tutte le singole componenti, emerge immediatamente come in questo sistema giochi un ruolo centrale il settore pubblico, non solo perché il Ministero e le Regioni hanno un ruolo centrale nella predisposizione delle normative nella realizzazione del coordinamento e della vigilanza, ma anche perché è proprio il settore pubblico che provvede al finanziamento di gran parte dei soggetti che operano all'interno del sistema, con specifico riferimento alle associazioni degli allevatori.

La legge 30/91, modificata dalla legge 280/99, che disciplina l'attività di selezione svolta nel nostro Paese, ha attribuito all'organizzazione degli allevatori, attiva da oltre mezzo secolo nel settore, specifiche competenze. In particolare:

- a) la raccolta del dato, come misura effettuata presso gli allevamenti dei caratteri oggetto di selezione e cioè eventi riproduttivi, quantità e qualità delle produzioni (controllo funzionale) e relativa elaborazione, è effettuata dall'AIA, in qualità di Ufficio centrale dei controlli della produttività, attraverso i propri Uffici provinciali presenti su tutto il territorio nazionale presso le APA, nonché attraverso la rete dei laboratori di analisi per la determinazione dei contenuti in grasso, proteina, lattosio, cellule ed eventuali altri parametri;
- b) la stima del valore genetico degli animali, a partire dai dati raccolti ed elaborati dall'AIA con i controlli funzionali nonché dai rilievi effettuati nei centri genetici, è effettuata dalle ANA mediante l'Ufficio centrale del libro genealogico istituito per ciascuna razza.

Le funzioni operative che concretizzano tali competenze sono le stesse su tutto il territorio nazionale. Tale unitarietà è garantita dal rispetto dei "Disciplinari" dei controlli della produttività e dei libri genealogici approvati con decreti ministeriali, dagli indirizzi dati dai Comitati Tecnici dei Controlli e dalle Commissioni Tecniche Centrali.

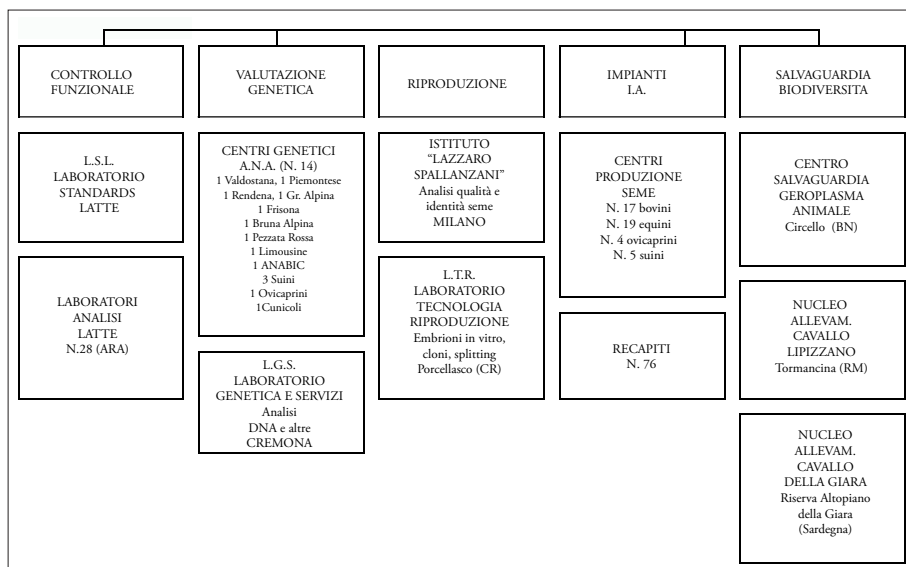


Fig. 2 Strutture della selezione e della riproduzione

L'Organizzazione degli allevatori svolge anche altre attività, spesso affidate dai Ministeri e dalle Regioni, solitamente nel campo dell'assistenza tecnica in zootecnia.

Come supporto alle suddette associazioni di allevatori è stata creata una rete di laboratori con compiti molto specialistici (fig. 2), come ad esempio:

- *i laboratori analisi* che eseguono le analisi sui campioni di latte per i controlli funzionali (contenuti in grasso, proteina, lattosio, cellule ed eventuali altre determinazioni);
- *il Laboratorio Standard Latte (L.S.L.)* che rappresenta la struttura cardine di un sistema laboratoristico responsabile dell'esecuzione routinaria dei test di attendibilità (ring test), delle tarature, della formazione ed aggiornamento del personale;
- *il Laboratorio Genetica e Servizi (L.G.S.)* punto di riferimento operativo per lo svolgimento di tutte le analisi che hanno immediata applicazione al settore zootecnico quali i gruppi sanguigni e polimorfismi del DNA;
- *Centri genetici*, strutture per l'allevamento in condizioni controllate di soggetti candidati a diventare riproduttori o imparentati a detti candidati. Nei centri genetici vengono misurati caratteri difficilmente rilevabili in condizioni di campo o che è più economico rilevare in condizioni controllate. In quest'ultimo caso si tratta di caratteri dotati di elevata ereditabilità e perciò poco suscettibili di interazione genotipo-ambiente;

- *il Laboratorio di Tecnologia della Riproduzione (L.T.R.)* destinato alla messa a punto e all'utilizzo operativo di biotecnologie riproduttive di nuova acquisizione anche mediante l'utilizzo di tecniche di micromanipolazione su materiale riproduttivo;
- *l'Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani"* ha il compito di garantire l'identità e la qualità fecondante delle dosi di seme congelato prodotte in Italia ed importate anche mediante indagini di biologia molecolare. Come Istituto di ricerca, l'Istituto si occupa di innovazione nel campo della genetica molecolare;
- *i Centri di produzione di materiale seminale* sono strutture che completano il ciclo operativo della selezione garantendo la diffusione del germoplasma selezionato. Essi sono gestiti da privati rappresentati soprattutto dalle Organizzazioni degli allevatori;
- *consorzio per la ricerca e sperimentazione degli allevatori (CRSA)*: organizza la domanda di ricerca nel settore della selezione animale attraverso un confronto dialettico tra gli utenti della selezione (associazioni degli allevatori) e istituzioni di ricerca (Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani" e Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - CRA).

Il sistema allevatorio per raggiungere l'obiettivo ultimo di certificazione della materia prima (latte e carne) deve qualificare il complesso delle proprie attività (selezione e assistenza tecnica) attraverso:

- a) la qualificazione degli operatori;
- b) la certificazione delle attività delle organizzazioni;
- c) la certificazione degli allevamenti.

Per raggiungere poi la certificazione del prodotto finale che si identifichi come prodotto di una particolare filiera (latte fresco alimentare, formaggi, carne fresca ecc.), è necessario attivare uno stretto legame dell'intera filiera dall'allevamento in selezione al settore dell'industria alimentare.

In conclusione le linee di azione, conseguenti agli obiettivi innanzi descritti, che MiPAF, Regioni, organizzazione degli allevatori e gli operatori della intera filiera zootecnica, devono concordemente portare avanti, possono così sintetizzarsi in:

- a) ricerca e sperimentazione finalizzata;
- b) certificazione di processo che abbracci i principali elementi del legame descritto:
 - raccolta ed elaborazione dati selettivi;
 - schemi di miglioramento genetico;
 - produzione materiale seminale;

- sistema di allevamento;
- c) certificazione del prodotto;
- d) politiche di promozione.

Conclusioni

Le sette relazioni hanno svolto una analisi puntuale sulle fondamentali scoperte della genetica e hanno preso in esame il trasferimento delle conoscenze in tecnologie finalizzate al miglioramento genetico delle popolazioni animali di interesse zootecnico. Le tematiche trattate e i diversi punti di vista espressi delineano un quadro che mette in chiaro le acquisizioni più significative raggiunte dalla genetica in campo sia nazionale che internazionale, utili a tracciare le possibili prospettive per la selezione animale.

In termini temporali, furono necessari più di tre decenni dalla (ri)scoperta delle leggi (di Mendel) che regolano in natura la trasmissione dei caratteri discreti per arrivare alla spiegazione, su basi matematiche, della trasmissione ereditaria di caratteri complessi che dipendono dalla azione combinata di più geni e dell'ambiente. Nei 5 decenni successivi, dagli anni '30 agli anni '80 del XX secolo, il modello infinitesimale dovuto alle intuizioni di Wright e Fisher e ai contributi successivi di Lush e Henderson ha rappresentato una potente chiave di lettura della variabilità biologica dei caratteri quantitativi e, perfezionato o adattato continuamente in fase applicativa, ha consentito la selezione simultanea per più caratteri.

Agli inizi degli '80 vengono scoperti i primi marcatori di geni singoli o di *cluster* che hanno effetti su caratteri quantitativi. La possibilità di individuare il *linkage* tra marcatore e tratti di DNA (QTL) influenti sull'espressione di caratteri sotto selezione costituisce l'elemento fondante dell'avvio della selezione assistita da marcatori (MAS). Da questo momento diviene incessante il susseguirsi di teorie, modelli e tecniche rivolti alla ricerca di marcatori e al loro sfruttamento ai fini della selezione degli animali.

Le relazioni, sia pure con enfasi diversa, hanno reso evidente come a seguito del perfezionamento e della riduzione dei costi per il mappaggio e sequen-

* Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia

ziamento del genoma, le ricerche di genetica molecolare sono state progressivamente rivolte a individuare singoli geni, loro polimorfismi che codificano per caratteri particolari e i meccanismi di regolazione genica.

L'insieme degli elementi presentati dalle relazioni suggeriscono alcuni importanti interrogativi:

- 1) il modello infinitesimale, sulla base dei risultati forniti, può essere ritenuto soddisfacente?
- 2) i modelli di genetica molecolare possono essere considerati un'alternativa al modello infinitesimale?
- 3) quali scenari si possono prefigurare per la selezione animale con il contributo della genetica molecolare?

I progressi conseguiti nelle prestazioni delle popolazioni selezionate sono la dimostrazione incontestabile della validità teorica e pratica del modello infinitesimale. I risultati raggiunti sono stati rilevanti per la quantità e i contenuti percentuali di grasso e proteine del latte in diverse popolazioni bovine e ovine, per l'efficienza della trasformazione alimentare e dell'accrescimento, così come per le rese degli animali destinati alla produzione di carne, in particolare per suini, polli e bovini.

Ciononostante diverse limitazioni caratterizzano l'impiego del modello: a) il tempo necessario a conseguire il progresso genetico per i caratteri che richiedono l'accertamento sulla progenie, b) la necessità di rilevare le caratteristiche del fenotipo, generalmente su una moltitudine di individui, con procedure che non sempre possono essere precise ed economiche, c) la ridotta applicabilità per caratteri di difficile misurazione e su popolazioni di limitata consistenza, d) la scarsa o nulla rispondenza per caratteri a bassa ereditabilità.

Queste limitazioni del modello infinitesimale e i risultati ad oggi conseguibili con la genetica molecolare possono motivare l'abbandono dell'uno per l'adozione dell'altra?

Sulla base degli elementi esposti dalle relazioni risulta che l'ampia ricerca di tipo molecolare svolta negli ultimi due decenni sul genoma di diverse specie animali ha portato all'individuazione di numerosi QTL (molti con effetto su più caratteri), per gran parte relativi a caratteri a variazione continua, e a pochi *loci* a effetto maggiore per caratteri discreti. Nel merito deve essere considerato che la verifica nelle popolazioni animali del tipo di *linkage* del QTL, con quale entità di *disequilibrium* o *in quale fase*, è fondamentale ai fini della utilizzazione negli schemi di selezione, ma non sempre è semplice ed economica. Per contro la individuazione di alcuni *loci* ha già portato ad applicazioni concrete di grande utilità. È il caso del gene RYR (alotano) per la carne PSE o del gene RN per la resa "*Napole*" nei suini, o dei quattro geni delle caseine,

associati a formare un *cluster* nei ruminanti, oppure il gene della miostatina per il carattere *culard* nei bovini. Di immediato interesse si prospetta anche la utilizzazione diffusa di diversi geni quali DGAT1, coinvolto nella determinazione del grasso, sia nel latte sia nella carne, o MC1R (*melanocortin-1 receptor*) ai fini della tracciabilità dei prodotti.

Sono esempi che mettono in chiaro la immediatezza e le potenzialità della genetica molecolare per soluzioni puntuali nella selezione di caratteri di rilevante interesse zoo-economico. Ma risulta evidente anche che ad oggi costituiscono soltanto delle integrazioni eccellenti agli schemi di selezione in atto.

Le metodologie molecolari quindi non devono essere ritenute oggi un'alternativa al modello infinitesimale ma lo completano o potenziano, vuoi per i caratteri già sotto selezione, vuoi per quei caratteri o per quelle situazioni che il modello stesso non riesce a controllare. Il passaggio dall'una all'altra tipologia, se mai si completerà, potrà realizzarsi solo attraverso un'integrazione graduale. Questa va promossa e supportata per tutti i caratteri sotto selezione e più in particolare per quelli che presentano antagonismo, quali quantità di latte e contenuti percentuali, oppure accrescimento e marezza, e per i caratteri a bassa ereditabilità. Tra questi ultimi di fondamentale importanza sono la longevità, la riproduzione, la resistenza alle patologie degli animali per l'effetto diretto che hanno sull'efficienza dell'allevamento. In particolare i caratteri di resistenza alle patologie meritano attenzione per l'azione che possono esercitare sul benessere degli animali, la sicurezza dei prodotti, la redditività dell'allevamento, e il contributo che possono dare nel realizzare sistemi di produzione sostenibili neutri verso l'ambiente.

Venendo al terzo ed ultimo interrogativo sulle prospettive delle metodologie molecolari, le sette relazioni e diversi elementi reperibili in letteratura ne fanno intravedere un ampio e rapido sviluppo.

Le scienze animali recentemente hanno saputo capitalizzare strutture e acquisizioni del progetto genoma umano, sequenziando interamente i genomi di bovino, suino, coniglio, cavallo, pollo, cane, gatto, cavia e ape.

La decisione adottata da importanti strutture, come l'USDA degli Stati Uniti, di depositare le informazioni acquisite sul genoma delle specie animali in banche dati pubbliche darà un sicuro contributo allo sviluppo di biotecnologie utilizzabili commercialmente in agricoltura, nelle scienze biomediche e nella industria. L'uso di nuove tecnologie, quali EST, *microarrays*, mass spec, ecc. per delineare i meccanismi molecolari che controllano i complessi sistemi biologici ha elevate probabilità di successo nelle specie animali allevate proprio perché queste, dopo decenni di selezione, sono state a lungo monitorate e sono ben caratterizzate fenotipicamente. Tutto questo consentirà di

migliorare la precisione e l'efficienza delle scienze "omiche" con applicazioni concrete nella genomica funzionale, nella proteomica, metabolomica, metagenomica. L'enorme quantità di dati di cui si potrà disporre solleciterà lo sviluppo della bioinformatica per acquisire (anche in silico?) conoscenze di inimmaginabile importanza.

In definitiva dopo decenni di selezione privilegiata per gli aspetti quantitativi di produzione, la genetica molecolare potrà contribuire in misura crescente alla selezione di altri caratteri come la qualità dei prodotti, mirata anche alla presenza di peptidi bioattivi con funzioni nutraceutiche o la funzionalità degli animali. Ma le biotecniche molecolari permetteranno anche l'accertamento precoce sugli individui di caratteri produttivi di quantità, contribuendo ad abbreviare gli intervalli di generazione, la limitazione del sesso, nonché di selezionare più velocemente per i caratteri correlati geneticamente in senso negativo.

Gli interventi programmati del Ministero dell'agricoltura e delle Associazioni degli allevatori che in virtù di provvedimenti legislativi gestiscono il miglioramento genetico animale in Italia, hanno sottolineato come i punti di forza della realtà italiana vadano individuati nella impostazione unitaria del sistema organizzativo della selezione, nella interazione esistente tra strutture di selezione e ambiti di ricerca genetica italiana e straniera con prospettive di interessante perfezionamento, nel promettente sviluppo nel Paese di moderne unità di ricerca più particolarmente orientate alla genetica molecolare.

Però quest'ultimo aspetto da positivo non deve diventare un punto di debolezza, riducendo oltre misura l'attenzione sulla genetica quantitativa. La molteplicità di popolazioni o razze animali allevate in Italia, è un altro punto di forza in quanto può assicurare la continuità di particolari sistemi di allevamento e rappresentare una banca *in vivo* di alleli a bassissima frequenza, di futuro interesse.

È possibile che l'integrazione dei modelli classici con quelli molecolari per la selezione di caratteri sia "nuovi" sia "tradizionali", richieda un investimento iniziale.

Nel merito però si deve considerare che l'ottimizzazione dei modelli comporterà un aumento del progresso genetico e quindi una riduzione dei costi riferiti all'unità di progresso e, verosimilmente in un certo tempo, anche una contrazione dei costi complessivi. Peraltro la perdita di competitività del sistema di selezione italiano, in caso di ritardato o mancato aggiornamento, rispetto a quanto viene realizzato in altri paesi, potrà causare crescenti costi a seguito di un aumento delle importazioni di soggetti selezionati o di materiale biologico per la riproduzione, nonché per il pagamento di possibili *royalties*

quando la selezione del Paese avrà la necessità di impiegare tecniche messe a punto all'estero e coperte da brevetto.

Di fronte ad un simile scenario si rende indispensabile da un lato un forte coordinamento della ricerca genetica e non solo, da un altro un sistematico interscambio tra la ricerca e il sistema di selezione, allo scopo di avere la completa trasparenza e condivisione degli obiettivi di ricerca e di selezione.

La complessità dei sistemi biologici è tale per cui è impensabile che ciascun singolo laboratorio, sia esso di una Università o di un'altra qualsiasi struttura, possa pervenire a tutte le acquisizioni necessarie alla selezione dei molteplici caratteri che generalmente si vogliono espressi al massimo livello nel singolo riproduttore. Questa esigenza di coordinamento e collaborazione è tanto più necessaria e produttiva nel campo della genetica molecolare, in quanto la conoscenza (della/e funzione/i) dei singoli geni può assumere interesse "trasversale", vale a dire, prescindere dalla razza entro la specie e anche dalla specie. È indubbio che ciascuna specie o razza sfrutterà poi le "conoscenze" in modo diverso a seconda dei rispettivi obiettivi di selezione e dei diversi sistemi di produzione.

Per finire, l'ambiente scientifico e quello tecnico-operativo, sulla base degli elementi emersi nell'incontro, hanno potuto constatare come esista in Italia un apprezzabile impegno di ricerca e un buon livello organizzativo. Sono presupposti fondanti per potenziare la collaborazione tra scienza e tecnica per lo sviluppo della selezione.

Tutti gli elementi raccolti fanno ritenere maturo per il sistema selettivo italiano la rapida messa in atto di un progetto mirato alla integrazione delle metodologie di genetica molecolare negli schemi di selezione in atto a similitudine di quanto è in corso in altri Paesi a zootecnia avanzata.

Premio “Giancarlo Geri”

Il 27 gennaio 2006, durante la Giornata di Studio su *Acquisizioni della genetica e prospettive della selezione animale*, è stato assegnato il Premio di Laurea Edizione 2005 in memoria del prof. Giancarlo Geri, Emerito di Zootecnica dell'Università di Firenze, eminente georgofilo, già presidente della Associazione scientifica di produzione animale, presidente della Commissione Tecnica centrale del libro genealogico dei suini.

Il premio è assegnato al dottore Natascia Bessi per la tesi di laurea su *Performance di crescita, caratteristiche merceologiche e chimico composizionali di giovanili di abalone (Haliotis tuberculata L.) alimentati con macroalga prodotta in bacini di fitodepurazione* con la seguente motivazione: «Tesi innovativa, ben impostata e documentata, che porta un contributo ad un settore importante delle produzioni animali: l'acquacoltura gestita nel rispetto dell'ambiente».

Finito di stampare
nel mese di giugno 2007
(Tibergraph, Città di Castello - PG)

