



CAPITOLO 21

Genomica e proteomica animale a supporto del miglioramento genetico e della sicurezza alimentare

«Il sequenziamento e lo studio dei genomi animali sono una moderna estensione dell'uso antico di specie modello per comprendere gli aspetti di medicina e biologia umana.»
Richard K. Wilson (2004)

La capacità di decifrare il codice genetico degli organismi viventi, attraverso la determinazione della sequenza del DNA, è una rivoluzione in biologia. Un esempio delle potenzialità di questa ricerca è il “Progetto genoma umano” che renderà disponibile una descrizione completa dei geni dell'uomo. La maggior parte delle procedure e delle tecnologie impiegate in questo progetto sono già adottate in altri settori, come ad esempio quelli che riguardano le scienze animali e la catena alimentare. In particolare, le potenzialità applicative della genomica in zootecnia sono enormi: le moderne tecniche di analisi del genoma, del trascrittoma e del proteoma condizioneranno gli schemi di selezione per il miglioramento genetico degli animali domestici, nonché i metodi di valutazione dei prodotti di origine animale per garantire la sicurezza alimentare.

Fra gli organismi animali più usati come sistemi modello per lo studio di geni e genomi si possono considerare nematodi (*Caenorhabditis elegans*), moscerini (*Drosophila*) e topi (*Mus musculus*). Recentemente anche il pollo (*Gallus gallus*) è stato ritenuto un sistema modello: esso rappresenta la principale fonte di proteine per la maggior parte della popolazione a livello mondiale e la sua importanza economica ha determinato un aumento delle ricerche genetiche condotte in questa specie, concretizzatesi di recente con il sequenziamento del suo intero genoma. Molte delle informazioni acquisite studiando il genoma dei mammiferi (topo e uomo), unitamente a quelle acquisite sequenziando il genoma di pollo, consentiranno di analizzare e caratterizzare geni omologhi in molti animali di interesse zootecnico e veterinario, come ruminanti (bovini, ovini e caprini) e monogastrici (suini, equini e cani).

Per le specie animali di maggiore rilevanza economica, come ad esempio bovini, suini, equini ed avicoli sono inoltre disponibili mappe genetiche sature, basate principalmente su marcatori SSR e SNP. Come per le specie vegetali, i marcatori molecolari sono ormai conosciuti come strumenti particolarmente efficaci ed affidabili per l'analisi dei polimorfismi del DNA anche di specie e razze animali. Attraverso l'uso dei marcatori molecolari è infatti possibile misurare la variazione genetica presente entro singole popolazioni e le relazioni filogenetiche esistenti tra popolazioni così da agevolare l'impostazione di programmi di conservazione e di selezione assistita. In questo settore, il mappaggio di QTL ed il clonaggio di geni che controllano l'espressione di caratteri quali-quantitativi promettono di avere ricadute di estrema rilevanza pratica nel miglioramento genetico animale.

Lo sviluppo di marcatori molecolari PCR-derivati per l'analisi del polimorfismo genomico (marcatori SSR) e genico (marcatori SNP) ha reso i sistemi diagnostici per l'identificazione genetica degli animali di semplice applicazione, sostenibili economicamente, affidabili e adatti all'automazione. La tracciabilità genetica rappresenta quindi uno strumento potente ed affidabile per controllare e validare i sistemi di identificazione tradizionali: essa si basa direttamente sul prodotto alimentare e non sull'etichetta del prodotto alimentare, consentendo così di tracciare i tagli di carne fino al singolo animale di origine e di verificare la corrispondenza con i dati dichiarati nella sua etichetta. Si prospetta quindi la possibilità di un'etichettatura basata sulla tracciabilità genetica a supporto di quella convenzionale che può certamente contribuire a salvaguardare il consumatore e a tutelare il produttore e il trasformatore da possibili errori, frodi o alterazioni di varia natura.

Bisogna infine considerare che il sequenziamento dei genomi e lo studio dei geni animali sono una moderna estensione dell'uso di vecchia data di specie modello per comprendere gli aspetti di medicina e biologia umana. È da questa considerazione che nasce l'esigenza di sviluppare metodologie di ingegneria genetica e biotecnologie genetiche specifiche per gli organismi animali. Le principali motivazioni che hanno portato alla clonazione di animali ed alla produzione di animali transgenici sono connesse non solo all'ottenimento di razze più resistenti e produttive, ma anche all'ottenimento di cavie di laboratorio idonee per studiare patologie dell'uomo, di emoglobina ed organi umanizzati di suini per realizzare trasfusioni e xenotraspianti, e di farmaci. Si pensi, a titolo di esempio, alla opportunità di utilizzare topi transgenici in cui sono stati modificati dei geni che provocano l'insorgenza del cancro al fine di studiare questa patologia oppure alla possibilità di clonare una pecora o una vacca transgeniche che producono e secernono nel proprio latte molecole di interesse farmaceutico come vaccini.

21.1 Evoluzione e caratteristiche del genoma degli animali di interesse zootecnico

Molte delle specie animali di interesse zootecnico (bovini, ovini, caprini, suini) sono state domesticate 9.000-11.000 anni fa. La domesticazione del cane è avvenuta prima, all'incirca 14.000 anni fa, mentre quella del pollo più tardi, all'incirca 4.500 anni fa. La maggior parte degli animali domestici presenta una base genetica più ampia rispetto a quella della specie umana, benché quest'ultima si ritiene derivata all'incirca 100.000 anni fa a partire però da una piccola popolazione che si è espansa molto rapidamente.

Nel corso dell'ultimo decennio la filogenetica molecolare ha acquisito un ruolo di grande rilievo, soprattutto per lo sviluppo di metodi statistici sempre più rigorosi per la ricostruzione delle relazioni tra genomi, in combinazione con l'accumulo di sempre più dati molecolari e sequenze di geni e proteine. Ad esempio, la comparazione del genoma nucleare e di quello mitocondriale dell'uomo con quelli del gorilla e dello scimpanzé ha portato a concludere che lo scimpanzé debba essere considerato più strettamente correlato all'uomo di quanto non lo sia il gorilla. Bisogna altresì considerare che le tre specie presentano a livello di DNA differenze inferiori al 3%, persino nelle regioni più divergenti dei loro genomi.

Analoghi indagini filogenetiche, basate sui prioni, è stata condotta per mettere in evidenza le relazioni tra genomi dell'uomo, dei primati e quelli di animali domestici come bovini, caprini, suini, ecc. I **prioni** sono particelle proteiche infettive, codificate da geni condivisi dalla maggior parte dei vertebrati, che quando trasferite in un ospite suscettibile sono capaci di causare una malattia accompagnata dalla produzione di ulteriori particelle, che diffondono la malattia trasferendosi in altri ospiti. In particolare, i prioni sono considerati gli agenti che causano disturbi neurologici come l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), la cui possibile trasmissione all'uomo ha causato in anni recenti notevoli problemi sanitari in tutta Europa. I geni che codifica-

no i prioni sono stati clonati in molte specie animali e ciò ha permesso di ricostruire la filogenesi dei genomi usando le sequenze omologhe disponibili. In **Fig. 21.1** è riportato il dendrogramma relativo alle correlazioni evolutive tra proteine prioniche. Sulla base di tale indagine alcune specie sono risultate più strettamente imparentate di quanto si ritenesse. Ad esempio, il gorilla è posizionato più vicino all'uomo che non lo scimpanzé. Inoltre, è emersa una inaspettata evoluzione convergente tra le proteine prioniche dell'uomo e quelle dei bovini! Le identità di alcuni residui amminoacidici (serina in posizione 143 e istidina in posizione 155) sono state messe in relazione con la suscettibilità degli esseri umani alla forma infettiva del prione bovino.

Gli studi di genomica molecolare hanno permesso di fare chiarezza anche sull'origine di una specie. La comparazione di un grande numero di sequenze geniche ha messo in evidenza che le due forme principali di bovini domestici, quella Europea-Africana (*Bos taurus*) e quella Asiatica (*Bos indicus*), derivano da due sottospecie diverse dello stesso progenitore ancestrale selvatico. Analogamente, si ritiene che una sottospecie Europea ed una Asiatica di cinghiale selvatico abbiano contribuito all'evoluzione delle razze Europee ed Asiatiche di maiali domestici.

La selezione fenotipica ha creato un'ampia diversità di razze negli animali domestici e in quelli di interesse zootecnico, risultando così adattate a differenti condizioni climatiche e di allevamento. La variazione fenotipica che si osserva entro e tra razze di animali domestici è molto superiore a quella che si riscontra a livello di popolazioni naturali (**Fig. 21.2**). Charles Darwin fu il primo ad intuire che la diversità di caratteri nelle piante coltivate e negli animali domestici, risultante dall'attività di miglioramento genetico, potesse ritenersi paragonabile a quella originatasi con l'evoluzione delle popolazioni naturali, in conseguenza della selezione naturale. Infatti, la variazione fenotipica occorsa durante la domesticazione è stato uno degli aspetti considerati da Darwin per arrivare a formulare l'ipotesi dell'origine di nuove specie per mezzo della selezione naturale (→ Cap. 1).

Il genoma degli animali di interesse zootecnico è costituito tipicamente da un diverso numero di paia di autosomi e da un paio di cromosomi sessuali (**Tab. 21.1**) con una dimensione che si aggira intorno ai 3 miliardi di nucleotidi nel caso dei mammiferi (2,9 Gb nell'uomo, 2,8 Gb nel ratto e 2,6 Gb nel topo) e a circa 1 miliardo di nucleotidi per le specie avicole (1,1 Gb nel pollo). La dimensione stimata per il genoma di suino e di bovino è pari a circa 3,0 Gb per entrambe le specie. La maggior parte degli eucarioti animali è caratterizzata da un genoma aploide di dimensione variabile tra 10^8 e 10^{10} pb (**Fig. 21.3**).

Sulla base delle stime disponibili per il genoma umano e per quelli di topo e pollo, il DNA delle specie animali comprende circa 40.000 geni, le cui sequenze nel complesso rappresentano solo una piccola parte dell'intera sequenza del genoma (~4%). I cromosomi sono quindi costituiti da sequenze geniche disperse e da este-

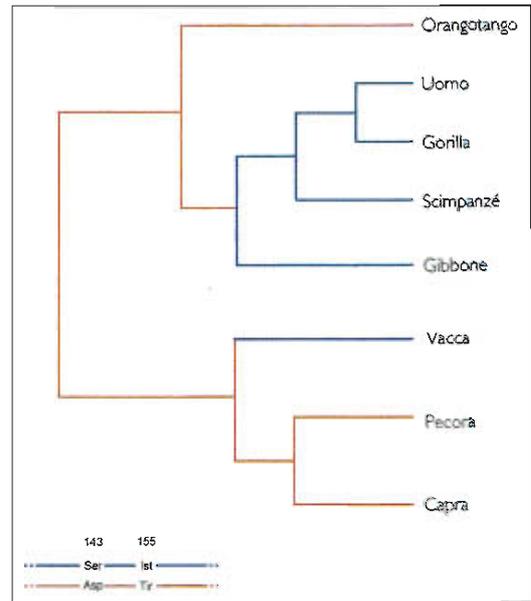


Fig. 21.1 – Dendrogramma relativo alle correlazioni evolutive tra alcuni primati e animali domestici costruito sulla base delle omologie tra proteine prioniche. (Modificato da: D.C. Krakauer et al. (1996).



Fig. 21.2 – Diversità fenotipica di polli domestici. Dipinto di Staffan Ullström.

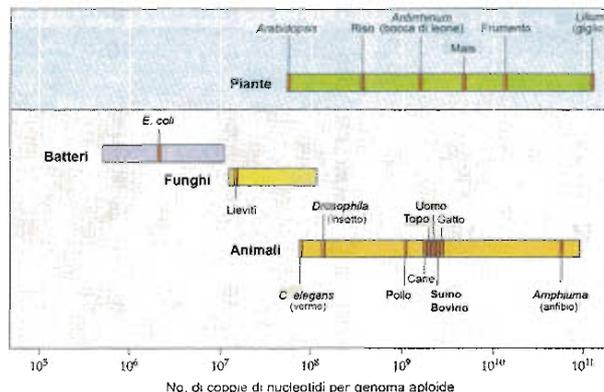


Fig. 21.3 – Dimensione dei genomi aploidi di alcuni organismi animali in relazione a quelli di piante, batteri e funghi (10^9 pb = 1 Gb).

Tab. 21.1 – Numero cromosomico di alcune specie di interesse zootecnico.

Specie	No. cromosomi (2n)
<i>Bos taurus</i> (Bovino)	60
<i>Bubalus bubalis</i> (Bufalo)	50
<i>Sus scrofa domestica</i> (Suino)	38
<i>Ovis aries</i> (Pecora)	54
<i>Capra hircus</i> (Capra)	60
<i>Equus caballus</i> (Cavallo)	64
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conigli)	44
<i>Gallus gallus</i> (Pollo)	78
<i>Meleagris gallopavo</i> (Tacchino)	80

se regioni intergeniche che non hanno alcuna funzione codificante ma che probabilmente svolgono una funzione regolativa, influenzando l'espressione genica. Lo sviluppo dei marcatori del DNA e il loro uso per lo studio dei polimorfismi del DNA hanno permesso di esplorare il genoma degli animali, di costruire mappe genetiche e di caratterizzare geni in tutte le principali specie di interesse zootecnico. La tecnica di ibridazione *in situ* in combinazione con quella di mappatura mediante pannelli di ibridi di cellule somatiche ha permesso di costruire mappe citogenetiche e di integrare le mappe fisiche con le mappe genetiche (Fig. 21.4).

Lo sviluppo di strumenti di mappaggio genico innovativi ad alta risoluzione, quali i *radiation hybrid panel*, che uniscono le potenzialità dei pannelli di ibridi di cellule somatiche con la maggiore capacità di risoluzione dovuta alla frammentazione del DNA causata dalla radiazione, ha permesso la costruzione di mappe genetiche ad alta risoluzione per le principali specie di interesse zootecnico.

Il mappaggio di geni a funzione nota ha evidenziato che durante l'evoluzione alcuni gruppi di geni, benché riarrangiati in cromosomi diversi, hanno conservato la sintenia e la colinearità tra specie. Sono state infatti identificate e caratterizzate regioni cromosomiche in cui la composizione e l'ordine dei geni si equivalgono in diverse specie di mammiferi. Regioni intracromosomiche conservate in termini di sintenia e colinearità sono state riscontrate anche tra organismi filogeneticamente distanti come uomo e pollo (Fig. 21.5).

La storia evolutiva dei genomi può anche essere ricavata attraverso una analisi comparativa basata sulla composizione (sintenia) e sull'ordine (colinearità) dei geni nei cromosomi. Studi recenti sull'architettura dei genomi condotti usando le informazioni disponibili per tutti i mammiferi con genoma sequenziato hanno permesso di stabilire che il numero di riarrangiamenti intra ed intercromosomici, dovuti soprattutto ad inversioni e traslocazioni, sono in realtà superiori a quanto precedentemente ipotizzato. Al momento si ritiene, ad esempio, che i riarrangiamenti cromosomici nei primati sia pari ad un terzo di quelli avvenuti nei roditori e che la consistenza di tali

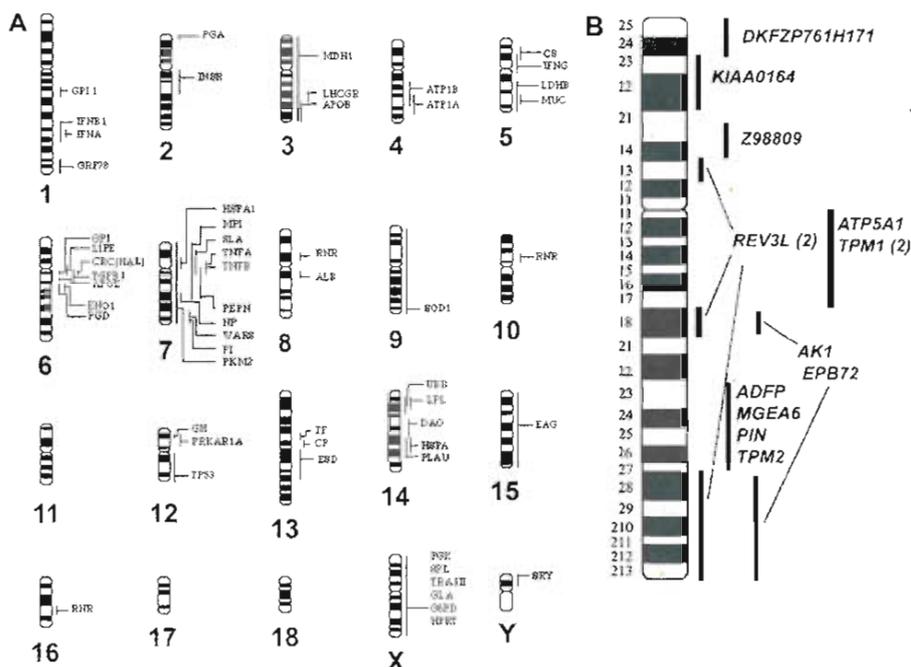


Fig. 21.4 – Mappa fisica di suino: (A) mappa fisica dei cromosomi con assegnazione di singoli geni; (B) mappa fisica del cromosoma 1 con localizzazione di alcuni geni espressi nel tessuto muscolare. Fonte: R. Davoli *et al.* (2002).

riarrangiamenti negli uccelli sia minore. L'allineamento delle sequenze genomiche di pollo e uomo ha messo in evidenza lunghi blocchi sintenici con microcolinearità conservata. A titolo di esempio, in **Fig. 21.6** è riportata l'evoluzione del cluster di geni ortologhi delle alcool deidrogenasi (ADH, *alcohol dehydrogenase*) di pollo e uomo riscontrati, rispettivamente, nel cromosoma *HsA4*, nella regione compresa tra 100,3 e 101,0 Mb, e nel cromosoma *GgA4*, nella regione compresa tra 60,4 e 60,5 Mb. In entrambe le specie, la regione ADH risulta fiancheggiata da geni ortologhi, METAP1 all'estremità in 5' (a monte) e MTP all'estremità in 3' (a valle). La regione ADH di pollo ha evidenziato sei ortologhi tra gli otto geni presenti nella corrispondente regione dell'uomo.

La disponibilità delle sequenze di interi genomi, come quelli di uccelli (pollo) e di pesci (fugu), ha permesso di comparare e di classificare tutti i loro geni in funzione delle relazioni evolutive con quelli omologhi rinvenuti nei genomi di mammiferi (uomo e topo). Ad esempio, il 43% dei geni dell'uomo, del topo e del pollo sono risultati presenti come ortologhi nel rapporto di 1:1:1 nelle tre specie. Inoltre, sono stati osservati molti paraloghi nel genoma di ciascuna delle tre specie, risultanti da eventi di duplicazione, che hanno portato alla formazione di famiglie multigeniche sia nell'uomo e nel topo che nel pollo. Membri ortologhi sono stati riscontrati anche in due dei tre genomi analizzati: tra fugu e pollo tali situazioni sono risultate rare come atteso, suggerendo una perdita di geni durante la linea evolutiva del genoma umano. Sorprendente è il dato che indica una proporzione pari a circa il 60% di geni di pollo codificanti per proteine aventi singoli ortologhi nell'uomo (**Fig. 21.7**). I geni ortologhi osservati nel rapporto di 1:1 tra il genoma dell'uomo e quello del pollo hanno evidenziato un valore medio di identità a livello di sequenze amminoacidiche inferiore a quello calcolato per i geni ortologhi rinvenuti sempre nel rapporto di 1:1 tra il genoma dell'uomo e quello del topo (75,3% contro 88,0%). Infine, è interessante rilevare che le sequenze nucleotidiche dei geni ortologhi responsabili di funzioni citoplasmatiche e nucleari sono risultate più conservate di quelle di geni implicati nella riproduzione, nella difesa contro patogeni e nell'adattamento ambientale. Sorprendente è anche il dato relativo al confronto tra EST (*expressed sequence tags*) di pollo e uomo: le sequenze espresse nel cervello sono risultate più conservate di quelle espresse nei testicoli.

Nell'era genomica la bioinformatica ha dato e sta fornendo un contributo fondamentale non solo per la determinazione e la ricostruzione della sequenza di interi genomi, ma anche per l'identificazione e la comparazione della struttura dei loro geni. Il sequenziamento del genoma di pollo ha promosso dettagliate indagini comparative con il genoma umano e di topo, al fine di ricavare informazioni di carattere evolutivo estendibili ad un confronto più ampio nell'ambito dei vertebrati tra la classe degli uccelli e quella dei mammiferi. Tali indagini hanno messo in evidenza meccanismi di espansione e conversione dei geni, sviluppo di famiglie multigeniche così come guadagni e perdite di molti geni nei due lignaggi. Ad esempio, le squame della pelle, gli artigli delle zampe, le penne e le piume del corpo e delle ali hanno preso origine da una famiglia di cheratine specifiche della classe degli uccelli, mentre

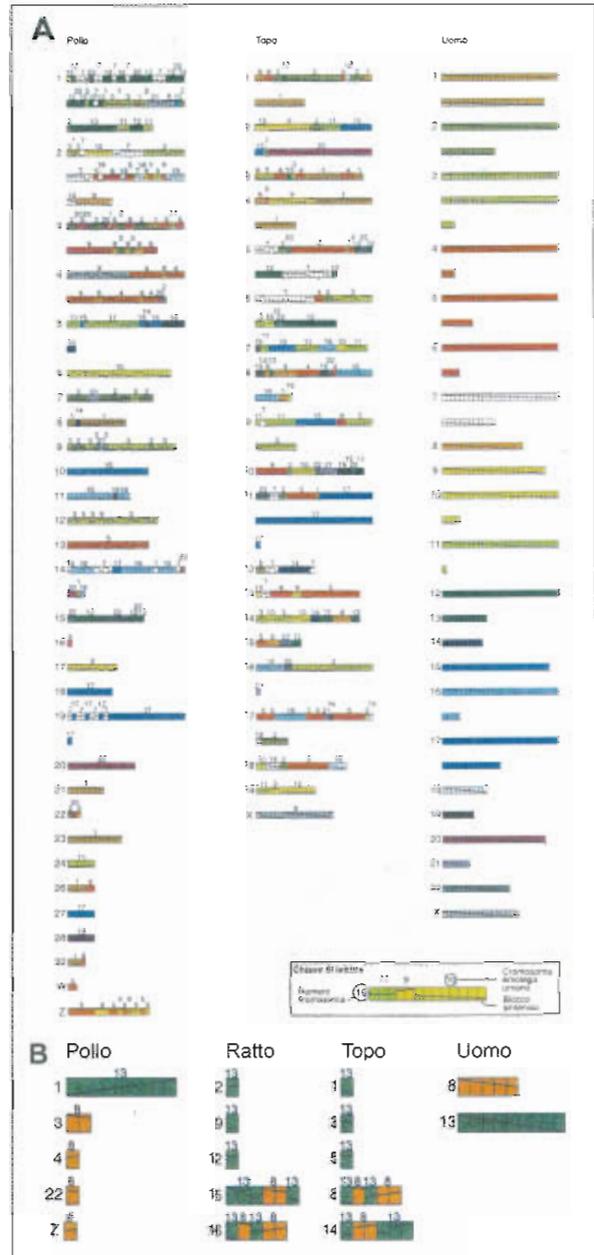


Fig. 21.5 – Genomica comparativa: (A) organizzazione di 586 blocchi sintenici nei genomi di uomo, topo e pollo; (B) esempio di riarrangiamenti intercromosomici.

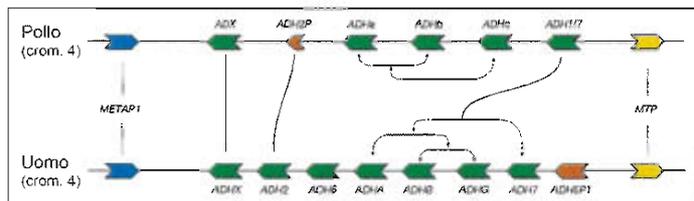


Fig. 21.6 – Organizzazione della regione cromosomica contenente i geni ortologhi del gruppo delle alcool deidrogenasi (ADH, *alcohol dehydrogenase*) di pollo e uomo: i geni interi sono rappresentati in verde, quelli troncati – pseudogeni – in rosso. La regione ADH è fiancheggiata nelle due specie da geni ortologhi: METAP1 a monte, rappresentato in blu, e MTP a valle, rappresentato in giallo. Le corrispondenze tra le copie ADH dei geni ortologhi sono evidenziate dalle linee di collegamento.

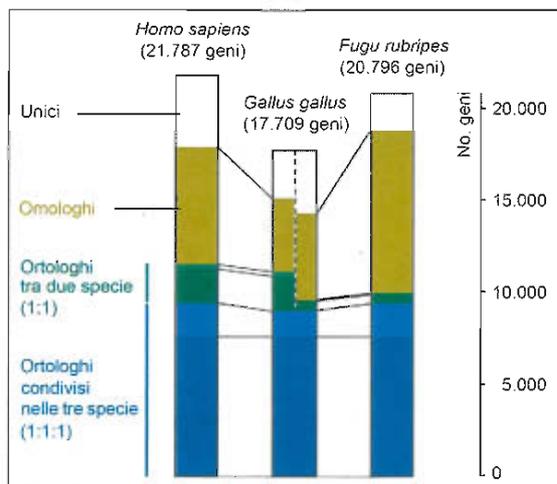


Fig. 21.7 – Statistiche relative alla comparazione tra i genomi di uomo, pesce e pollo in termini di composizione di geni ortologhi.

Tab. 21.2 – Numero di EST disponibili nelle banche-dati pubbliche per alcuni animali domestici.

Specie	No. EST*
<i>Homo sapiens</i> (uomo)	3.065.097
<i>Mus musculus</i> e <i>domesticus</i> (topo)	2.025.281
<i>Rattus</i> sp. (ratto)	256.882
<i>Bos taurus</i> (bovino)	99.203
<i>Danio rerio</i> (pesce)	95.389
<i>Sus scrofa</i> (maiale)	58.548
<i>Gallus gallus</i> (pollo)	16.894

* dbEST aggiornato a gennaio 2006

le fibre dei peli nei mammiferi derivano da una distinta famiglia di cheratine che ha subito una espansione enorme all'interno della classe dei mammiferi. Inoltre, i geni codificanti i recettori vomeronasali, le proteine associate alle ghiandole salivari, le caseine del latte così come le proteine dello smalto sono risultati assenti nel genoma di pollo. Le sequenze codificanti di tali geni non sono state riscontrate neanche tra le EST di questa specie.

Con ogni probabilità detti risultati riflettono il guadagno dei geni che hanno consentito l'evoluzione degli organi facciali e delle ghiandole mammarie nei mammiferi e la perdita dei geni che hanno portato alla scomparsa dei denti negli uccelli. La presenza nel genoma dei pesci di geni codificanti le proteine dello smalto e l'assenza di questi geni nel pollo, unitamente al fatto che i geni codificanti le proteine salivari e quelle caseiniche sono assenti nel genoma di pollo e conservati nei mammiferi, suggeriscono eventi di duplicazione genica in un organismo ancestrale comune seguiti da processi di diversificazione genica e specializzazione funzionale. I dati molecolari sinora acquisiti portano a concludere che il genoma avicolo, benché mostri proporzioni consistenti di blocchi sintenici con i mammiferi (uomo, ratto e topo) e di geni ortologhi

altamente conservati nei mammiferi, sia caratterizzato da una sotto-rappresentazione di molti geni verosimilmente presenti nell'ancestrale comune di mammiferi e uccelli (Fig. 21.8). I modelli di innovazione genica durante l'evoluzione genomica dei vertebrati sono stati ricostruiti in base alle perdite e ai guadagni dei geni in gruppi ortologhi tra genomi di alcuni organismi metazoici: tutte le specie considerate tra i mammiferi (uomo, ratto e topo), i pesci (*Fugu*), gli insetti (*Drosophila* e *Anopheles*) e i vermi (*C. elegans* e *C. briggsae*) hanno mostrato un bilancio genico positivo, con la sola eccezione dell'unica specie considerata tra gli uccelli. Tra i vertebrati con genoma interamente sequenziato il pollo è infatti l'unico organismo ad aver perduto molti più geni di quanti ne abbia guadagnati.

La conoscenza della sequenza di interi genomi sta permettendo di sviluppare procedure di mappaggio e clonaggio genico comparativo *in silico* attraverso il confronto di geni e genomi di specie diverse. Tale approccio appare particolarmente utile per localizza-

re ed identificare geni in una data specie sulla base dei dati già acquisiti e disponibili in un'altra. Metodi alternativi di analisi genica e genomica comparativa, come quello di Zoo-FISH o *chromosome painting* e di GISH o *genomic in situ hybridization*, prevedono l'ibridazione dei cromosomi di una specie con quelli di un'altra specie e ciò permette di individuare regioni genomiche omologhe, caratterizzate da elevata sintenia genica. Frequentemente i cromosomi umani vengono utilizzati come riferimento per ottenere informazioni riguardanti la colinearità e/o la sintenia nelle specie di interesse zootecnico. In Fig. 21.9 è riportato il risultato di un esperimento di ibridazione *in situ* genomica condotto usando una sonda specifica del cromosoma 17 umano per analizzare i cromosomi metafasici di bovino: il segnale di ibridazione è evidente nel solo cromosoma 19 bovino, dimostrando così che esiste una elevata conservazione di sequenze geniche tra il cromosoma umano e quello bovino.

Rimane il fatto che la decifrazione completa dell'informazione genetica di ciascuna specie si può ottenere soltanto con il sequenziamento del DNA genomico e l'annotazione di tutti i geni. Nel pollo il sequenziamento del genoma è stato completato nel 2004 da un consorzio internazionale (*Intl. Chicken Genome Sequencing Consortium*). Per quanto riguarda la specie bovina, una compagnia privata americana (*MMI Genomics*)

ha recentemente annunciato di avere completato il sequenziamento del suo genoma. Tuttavia, per i più importanti animali domestici si prevede che la sequenza completa del genoma sarà disponibile nell'arco di pochi anni dal momento che diversi progetti di ricerca effettuati con finanziamenti pubblici, principalmente negli Stati Uniti, in collaborazione con gruppi europei, giapponesi e cinesi, hanno permesso l'avvio del sequenziamento del genoma di cane e gatto, oltre che quello di specie di interesse zootecnico come bovino e suino.

Parallelamente alle attività di sequenziamento del genoma delle principali specie di interesse zootecnico, sull'esempio di quanto è stato fatto per l'uomo e per il topo, si stanno identificando e caratterizzando collezioni di sequenze espresse (EST, *expressed sequence tags*) in molti animali. Tali sequenze, che rappresentano porzioni di trascritti genici, generalmente sono di piccole dimensioni e riconducibili a tessuti specifici. Di particolare interesse è la caratterizzazione del trascrittoma dei tessuti che direttamente influenzano le produzioni zootecniche. Per esempio, le caratteristiche costituzionali del tessuto muscolare dei suini e dei bovini rivestono una notevole importanza per la produzione di carne. In questo settore, al momento sono in atto programmi di ricerca a clonare e caratterizzare EST di geni aventi espressione tessuto-specifica.

Con l'avvento dell'era genomica è adesso possibile disporre di strumenti di indagine che consentono di chiarire le basi genetico-molecolari della variazione fenotipica negli animali domestici.

La ricerca genomica negli animali di interesse zootecnico differisce in molti aspetti da quella condotta negli esseri umani o negli organismi sperimentali (cavie di laboratorio). Malgrado l'interesse generalizzato verso l'eredità dei caratteri, l'identificazione di geni qualitativi responsabili di specifiche malattie negli animali da reddito non è molto importante poiché gli individui che manifestano disfunzioni fisiche o disordini metabolici tendono ad essere eliminati dai programmi di selezione, come del resto i loro genitori. La maggior parte dei caratteri di interesse commerciale in zootecnia, come ad esempio la velocità di crescita di un animale, la qualità della carne e del latte, sono comunque caratteri quantitativi. I caratteri quantitativi mostrano una variabilità fenotipica continua ed hanno una eredità poligenica dal momento che sono controllati da una pluralità di geni e risentono anche dell'influenza esercitata dai fattori ambientali. Le posizioni occupate da questi geni sui cromosomi sono chiamate loci per i caratteri quantitativi: ognuno di questi loci è comunemente indicato con l'acronimo QTL (*quantitative trait locus*) ed è principalmente associato alla produttività e alle caratteristiche di qualità.

Un QTL, negli animali così come nelle piante, si identifica pertanto non con un locus mendeliano ma con una regione cromosomica dove risiedono i geni che controllano l'espressione di un carattere quantitativo (poligeni). Il concetto di QTL può in realtà estendersi anche a caratteri riconducibili a due classi discrete antagoniste (ad esempio, individui sani ed individui malati) e che quindi non manifestano una distribuzione continua dei valori fenotipici, purché il carattere in questione sia controllato da più geni. Il mappaggio di QTL mediante l'uso di marcatori molecolari ed il clonaggio di geni coinvolti nella manifestazione dei caratteri quantitativi promette di avere ricadute di estremo interesse pratico in zootecnia.

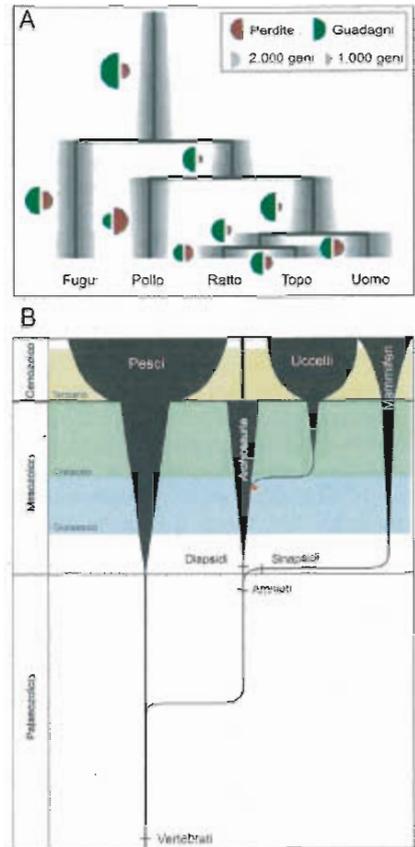


Fig. 21.8 – Filogenesi ed evoluzione dei vertebrati: (A) dendrogramma filogenetico derivato dall'analisi delle sequenze dei genomi; (B) diagramma evolutivo dei vertebrati ricostruito usando le informazioni ricavate dall'analisi dei reperti fossili. Fonte: R.K.W. Wilson *et al.* (2004).

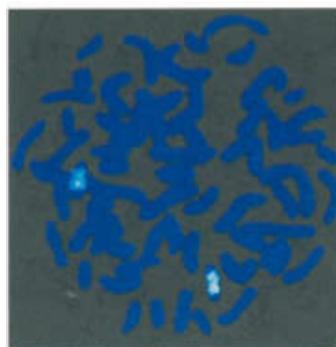


Fig. 21.9 – Esperimento di ibridazione *in situ* genomica: una sonda specifica del cromosoma 17 umano identifica sequenze complementari quasi esclusivamente nel cromosoma 19 bovino, dimostrando così che esiste una elevata conservazione di sequenze geniche tra questi cromosomi nei due genomi (foto: B. Chowdhary).

Quadro 21.1 – Mammiferi

I Mammiferi sono la classe di Vertebrati omeotermi comprendente gli animali più evoluti. Essi vengono suddivisi in tre sottoclassi in base all'atteggiamento riproduttivo e all'apparato riproduttivo femminile: Monotremi (o prototeri), Marsupiali (o metateri) e Placentati (o euteri). Con la sola eccezione dei Monotremi, che sono ovipari, tutti i mammiferi sono vivipari e comprendono due gruppi: marsupiali e placentati. I mammiferi sono provvisti di ghiandole mammarie, sviluppate e funzionali nelle femmine ed atrofiche nei maschi. Il dimorfismo sessuale mostra generalmente una maggiore prestanza fisica maschile. La pelle dei mammiferi è in genere ricoperta di peli, tranne che nei Cetacei e Sirenidi, talora rigidi – setole – oppure trasformati in spine e aculei. Nella pelle di molte specie sono presenti ghiandole sudoripare e sebacee ed in alcune specie anche ghiandole odorifere. Formazioni cutanee come sono le unghie, le corna e il becco nel solo ornitorinco. La testa presenta un grande sviluppo della capsula craniale. La colonna vertebrale è divisa nelle regioni cervicale, toracica, lombare, sacrale e caudale. Alle vertebre toraciche si articolano le costole. I Mammiferi sono provvisti di due paia di arti che sorreggono il corpo, la cui conformazione e lunghezza varia a seconda del tipo di locomozione cui servono. Le dita possono essere 5 o ridotte a 4, 3 o 2. A seconda che appoggino al suolo la pianta, le dita o le unghie, i Mammiferi vengono detti plantigradi, digitigradi, unguligradi. L'apparato digerente consta della bocca con lingua, denti e ghiandole salivari, di faringe, esofago, stomaco e intestino, che si apre all'esterno con l'ano, e delle ghiandole fegato e pancreas. L'apparato circolatorio, con circolazione doppia e completa, è costituito dal cuore a quattro cavità, da vene e da arterie. L'apparato respiratorio è formato da laringe, trachea, bronchi, polmoni; quello escretore da reni, ureteri e vescica urinaria. Il sistema nervoso presenta un grande sviluppo dell'encefalo con grossi emisferi cerebrali. Sviluppati sono gli organi di senso tattili, uditivi, gustativi, olfattori e visivi.

Comparsi sulla Terra nel Triassico, attualmente si conoscono circa 4.500 specie classificate in oltre 20 distinti ordini (Tab. 21.3). I bovini (famiglia: Bovidi), caprini e ovini (sottofamiglie dei Bovidi)

Tab. 21.3 – Classificazione dei mammiferi.

Sottoclasse/Ordine	Specie tipiche
Monotremi	ornitorinco, echidna
Marsupiali	diavolo orsino, talpa marsupiale, mirmecobio, koala, vombato, canguro
Placentati	
Insettivori	solenodonte, tenrek, potamogale, riccio, mustiolo, talpa, toporagno
Dermotteri	cinocefalo
Chiroteri	fero di cavallo, volpe volante, vampiro, pipistrello pescatore, molosso, nottola, orecchione
Sdentati	formichiere, bradipo, tamandua, armadillo
Folidoti	pangolino
Lagomorfi	lepre, coniglio, pica
Roditori	marmotta, scoiattolo, castoro, topo, ghio, spalace, marà, istrice, capibara
Carnivori	lupo, orso, procione, panda, martora, ermellino, genetta, protele, iena, tigre, otaria, trichero, foca
Cetacei	balena, balenottera, capodoglio, orca, delfino, narvalo
Proboscodati	elefanti
Sirenidi	manato, dugongo, lamantino
Iracoidi	procavia
Tubolidentati	oritteropo
Artiodattili	cinghiale, pecari, ippopotamo, cammello, tragulo, cervo, camoscio, giraffa, antilocapra, antilope, bisonte, onice, saiga
Perissodattili	cavallo, tapiro, rinoceronte
Primates	tapaia, catta, sfaka, aye-aye, lori, galagone, tarsio, cebo, callimico, babbuino, entello, siamango, orangotango, scimpanzè, gorilla, uomo

e i suini (famiglia: Suidi) appartengono all'ordine degli Artiodattili, che insieme ai Perissodattili formano gli Ungulati, così chiamati perché presentano zoccoli anziché unghie.

21.2 Analisi genomica e marcatori genetici in zootecnia: stato dell'arte

Nella società moderna si avverte un crescente interesse verso le tematiche riguardanti la sicurezza degli alimenti di origine animale e la sostenibilità dei sistemi di produzione animale. La risposta ai quesiti che tali tematiche sollevano possono essere fornite ricorrendo a strumenti di analisi fondati sulle recenti acquisizioni di genomica, trascrittomica e proteomica. L'insieme delle tecnologie messe a punto per l'analisi delle sequenze genomiche e del polimorfismo molecolare può fornire anche un valido contributo al miglioramento genetico dei caratteri quali-quantitativi così come alla salvaguardia delle razze autoctone, in particolare, e della biodiversità a livello di specie, più in generale (Fig. 21.10).

La selezione genetica, finalizzata al raggiungimento di una uniformità fenotipica elevata e idonea a massimizzare le potenzialità produttive, e la conservazione della variabilità genetica nel suo complesso, benché rappresentino argomenti di ricerca differenziati in termini di finalità, sono accomunati dal fatto che possono usufruire en-

trambi dell'enorme contributo connesso all'impiego dei **marcatori genetici**. I marcatori genetici sono riconducibili a sequenze di DNA impiegate per marcare, cioè tracciare un particolare soggetto attraverso l'analisi della manifestazione fenotipica di uno o più dei suoi geni. I marcatori più usati in passato per la selezione nelle specie animali di interesse zootecnico sono certamente stati i fattori genetici per caratteri qualitativi, facilmente rilevabili, con piena penetranza ed espressività, come ad esempio il colore del mantello e la presenza delle corna. Attualmente, tra i marcatori genetici, quelli considerati più affidabili sono i marcatori molecolari. L'analisi del genoma mediante marcatori molecolari è in grado di rilevare la diversità dovuta a mutazioni di regioni di DNA omologhe in individui diversi appartenenti alla stessa specie o a specie diverse. Le differenze tra individui a livello di sequenza nucleotidica del DNA costituiscono un insieme di marcatori genetici con alto potere discriminante e rappresentano un sistema di analisi genomica di grande precisione. I marcatori molecolari presentano numerosi aspetti positivi rispetto a quelli morfologici tradizionalmente impiegati. Infatti, non subiscono interferenze da parte dell'ambiente, trattandosi di sistemi di analisi del DNA, e coprono qualsiasi parte del genoma (sequenze codificanti, introni e regioni di regolazione), permettendo così di rilevare differenze anche tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili. Al momento, si possono distinguere due classi di marcatori molecolari: RFLP e PCR-derivati (→ Cap. 17).

L'attuale disponibilità di marcatori molecolari codominanti, facilmente rilevabili tecnicamente e numericamente abbondanti nei genomi animali, come ad esempio microsatelliti (SSR, *simple sequence repeat*) e SNP (*single nucleotide polymorphism*), consente di accelerare i tempi richiesti per la caratterizzazione e la selezione genetica, e di aumentare le possibilità di successo dei programmi di miglioramento genetico, ricorrendo alla cosiddetta selezione assistita da marcatori (MAS, *marker-assisted selection*). Quest'ultima consiste nell'impiego di mezzi biotecnologici per seguire la trasmissione di geni favorevoli ed eliminare quelli indesiderati. La disponibilità di marcatori molecolari utili per la MAS può teoricamente apportare cambiamenti di rilievo sui metodi seguiti per selezionare e salvaguardare razze superiori che combinano il maggior numero di alleli favorevoli ai loci che controllano i caratteri oggetto di miglioramento genetico. La posizione nella mappa dei loci per i caratteri qualitativi e la variazione allelica ai loci marcatori associati sono due informazioni indispensabili per costituire razze superiori in termini produttivi ed identificabili a livello molecolare.

A differenza di quanto accadeva in un recente passato, quando i marcatori molecolari non erano ancora disponibili e la selezione veniva condotta esclusivamente su base fenotipica, la prospettiva che adesso comincia ad intravedersi per un futuro prossimo è quella di identificare la posizione e la funzione dei geni alla base della manifestazione dei più importanti caratteri qualitativi e quantitativi, almeno nelle maggiori specie di animali domestici. Benché la quantità di informazioni genotipiche sui QTL aumenti di anno in anno, le possibilità concrete di attuare programmi di MAS negli animali sono ancora limitate. Al momento sono pochi i casi di selezione assistita realizzati con successo mediante l'ausilio dei marcatori molecolari e buona parte di questi riguarda caratteri di cui sono stati identificati i geni o le mutazioni dei geni responsabili del loro controllo a livello morfologico o metabolico.

Il **colore del mantello** degli animali domestici mostra un'ampia variabilità in molte delle specie di interesse zootecnico, a differenza di quanto si osserva nelle po-



Fig. 21.10 – Esempi di razze autoctone venete di pollo oggetto di programmi di conservazione (foto: M. Cassandro).



Fig. 21.11 – Variazione fenotipica per il colore del mantello in alcune razze bovine.

polazioni naturali di specie selvatiche (Fig. 21.11). Ciò dipende dall'azione della selezione naturale contro i soggetti aventi un aspetto bizzarro più frequentemente vittime di predatori ed esclusi dagli accoppiamenti. Bisogna altresì considerare che l'uomo fa ricorso a pratiche di tipo agricolo da oltre 10.000 anni, ma è solo nell'ultimo secolo che ha operato selezione con l'intento di migliorare le produzioni animali. Allo stesso modo egli ha anche agito in modo consapevole per mantenere o addirittura aumentare la variabilità di alcuni caratteri, come ad esempio, il colore del mantello poiché questo carattere in particolare veniva usato nell'ambito di una specie come marchio fenotipico identificativo delle differenti razze. Il colore del mantello degli animali costituisce ancora adesso un carattere molto

importante in tutti i programmi di miglioramento genetico tanto che sono stati sviluppati molteplici saggi diagnostici basati sull'analisi del DNA per l'accertamento precoce del colore del mantello in molte specie. Tali saggi sono stati approntati sfruttando le informazioni genetico-molecolari acquisite nel topo. Ad esempio, alcune mutazioni puntiformi del gene *Mclr*, codificante un recettore melanocortinico, sono state messe in relazione con la distribuzione dei pigmenti rosso e nero nei peli del mantello dei topi. Gli omologhi di questo gene sono stati successivamente clonati e caratterizzati nei bovini, nei suini, negli equini, nelle pecore, nei cani e nei polli.

L'allele denominato *Dominant white* (*I*) costituisce un esempio particolarmente interessante. Molti maiali domestici hanno un mantello bianco in quanto mancano di melanociti nella pelle (Fig. 21.12). Studi condotti a livello molecolare hanno dimostrato che il fenotipo bianco è determinato da mutazioni del gene *KIT* che codifica la sintesi di recettori di fattori di crescita espressi nelle cellule staminali. Questo gene, avente una dimensione attorno a 400 kb, è indispensabile per la sopravvivenza dei melanociti durante l'embriogenesi e per l'ematopoiesi (produzione dei componenti del sangue) e lo sviluppo delle cellule germinali. Tutte le mutazioni che determinano la perdita di funzione del gene *KIT* causano il fenotipo bianco macchiato nel topo (*Dominant white spotting*) e il fenotipo screziato nell'uomo (*Dominant piebald trait*), anche se molto spesso lo stato omozigote degli alleli mutati si riflette in un fenotipo acuto o letale. Nel maiale, l'allele *Dominant white* si manifesta con un effetto sulla pigmentazione ancora più drastico di quello provocato nel topo da tutti i possibili alleli mutati, benché i genotipi omozigoti risultino pienamente vitali. Osservazioni dettagliate della struttura dell'allele *Dominant white* hanno messo in evidenza due

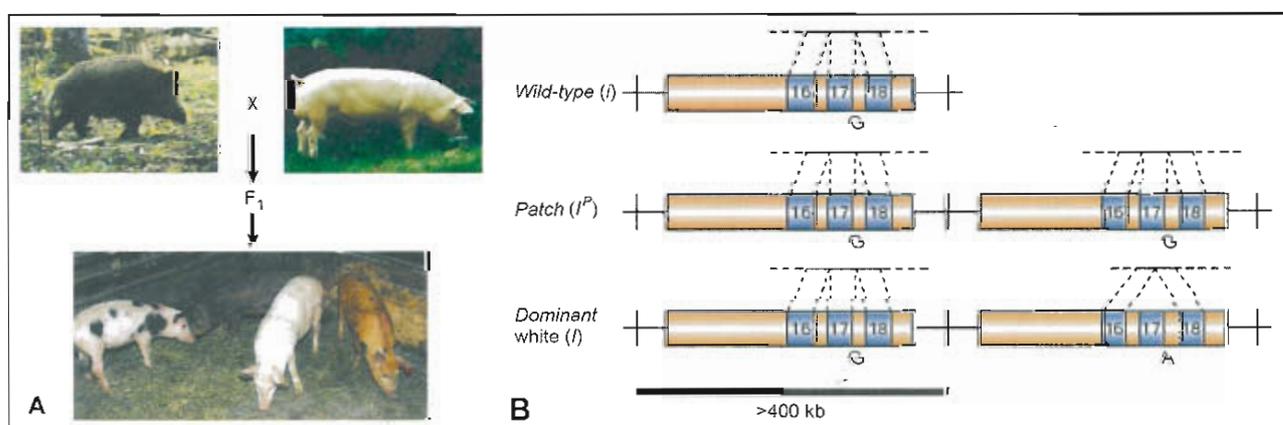


Fig. 21.12 – Colore del mantello nei suini: (A) variabilità fenotipica; (B) eredità del carattere (modificata da: L. Andersson 2001).

distinte mutazioni: una duplicazione in tandem ed una alterazione del sito di splicing (Fig. 21.12). La sola duplicazione in tandem dell'intera regione codificante si riscontra nell'allele denominato *Patch* (P^P) che si manifesta con ampie macchie di peli e pelle non pigmentati, probabilmente per effetto della sovra-espressione o della espressione ectopica di *KIT*. La mutazione puntiforme G→A provoca un cambiamento del sito di splicing determinando la perdita dell'esone 17 durante la fase di processamento del messaggero: tale cambiamento porta alla sintesi di un recettore con normale attività legante ma senza attività chinasi intracellulare. Inoltre, si ritiene che la combinazione di una variazione strutturale con la sovra-espressione di uno stesso allele possa essere chiamata in causa per spiegare le conseguenze estreme sulla pigmentazione osservabile nei soggetti eterozigoti per la mutazione *Dominant white*. La Fig. 21.12 mostra gli effetti, a livello di pigmentazione del mantello, nel caso di incrocio tra individui appartenenti a popolazioni divergenti. In particolare, l'interincrocio di individui F_1 , ottenuti dall'unione tra un cinghiale selvatico (*European Wild Boar*) e un maiale domestico (*Large White Domestic Pig*), consente di osservare nella generazione F_2 gli effetti della segregazione dei fattori che controllano il colore del mantello. Il maiale così come le progenie F_2 con mantello bianco portano l'allele *Dominant white* al locus *KIT*, mentre il cinghiale e le progenie F_2 con mantello pigmentato sono omozigoti per l'allele selvatico recessivo (*i*). In questi animali la presenza delle macchie è riconducibile alla duplicazione in tandem dell'intera regione codificante al locus *KIT* unitamente alla variazione del livello di espressione dell'allele *Patch*. Lo studio genetico-molecolare della pigmentazione cutanea del maiale ha evidenziato che gli alleli che controllano la manifestazione di questo carattere, oggetto della selezione da moltissime generazioni, differiscono tra loro per l'accumulo di mutazioni multiple.

Un altro aspetto ampiamente studiato negli animali domestici, data la sua importanza ai fini della selezione, è quello riguardante la **composizione corporea** ed, in particolare, la proporzione relativa tra tessuto muscolare e grasso. Negli ultimi 50 anni in molte razze è stata portata avanti un'intensa attività di selezione con l'obiettivo di produrre linee caratterizzate da soggetti magri, favorendo lo sviluppo del muscolo e riducendo l'accumulo di grasso. Parecchi geni che influenzano la composizione corporea sono già stati identificati e caratterizzati a livello genetico-molecolare.

Il locus per il gene alotano (*Halothane*) nel suino è stato uno dei primi ad essere studiato. Una mutazione recessiva di questo gene è responsabile della cosiddetta "sindrome dell'ipertermia maligna", che può essere innescata da stati di stress dell'animale o provocata da esposizioni al gas anestetico alotano. Tale mutazione è stata anche associata con un tipo di carne più magra, morbida e pallida, ed è stata quindi sottoposta ad intensa attività di selezione per aumentarne la frequenza tra le razze di suino. Il gene responsabile di questo fenotipo è *RYR1* (*ryanodine receptor 1*), codificante un recettore che agisce a livello dei canali ionici regolando il rilascio del calcio nei muscoli scheletrici. La caratterizzazione di geni clonati in individui omozigoti con fenotipo normale e con fenotipo mutante ha permesso di accertare che la variazione è riconducibile ad una mutazione puntiforme di tipo mis-senso, denominata R614C. È interessante rilevare che lo stesso tipo di mutazione provoca la sindrome maligna da ipertermia anche nell'uomo.

L'allele *RN⁻* rappresenta un altro esempio di mutazione la cui frequenza è stata probabilmente aumentata nelle popolazioni di suini per effetto della selezione per il contenuto di carne. Tale mutazione è stata riscontrata quasi esclusivamente nella razza Hampshire ed è ritenuta responsabile di aumenti consistenti, fino al 70% circa, del contenuto di glicogeno nel tessuto muscolare. La mutazione è stata associata ad un peggioramento delle caratteristiche qualitative dei prosciutti durante la fase di stagionatura e ad un abbassamento del pH delle carni per effetto della degradazione post-mortem del glicogeno. Recentemente è stato identificato e clonato il gene *PRKAG3*

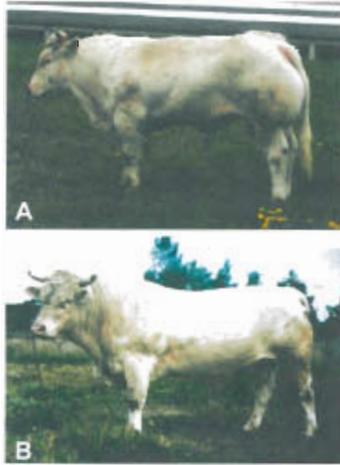


Fig. 21.13 – Esempio bovino della razza Bianca Blu belga con fenotipo doppia coscia a confronto con un capo della razza Charolais che non presenta questo fenotipo.

(*protein kinase AMP-activated gamma-3 subunit*) responsabile di questo fenotipo: si tratta di un gene codificante una isoforma della subunità regolatoria γ di una proteina chinasi AMP-attivata. Anche in questo caso la variazione a livello della sequenza nucleotidica è riconducibile ad una mutazione puntiforme di tipo mis-senso, denominata R200Q. La manifestazione morfologica della mutazione in questione suggerisce che la specifica isoforma di AMP chinasi possa svolgere un ruolo chiave nel metabolismo energetico a livello del muscolo scheletrico. È inoltre possibile che tale chinasi sia coinvolta nell'acquisizione di glucosio indipendente dall'insulina da parte del muscolo scheletrico e costituisce pertanto un potenziale bersaglio farmacologico per il trattamento del diabete di tipo II nell'uomo.

Un altro locus identificato nel suino che influenza la massa muscolare e la composizione del grasso corporeo è quello corrispondente al gene *IGF2* (*insulin-like growth factor*) codificante un fattore di crescita insulina-simile. Tale gene si trova localizzato nella stessa regione distale del cromosoma 2 dove è stato posizionato un QTL con un effetto molto consistente sullo sviluppo corporeo. L'analisi di popolazioni segreganti prodotte attraverso l'incrocio tra *Wild Boar* e *Large White* e tra *Pietrain* e *Large White* ha evidenziato che la manifestazione del fenotipo è chiaramente connessa ad una eredità di origine paterna. Ciò suggerisce che il locus può essere interessato da meccanismi di *imprinting* genomico per il quale l'allele paterno è potenzialmente soggetto ad inattivazione durante la formazione dei gameti. Al momento sono in atto studi molecolari volti alla caratterizzazione di *IGF2*, ritenuto uno dei migliori geni candidati al controllo della quantità e della qualità della carne nei suini.

Molte razze di bovini da carne, compresa la Piemontese, la Bianca Blu belga e la Charolais, mostrano un particolare sviluppo ipertrofico e vengono per questo motivo indicate come "razze della doppia coscia" (Fig. 21.13). Tale fenotipo è riconducibile ad una iperplasia, cioè ad un anormale aumento del numero delle cellule dei tessuti muscolari, ed è determinato da una mutazione recessiva del gene della miostatina al locus *mh* (*Myostatin*). In pratica, la mancata attività del gene impedisce la sintesi della miostatina, proteina in grado di frenare lo sviluppo muscolare. Il gene della miostatina venne considerato come candidato al controllo della manifestazione del muscolo ipertrofico quando si dimostrò che i topi omozigoti per alleli mutati di questo gene erano in grado di sviluppare masse muscolari fuori dalla norma. Successivamente fu provato che il gene responsabile dell'ipertrofia delle masse muscolari della coscia si trova localizzato sul cromosoma 2 bovino esattamente in corrispondenza del locus della miostatina, che gli individui con fenotipo "doppia coscia" sono omozigoti (*mhmh*) per mutazioni riconducibili al tipo "perdita di funzione" e che il prodotto proteico del gene della miostatina agisce come "regolatore negativo" dello sviluppo dei muscoli scheletrici. È interessante rilevare che sono state individuate e caratterizzate sei distinte mutazioni in diverse razze bovine, mentre mutazioni analoghe non sono ancora mai state riscontrate nel suino.

Un gene che determina una considerevole crescita muscolare è stato individuato anche nelle pecore: si tratta del gene *CLPG* (*callypige*) che provoca ipertrofia muscolare delle cosce e delle natiche. Il fenotipo corrispondente fu osservato per la prima volta nel 1983 in un ariete. Questo gene, in seguito mappato nel cromosoma 18 ovino, ha mostrato una eredità peculiare definita *polar-overdominance*: la manifestazione fenotipica è visibile solo negli animali eterozigoti e solo quando l'allele mutato è trasmesso dal genitore maschile. La causa di ciò non è ancora nota, ma una possibile spiegazione chiama ancora in causa l'inattivazione dell'allele paterno durante la formazione dei gameti (*imprinting* genomico) così da non potersi esprimere nella progenie.

Fenomeni di *imprinting* di questo tipo sono già stati osservati negli animali ma i dati coinvolgono un numero ridotto di geni. Il fatto però che entrambi i loci *IGF2* nel maiale e *CLPG* nella pecora siano interessati da *imprinting* e che alcuni QTL di suino

e di bovino mostrano variazioni riconducibili ad effetti di *imprinting* spinge a ritenere questo meccanismo di regolazione dell'espressione genica più comune di quanto fino ad oggi ipotizzato. Ulteriori indagini genetico-molecolari sono tuttavia necessarie per stabilire se effettivamente l'*imprinting* genomico è in grado di condizionare la manifestazione di alcuni caratteri quantitativi e lo sviluppo corporeo negli animali domestici.

La **fertilità** degli animali è un carattere molto importante da considerare durante i programmi di selezione ma anche molto difficile da studiare. Il motivo principale è rappresentato dai bassi valori di ereditabilità in quanto i livelli di fertilità sono condizionati da fattori ambientali nonché dallo stato di salute e dal regime alimentare degli animali.

Recentemente, nella pecora sono stati identificati due distinti alleli al locus *Inverdale* presente nel cromosoma X che condizionano il tasso di ovulazione: entrambi gli alleli sono mutazioni del gene *BMP15* (*bone morphogenetic protein 15*) codificante un fattore di crescita espresso nell'ovocita. Gli individui eterozigoti per queste mutazioni presentano una ovulazione regolare mentre quelli omozigoti risultano sterili. *Booroola* è un altro gene, identificato sempre nella pecora, che influisce sulla riproduzione femminile: l'allele selvatico a questo locus agisce positivamente sul tasso di ovulazione e sulla prolificità. La regione del cromosoma 6 di pecora dove è stato mappato il gene *FecB* (*Booroola fecundity*) ha evidenziato sintenia conservata con la regione del cromosoma 4 umano dove è stato localizzato il gene ortologo.

Nei suini è stato identificato un gene potenzialmente coinvolto nella riproduzione: il polimorfismo di questo gene, codificante un recettore di estrogeni, è ritenuto associato con la prolificità ma la sua funzione non è ancora stata del tutto chiarita. L'incrocio di razze Europee poco prolifiche con razze Cinesi altamente prolifiche ha portato alla mappatura di una serie di QTL per la prolificità. I dati acquisiti riguardanti le posizioni occupate da questi loci sulle mappe genetiche di maiale consentiranno di selezionare ed eventualmente validare geni candidati.

Negli ultimi anni sono state raccolte informazioni ed acquisita documentazione su molte **malattie ereditarie semplici**, a controllo monogenico, relativamente alle principali specie di interesse zootecnico. Tali dati sono stati catalogati in una banca dati denominata *Online Mendelian Inheritance in Animals* (OMIA).

La presenza, nelle popolazioni migliorate delle più importanti specie di animali domestici, di soggetti portatori sani di geni autosomici responsabili allo stato recessivo dell'insorgenza di disfunzioni metaboliche ed alterazioni morfologiche costituisce un problema molto serio poiché tali soggetti sono in grado di trasmettere l'allele per la malattia a prole molto numerosa. Come esempio si può citare il caso della "deficienza da aderenza dei leucociti" nei bovini (*bovine leukocyte adhesion deficiency*), una grave sindrome immunodeficitaria causata da una mutazione mis-senso del gene *ITGB2* codificante la subunità $\alpha 2$ di una integrina. Tale mutazione venne largamente diffusa nelle popolazioni statunitensi di Holstein-Friesian negli anni '50-'60 del secolo scorso da un famoso toro usato nelle inseminazioni artificiali per ottenere un numero elevatissimo di figli e tutti gli individui affetti da tale patologia erano infatti imparentati tra loro. Un'altra grave sindrome immunodeficitaria dei cavalli (*Arabian horse combined immunodeficiency*) è causata da una mutazione di tipo *frameshift* del gene *PRKDC* codificante la subunità catalitica della proteina chinasi DNA-dipendente.

In entrambi i casi, così come nella maggior parte dei casi riguardanti malattie le cui basi genetico-molecolari sono state svelate, l'identificazione dei geni responsabili delle malattie ereditarie è stata possibile grazie alle informazioni disponibili per le malattie corrispondenti nell'uomo o nel topo seguendo approcci di genomica comparativa. In anni recenti sono stati sviluppati numerosi saggi diagnostici ai quali ricorrono i selezionatori per ridurre l'incidenza di malattie ereditarie nelle popolazioni oggetto di selezione. L'analisi di malattie a controllo monogenico è di notevole impor-

Tab. 21.4 – Analisi di geni che causano sindromi ereditarie in bovini, suini ed ovini.

Specie	Malattia
Bovini	BLAD (<i>Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency</i>) DUMPS (<i>Deficiency of Uridine Mono-Phosphate Synthase</i>) CVM (<i>Complex Vertebral Malformation</i>) <i>Mule Foot</i> PDME (<i>Progressive Degenerative Myeloencephalopathy</i>) SMA (<i>Spinai Muscular Artrophy</i>) Citruilinemia
Suini	PSS (<i>Procine Stress Sindrome</i>)
Ovini	Scrapie

tanza sotto il profilo economico poiché consente di prevenire la morte dell'animale o la drastica riduzione delle sue potenzialità produttive e riproduttive. Il soggetto portatore dell'allele per la malattia allo stato eterozigote, totalmente asintomatico, è in grado di trasmettere la mutazione alla prole con il 50% di probabilità. Per controllare gli accoppiamenti è quindi opportuno analizzare tutti i soggetti che hanno almeno un portatore nella loro ascendenza. Alcune delle analisi di geni che causano sindromi ereditarie sono riportate in **Tab. 21.4**.

In alcuni casi, lo studio di malattie negli animali domestici può fornire utili modelli per lo studio di malattie umane equivalenti e per lo sviluppo di terapie appropriate. Un esempio interessante è rappresentato da un disturbo del sonno che si riscontra in alcune razze di cani, noto come "narcolessia canina", causato da una mutazione del gene che codifica il recettore 2 della ipocretina (orexina): in questo caso il modello animale è ampiamente caratterizzato ed impiegato per studiare il disturbo corrispondente nell'uomo ed, in particolare, per identificare la mutazione autosomica recessiva responsabile della manifestazione del disturbo.

La ricerca genomica negli animali domestici dispone già di importanti applicazioni pratiche basate sulla conoscenza dei geni che controllano caratteri prevalentemente qualitativi. I saggi diagnostici per l'analisi delle mutazioni RN (*PRKAG3*) e alotano (*RYR1*), che influiscono sulla qualità delle carni nei suini, rappresentano probabilmente i casi più rilevanti dal momento che sono molto usati ai fini del miglioramento genetico. Bisogna comunque notare che l'identificazione e la caratterizzazione dei geni responsabili della manifestazione di un carattere non è un prerequisito per lo sviluppo di applicazioni pratiche. Molti gruppi di ricerca, sia pubblici che privati, stanno investendo tempo e denaro per implementare la selezione fenotipica usando marcatori molecolari strettamente associati a geni che svolgono un'azione principale nel controllo di caratteri quantitativi. In questi casi, lo sviluppo di saggi diagnostici non richiede necessariamente il clonaggio, ma semplicemente il mappaggio del gene responsabile.

Le nuove sfide dei metodi di valutazione genetica quantitativa riguardano senza dubbio la possibilità di integrare le informazioni fornite dalla genetica molecolare con quelle sino ad ora disponibili nel campo dalla genetica quantitativa. Il mappaggio di QTL, il clonaggio di geni e, più in generale, la MAS rappresentano solo alcune delle tantissime sinergie che potranno essere create tra genetica quantitativa e biologia molecolare. Ad esempio, nei bovini un sistema integrato di informazioni provenienti dai marcatori genetici usati per aumentare l'accuratezza delle valutazioni genetiche dei riproduttori (tori) in aggiunta alle informazioni fenotipiche rilevate sulle prestazioni delle loro figlie (vacche) rappresenta solo uno dei tanti scenari che l'integrazione della genetica molecolare con quella quantitativa può consentire. Un'ulteriore integrazione può essere individuata nella introgressione genica assistita, ossia nella possibilità di trasferire uno specifico gene ricorrendo all'ausilio di marcatori molecolari. La validità di tale integrazione è stata dimostrata recentemente trasferendo il gene



Fig. 21.14 – Esempari di avicoli derivanti da introgressione del gene *naked neck*.

Booroola, responsabile della prolificità, da una popolazione donatrice ad una ricevente di pecore. Un altro esempio di introgressione genica assistita da marcatori molecolari è quella riguardante il carattere *naked neck* nei polli (Fig. 21.14). Il gene autosomico responsabile di questo carattere controlla la distribuzione del piumaggio a livello del collo, rendendo i polli più tolleranti al caldo. Il gene *naked neck* è stato trasferito da una popolazione donatrice di polli autoctoni di piccole dimensioni in una linea commerciale da carne (Cornish). Una serie di marcatori molecolari rappresentativi del genoma di pollo sono stati impiegati per implementare e velocizzare il recupero del patrimonio genetico della popolazione ricevente. Altre possibili applicazioni dei marcatori molecolari riguardano la conservazione della diversità genetica, per migliorare l'efficacia dei tradizionali schemi di conservazione di risorse genetiche animali a limitata diffusione e la tracciabilità genetica proposta per garantire una più sicura tecnica di tracciabilità dei prodotti e degli animali in produzione zootecnica.

In conclusione, l'evoluzione dei metodi di valutazione genetica nel campo animale, e non solo, sarà sempre più influenzata dallo sviluppo e dalla ricerca di nuove tecniche statistiche o dal recupero ed adattamento di tecniche biometriche già conosciute in altri ambiti scientifici, associate a nuove conoscenze di bioinformatica e genomica, e ad informazioni sempre più approfondite riguardanti i meccanismi molecolari legati al controllo dell'espressione genica (trascrittomica e proteomica).

21.3 Genomica al servizio del miglioramento genetico degli animali domestici

Nell'ambito degli animali domestici, la ricerca genomica è stata concentrata nelle principali specie da allevamento dal momento che l'avanzamento delle conoscenze di base in queste specie può essere sfruttato direttamente nei programmi di miglioramento genetico.

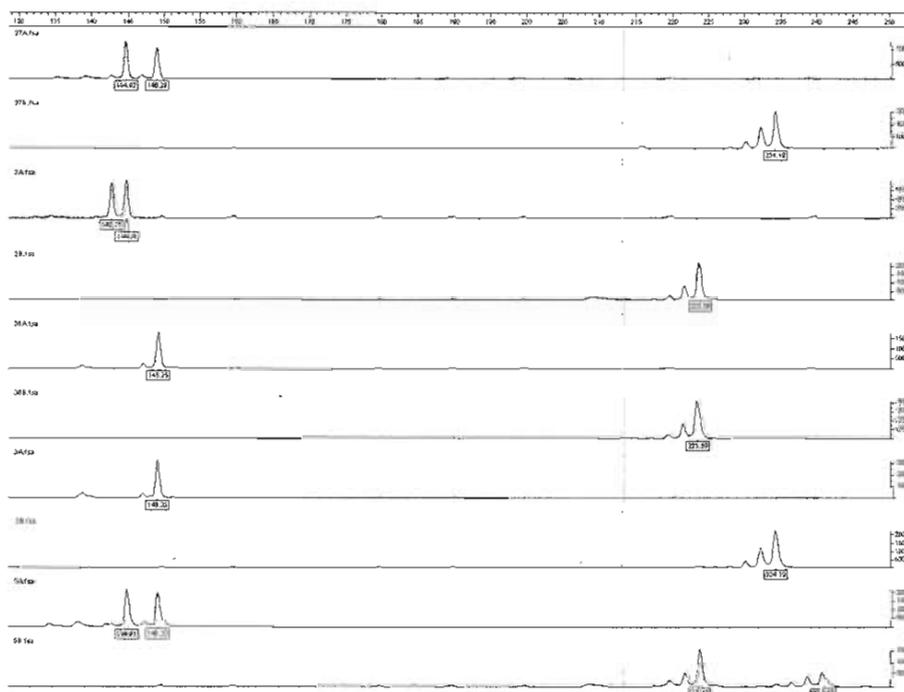


Fig. 21.15 – Polimorfismi a due loci microsatellite (SSR) rilevati in cinque polli mediante sequenziatore capillare usando primer marcati con molecole fluorescenti. La dimensione degli alleli marcatori si aggira attorno a 140-150 pb e 220-230 pb (foto: M. Soattin).

La maggioranza dei marcatori molecolari usati per la caratterizzazione di genomi, la costruzione di mappe genetiche e l'identificazione di geni è costituita da microsatelliti (SSR). I microsatelliti sono tratti di DNA caratterizzati da un numero variabile di sequenze ripetute semplici di 2-5 nucleotidi (ad esempio, con motivo di base AC/TG), altamente informativi in virtù dell'elevato polimorfismo allelico ai loci corrispondenti. Tali marcatori mostrano, infatti, un'ampia variabilità nel numero di ripetizioni sia entro che tra razze nell'ambito di una specie (Fig. 21.15). Nel genoma delle principali specie animali sono presenti diverse migliaia di questi marcatori microsatelliti, che pertanto risultano particolarmente appropriati per studi di mappatura cromosomica e mappaggio genico. Per specifiche regioni cromosomiche di particolare interesse, in termini di contenuto genico, sono stati anche costruiti cromosomi artificiali batterici (BAC). Il sequenziamento di questi cloni, contenenti lunghi inserti di DNA, consente l'ottenimento dei cosiddetti *contigs*, rappresentati da un insieme ordinato di cloni aventi sequenze parzialmente sovrapponibili alle loro estremità, in grado di coprire nel loro complesso un singolo cromosoma. La costruzione di mappe fisiche di specifiche regioni o di interi cromosomi richiede la disponibilità di mappe genetiche sature in modo che i marcatori di sequenza unica e posizione nota possano essere impiegati per selezionare e ordinare cloni adiacenti e successivi (→ Cap. 19).

Negli ultimi anni, sono stati intrapresi molti sforzi per confrontare la mappa del genoma umano con quella del topo. Il sequenziamento del genoma degli animali domestici, come ad esempio quello di pollo, suino e bovino, consentirà di mettere in relazione anche il genoma umano con quello di animali di interesse zootecnico. L'identificazione e la caratterizzazione di geni omologhi permetterà anche di sviluppare un numero consistente di marcatori molecolari basati sul polimorfismo per singoli nucleotidi (SNP) in ogni specie.

I nuovi strumenti molecolari in grado di visualizzare la variabilità a livello del DNA sono applicati per verificare le relazioni di parentela tra individui e per stimare le distanze genetiche tra razze. L'*International Society for Animal Genetics* sta implementando procedure standard basate sull'analisi di aplotipi di marcatori SSR e SNP per la caratterizzazione genotipica di bovini, suini, equini e ovini. Tali informazioni potrebbero rivelarsi molto utili per l'esecuzione di prove di progenie basate sulla valutazione contemporanea di caratteri fenotipici e marcatori molecolari.

21.3.1 Uso dei marcatori molecolari per la caratterizzazione e la selezione genetica degli animali: aspetti teorici

Lo sviluppo delle tecnologie di analisi del DNA ha permesso un notevole progresso nel settore della genetica animale, mettendo a disposizione gli strumenti per la caratterizzazione del genoma delle singole specie e per l'identificazione di geni con un effetto rilevante sulle produzioni zootecniche.

Lo sviluppo della tecnica PCR e la scoperta dei microsatelliti (SSR) hanno consentito un notevole progresso nel modo di analizzare il genoma degli animali. In genere i microsatelliti si trovano localizzati in regioni anonime del DNA, cioè in regioni non codificanti. L'utilizzo di sequenziatori automatici per la loro analisi mediante elettroforesi capillare e l'impiego di software per la interpretazione dei dati ha contribuito a fare dei microsatelliti i marcatori più utilizzati per la costruzione di mappe genetiche, per l'identificazione dei geni che controllano le caratteristiche morfologiche e produttive degli animali, oltre che per l'analisi di parentela e di riconoscimento individuale. In Fig. 21.16 sono riportati esempi di marcatori SSR visualizzati mediante elettroforesi tradizionale e capillare.

Recentemente, l'aumento delle conoscenze a livello del genoma animale e il progresso nell'ambito delle tecnologie applicate alla genetica molecolare hanno permesso

di considerare con più interesse i marcatori basati sulle mutazioni puntiformi del DNA, indicati come polimorfismi dovuti a singoli nucleotidi (SNP). Tali marcatori molecolari sono in assoluto quelli più diffusi e polimorfici nel genoma animale (mediamente uno ogni 500-1.000 nucleotidi). Considerando, ad esempio, che un genoma di mammifero è composto in media da quasi 3 miliardi di nucleotidi, il numero di SNP presenti in ciascuna specie è di qualche milione. Questi marcatori, oltre ad essere i più frequenti nel genoma, sono biallelici e molto più stabili rispetto ai microsatelliti. Inoltre, si prestano ad essere analizzati mediante sistemi completamente automatizzati, detti di *high-throughput*, che sfruttano il fatto che i due alleli possano essere classificati e trattati in modo binario. Le metodiche di genotipizzazione sviluppate sfruttando i marcatori SNP sono basate sull'analisi del punto di mutazione seguendo diverse tecnologie. La tecnica più utilizzata è quella PCR-derivata che prevede una reazione cosiddetta di micro-sequenziamento (*microsequencing primer extension*) usando un primer disegnato con la sua estremità 3' adiacente alla posizione polimorfica: in base al colore della fluorescenza è possibile risalire al nucleotide incorporato e quindi al nucleotide presente nel filamento stampo (Fig. 21.17). Esistono anche altre metodiche sviluppate ricorrendo a sistemi cromatografici, come HPLC (*high-performance liquid chromatography*), o a spettrometria di massa, come ad esempio MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*).

Altre metodiche si basano sull'utilizzo di supporti solidi (*microarray* o *microchip* di DNA) su cui sono fissati oligonucleotidi ad alta densità, che permettono di analizzare contemporaneamente centinaia di SNP. Tutte queste tecnologie rendono possibile analizzare un gran numero di marcatori quasi in tempo reale. Le prime applicazioni di questi marcatori si iniziano a riscontrare anche nel settore della genetica animale con notevoli prospettive per il futuro.

Nelle specie animali, caratterizzate tipicamente da riproduzione incrociata, l'uso di tali strumenti molecolari per il raggiungimento di un progresso genetico attraverso la selezione assistita sembra essere più difficile rispetto a quanto avviene nelle specie vegetali. Tuttavia, l'identificazione di loci per caratteri quantitativi e di loci relativi a geni candidati preposti al controllo di caratteri importanti per le principali produzioni zootecniche (carne, latte, uova, ecc.) può essere considerevolmente accelerata ricorrendo a strategie di mappaggio basate sulla stima del disequilibrio di associazione o *linkage disequilibrium* (LD).

A livello di popolazione, i marcatori molecolari strettamente associati a geni di QTL possono risultare tra loro in disequilibrio di associazione, parziale o totale, così che i possibili aplotipi non sono equamente rappresentati nei gameti. Pertanto, in questa situazione, alcuni aplotipi sono più frequenti di altri (ad esempio, *MQ* e *mq* contro *Mq* e *mQ*), come rappresentato in Fig. 21.18. Quando ciò accade è possibile effettuare la selezione per il carattere quantitativo impiegando direttamente il marcatore molecolare associato al QTL. La probabilità di identificare marcatori molecolari in LD con caratteri quantitativi aumenta nelle popolazioni migliorate di piccola dimensione effettiva, in quanto solo un campione limitato di gameti contribuisce alla generazione filiale, mentre l'affidabilità della selezione aumenta con alti livelli di LD che indicano una stretta associazione genetica tra marcatore molecolare e QTL. Situazioni di LD tra marcatori molecolari e QTL possono anche essere generate sperimenta-

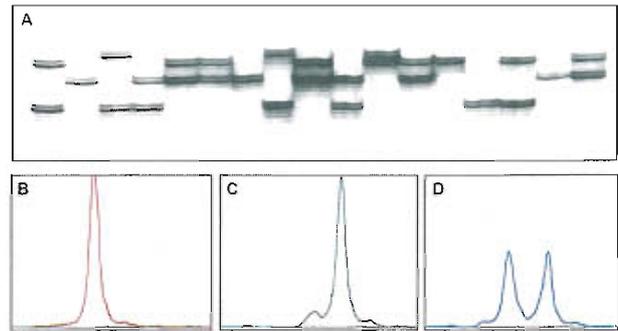


Fig. 21.16 – Marcatori SSR visualizzati mediante elettroforesi tradizionale (A) ed elettroforesi capillare (B-D): gli individui omozigoti evidenziano una sola banda o un solo picco, mentre quelli eterozigoti sono contraddistinti da due bande o da due picchi.

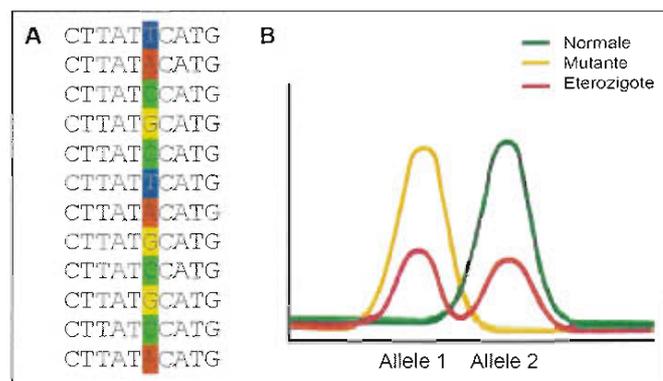


Fig. 21.17 – Marcatori SNP: (A) allineamento multiplo di sequenze che mostra la posizione occupata dal polimorfismo per singolo nucleotide; (B) esempio di interpretazione dei risultati visualizzabili mediante sequenziatore capillare.

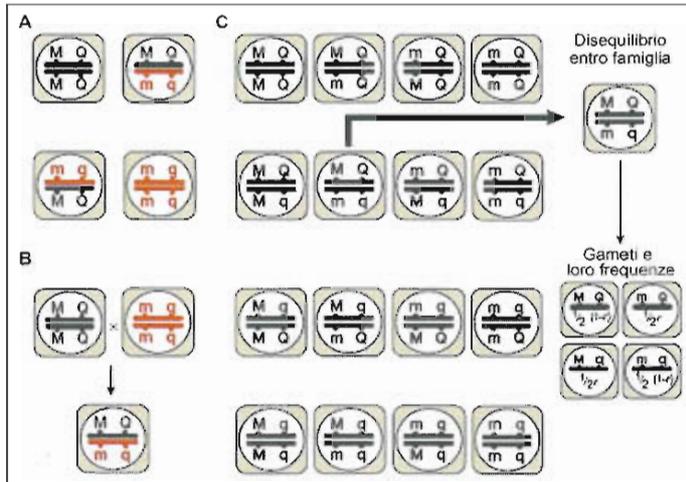


Fig. 21.18 – Parte A: Situazione di *linkage disequilibrium* tra marcatore molecolare e QTL in una popolazione naturale: aplotipi prevalenti ai loci *M/m* e *Q/q* in presenza di stretta associazione in fase *cis*. Parte B: Situazione di *linkage disequilibrium* tra marcatore molecolare e QTL creata artificialmente attraverso l'incrocio di genotipi/fenotipi antagonisti. Parte C: Situazione di *linkage equilibrium* tra marcatore molecolare e QTL: tutti i possibili aplotipi sono ugualmente rappresentati nella popolazione. Disequilibrio di associazione può essere osservato entro singole famiglie, anche con frequenze di ricombinazione piuttosto alte ($r=0,20$). Modificato da: J.C.M. Dekkers e F. Hospital (2002).

mente incrociando individui antagonisti per un dato carattere quantitativo e polimorfici per una serie di marcatori molecolari (Fig. 21.18). In questo caso, il LD tra un marcatore molecolare e il QTL per il carattere quantitativo in esame verrà mantenuto per diverse generazioni ed il numero di generazioni necessarie per giungere alla situazione di equilibrio gametico, cioè aplotipi *MQ*, *mq*, *Mq* e *mQ* prodotti in proporzioni uguali, dipenderà dal grado di associazione genetica tra marcatore molecolare e QTL. Con associazione in fase *cis* (*MQ/mq*) nelle prime generazioni dopo l'incrocio prevarranno i gameti *MQ* e *mq*, così come nel caso di associazione in fase *trans* (*Mq/mQ*) prevarranno i gameti *Mq* e *mQ*. Per alcune generazioni dopo l'incrocio, per effetto dell'associazione fisica i quattro tipi di gameti possibili non si formeranno in proporzioni uguali ma prevarranno quelli parentali determinando la situazione nota appunto come disequilibrio di associazione. Pertanto, l'avvicinamento alla condizione di equilibrio è graduale. In alcuni casi può richiedere anche parecchie generazioni e, comunque, la velocità con cui viene raggiunto è funzione della frequenza di ricombinazione tra i due geni: maggiore è la distanza tra marcatore molecolare e QTL lungo il cromosoma e minore è il numero di generazioni richieste per raggiungere l'equilibrio. Ovviamente, quando un marcatore molecolare e un QTL sono in equilibrio di associazione, allora tutti i possibili aplotipi potranno essere riscontrati nella popolazione e in proporzioni determinate dalle unioni casuali. In questo caso, la rilevazione del marcatore molecolare non fornisce alcuna informazione sul genotipo del QTL (Fig. 21.18). Tale situazione è quella più frequentemente riscontrabile nelle popolazioni animali e, in generale, nelle specie a fecondazione incrociata. Tuttavia, un marcatore molecolare ed un QTL possono risultare in parziale disequilibrio di associazione nell'ambito di una famiglia ed il livello di LD dipenderà dal grado di ricombinazione tra il locus molecolare e quello per il carattere quantitativo, benché all'interno della famiglia il LD può essere usato per mappare un QTL ed effettuare MAS anche quando i loci sono blandamente associati (ad esempio, $r=0,20$).

In termini generali, nelle popolazioni di specie a riproduzione incrociata il *linkage disequilibrium* è osservato soprattutto tra alleli di loci strettamente associati. Tuttavia, è in realtà possibile riscontrare disequilibrio di associazione anche nel caso di loci indipendenti, cioè ubicati su coppie diverse di cromosomi omologhi, qualora gli alleli di questi loci manifestino influenza sul valore selettivo (*fitness*) dei singoli individui. Nel settore zootecnico, l'approccio basato sul LD è attualmente quello più promettente per l'identificazione di marcatori molecolari associati a geni qualitativi e soprattutto quantitativi poiché consente un'elevata accuratezza della mappatura genica. L'approccio basato sui geni candidati prevede, invece, la valutazione specifica di alcuni marcatori molecolari riconducibili a specifici geni che si ritengono potenzialmente coinvolti nell'espressione del carattere quantitativo di interesse.

L'acquisizione di tali informazioni molecolari richiede un grande sforzo finanziario e logistico iniziale. I vantaggi di ordine tecnico-economico rispetto ai metodi tradizionali non sono stati, comunque, ancora del tutto quantificati. La conoscenza dell'eredità e dell'ereditabilità dei caratteri quantitativi oggetto di selezione appare determinante per comprendere le reali potenzialità degli schemi di selezione assistita da marcatori del DNA.

Attualmente l'unica certezza è forse quella che riguarda l'uso degli strumenti di analisi genomica basati sulla rilevazione di marcatori molecolari per attestare la qua-

lità delle produzioni zootecniche e garantire la tracciabilità di singoli genotipi e/o di razze selezionate. D'altro canto, la possibilità di misurare il polimorfismo genomico a livello di popolazioni naturali e sperimentali attraverso l'uso dei marcatori molecolari ha aperto interessanti prospettive anche per il monitoraggio della diversità a livello di specie e per la salvaguardia delle razze locali, soprattutto nell'ottica di garantire la specificità delle produzioni zootecniche.

L'impiego delle informazioni relative ai QTL nei piani di selezione delle specie di interesse zootecnico rappresenta un aspetto innovativo che in futuro potrà integrarsi con i metodi tradizionali di miglioramento basati sulla genetica quantitativa. Le mappe genetiche rappresentano il punto di partenza per l'individuazione e l'isolamento dei geni che hanno un effetto sulle caratteristiche produttive e riproduttive di interesse zootecnico.

L'analisi del DNA mediante marcatori molecolari consente il mappaggio di QTL e il clonaggio di geni coinvolti nell'espressione di caratteri quantitativi seguendo due possibili approcci: i) la scansione del genoma (*genome scanning*); ii) la selezione di geni candidati (*candidate genes*).

Con il *genome scanning* si indaga tutto il genoma dell'animale, tipizzando un certo numero di marcatori informativi, in genere SSR. L'efficacia di questo metodo dipende dal numero di marcatori mappati e quindi dalla copertura del genoma, ma anche dal tipo di popolazione sperimentale e dal numero di animali analizzati. Usando un approccio statistico di mappatura ad intervalli si possono identificare le regioni cromosomiche, ciascuna delimitata da due marcatori molecolari, dove risiedono i QTL principali e quelli secondari aventi insieme un effetto rilevante sulla variabilità di un carattere quantitativo. L'approccio del gene candidato si basa, invece, sull'ipotesi che alcuni geni possano influenzare direttamente o indirettamente l'espressione di un carattere produttivo in base alla disponibilità di informazioni sulla loro funzione fisiologica e biochimica. La selezione di geni candidati e la loro validazione in popolazioni sperimentali appropriate può portare velocemente all'identificazione dei QTL principali in quanto è possibile valutare direttamente l'associazione tra polimorfismi di questi geni e la manifestazione dei caratteri produttivi, senza analizzare il genoma nel suo complesso. I polimorfismi a carico dei *candidate genes* a singoli loci sono generalmente saggiati ricorrendo a marcatori SNP. L'efficacia di questo metodo dipende sostanzialmente dal tipo di carattere valutato e dal numero di animali analizzati. Molteplici sono i casi di studio di geni candidati per caratteri legati alla produzione della carne nei suini e alla qualità del latte nei bovini.

L'approccio di *genome scanning* e quello basato sul *candidate gene* dovrebbero essere usati in modo complementare. L'informazione riguardante la posizione del gene candidato nella mappa genetica della specie oggetto di studio rispetto alla posizione del QTL può risultare determinante per discriminare i migliori candidati tra tutti i possibili geni. Benché il numero di geni candidati potenzialmente coinvolti o responsabili di caratteri produttivi di interesse zootecnico possa essere anche molto alto, combinando le informazioni acquisite attraverso il mappaggio dei QTL nei bovini e nei suini, con le informazioni relative al mappaggio dei geni candidati nelle regioni cromosomiche che contengono i QTL, è possibile validare solo alcuni dei geni candidati e ridurre così drasticamente il loro numero. In definitiva, ciò consente di concentrare l'attenzione unicamente in quelle regioni del genoma dove sono stati mappati sia QTL che geni candidati.

Una volta selezionato un set di marcatori molecolari localizzati nella regione cromosomica a monte e a valle dei geni che controllano una determinata caratteristica dell'animale, è possibile usare tali marcatori nei programmi di miglioramento genetico per effettuare la MAS allo scopo di scegliere gli animali portatori delle varianti più favorevoli. Da ciò la selezione può trarre un enorme vantaggio, sia in termini di tempo

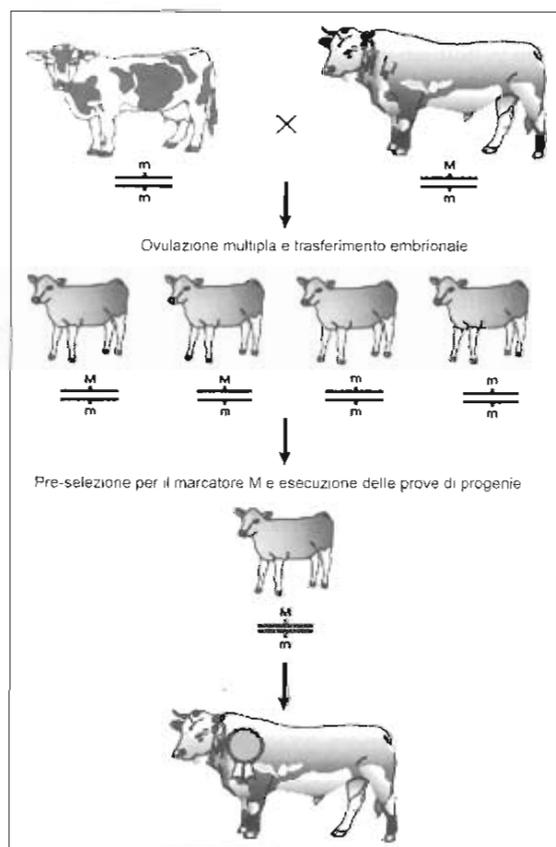


Fig. 21.19 – Esempio di pre-selezione assistita da marcatori molecolari.

che di costi, integrando gli attuali metodi matematico-statistici di valutazione genetica dei riproduttori con le informazioni relative ai geni candidati o ai marcatori associati ai QTL di interesse. La selezione assistita da marcatori molecolari può influire favorevolmente su tutti i fattori che determinano il progresso genetico: l'accuratezza della selezione, l'intensità della selezione e l'intervallo di generazione. Inoltre, tale approccio può aumentare l'efficacia della selezione attuata esclusivamente sulla base delle prestazioni produttive, soprattutto per quelle caratteristiche che si esprimono in un solo sesso, come ad esempio la produzione del latte e il numero di nati per parto, oppure per tutte quelle difficilmente misurabili sugli animali vivi, come le caratteristiche della carcassa e della carne.

I marcatori molecolari potrebbero altresì risultare molto utili per attuare una **pre-selezione** degli individui da sottoporre a prove di progenie (Fig. 21.19). Ad esempio, la produzione di latte è un carattere limitato dal sesso ed è per questo motivo che i tori sono valutati sulla base di prove di progenie usando 60-100 vacche al fine di stimarne la produzione di latte. Visti i costi elevati, solo un numero limitato di tori può essere valutato in base alle prestazioni della generazione filiale. La selezione dei tori da sottoporre a prove di progenie è solitamente fatta tenendo conto delle informazioni ancestrali disponibili sugli ascendenti – pedigree – e ciò implica che tutti i membri di una famiglia *full-sib* vengano considerati possedere lo stesso valore genetico (*breeding value*). Tuttavia, i marcatori molecolari sono potenzialmente in grado di identificare differenze genetiche anche entro queste famiglie in funzione degli alleli ereditati dai singoli membri. Attraverso le tecnologie ripro-

ductive, come ad esempio la ovulazione multipla e il trasferimento di embrioni, è possibile ottenere diversi vitelli per ogni femmina e la pre-selezione dei tori potrebbe essere basata sulle informazioni fornite dai marcatori molecolari associati a caratteri quali-quantitativi zootecnicamente importanti.

Gli strumenti biotecnologici disponibili per l'analisi del DNA genomico potranno rendere più agevoli ed efficaci gli interventi atti a selezionare gli animali con i geni deputati al controllo delle caratteristiche desiderate. Quando i geni utili ai fini di migliorare la produzione di carne e di latte, sia come quantità che qualità, ma altresì la resistenza a malattie ed a condizioni ambientali sfavorevoli, saranno direttamente individuabili nel genoma si potranno selezionare gli animali in base agli esiti delle analisi del DNA, senza l'interferenza di fattori esterni. È altrettanto chiara l'utilità che può derivare da strumenti biotecnologici in grado di agevolare l'accertamento dello stato di salute di un animale (diagnosi), ma anche di fornire informazioni sulle misure preventive da adottare per impedire l'insorgenza di una malattia (profilassi) o eventualmente per ricercare i rimedi e i farmaci più adatti a curare una malattia (terapia).

Attualmente, in letteratura sono disponibili informazioni relative a molte mutazioni già caratterizzate che hanno un effetto sulle caratteristiche produttive, riproduttive, di resistenza alle malattie e che causano difetti genetici, sia per quanto riguarda la specie bovina che la specie suina. Fra queste è opportuno ricordare la mutazione del gene *CRC* (indicato anche come *RYRI*), che controlla la sensibilità all'alotano e che è la causa del difetto noto come *PSE* (*Pale Soft Exudative*) caratteristico della carne non adatta per la produzione di prosciutti di alta qualità. Molte altre informazioni genico-molecolari relative a geni che influenzano i caratteri produttivi sono attualmente sfruttate per la selezione dei riproduttori in modo da evitare l'uso di soggetti portatori

di varianti alleliche non desiderate e da favorire la scelta dei soggetti portatori di combinazioni geniche favorevoli.

Oltre che per il miglioramento genetico degli animali di interesse zootecnico, la genetica molecolare offre gli strumenti per l'analisi di paternità e la tracciabilità degli animali, aspetti che influenzano anche la selezione ma che hanno soprattutto importanti risvolti commerciali poiché consentono l'identificazione dei prodotti di origine animale. Attualmente, per le principali specie di interesse zootecnico, la **diagnosi di parentela** è basata prevalentemente sull'analisi del DNA utilizzando i marcatori codominanti tipo microsatelliti. In generale, per queste diagnosi viene analizzato un pannello di loci SSR, almeno una decina, ricorrendo a PCR multiplex al fine di produrre fingerprint genotipici per tutti gli animali da confrontare. Tale analisi consente di "genotipizzare" i singoli individui e di verificare le relazioni genealogiche tra i vari individui in esame. L'uso di marcatori microsatelliti di loci altamente polimorfici per ogni specie assicura un elevato potere discriminante nelle popolazioni considerate, permettendo così di ottenere un'alta **probabilità di paternità** (P). Il principio alla base di qualsiasi test di paternità è molto semplice: le caratteristiche genetiche del figlio che non sono rinvenibili nella madre devono essere state necessariamente ereditate dal padre (**Fig. 21.20**). In questo campo sono state sviluppate diverse formule per il calcolo di indici di attribuzione di paternità oppure, alternativamente, di esclusione di paternità. In pratica, se il profilo genetico-molecolare del/la figlio/a e quello del padre presunto non sono compatibili per due o più alleli marcatori, l'esclusione di paternità è certa. Al contrario, se i profili concordano in tutti i loci marcatori analizzati, vi è un'attribuzione di paternità. In termini numerici, l'espressione della probabilità di paternità prevede il calcolo di indici probabilistici che tengono conto della segregazione genetica e delle frequenze alleliche ai diversi loci considerati nelle analisi. Si tratta di una trasformazione algebrica di un rapporto di verosimiglianza:

$$P = \frac{1}{(1 + X/Y)}$$

dove X è funzione delle classi genotipiche e Y è funzione delle frequenze alleliche. È opinione comune che la paternità sia praticamente provata quando l'indice di paternità è superiore a 0,997.

L'analisi dei marcatori microsatelliti è attualmente usata anche per l'identificazione degli animali, basata sul calcolo della **probabilità di identità** (I). L'indice I valuta la probabilità che due animali, non gemelli identici, scelti a caso nella popolazione possano presentare lo stesso genotipo a tutti i loci microsatelliti presi in considerazione nell'analisi. Maggiore è il numero di loci marcatori utilizzati per caratterizzare la popolazione oggetto di studio e minore è la probabilità che due animali presi a caso presentino la stessa composizione allelica a tutti i loci analizzati. Su questo principio si basa anche la tracciabilità della carne e dei prodotti di origine animale in generale. Quando diversi campioni biologici prelevati direttamente dagli animali o successivamente dalla carne al macello, o dai tagli al supermercato producono fingerprint molecolari identici per il pannello di marcatori microsatelliti scelto per effettuare l'analisi del DNA, significa che questi campioni appartengono sicuramente allo stesso soggetto che può così essere identificato in modo molto preciso.

L'analisi del DNA può anche essere condotta ricorrendo a marcatori dominanti PCR-derivati multilocus come, ad esempio, M-AFLP e S-SAP (→ Cap. 17). In questi casi è possibile creare dei veri e propri fingerprint genomici (**Fig. 21.21**) per tutti gli animali da confrontare e costruire matrici di coefficienti di identità o di similarità genetica tra individui in tutte le possibili combinazioni a coppia. Tali matrici riassumono le misure di variazione genetica presente entro singole popolazioni e le relazio-

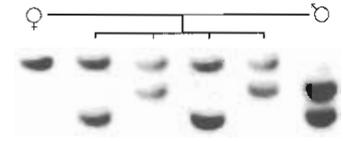


Fig. 21.20 – Risultato di un test di paternità: al locus analizzato il padre è eterozigote, evidenziando due alleli, e la madre è omozigote, ma per un allele diverso. In ognuno dei soggetti della discendenza, l'allele materno si trova combinato con uno dei due possibili alleli paterni.

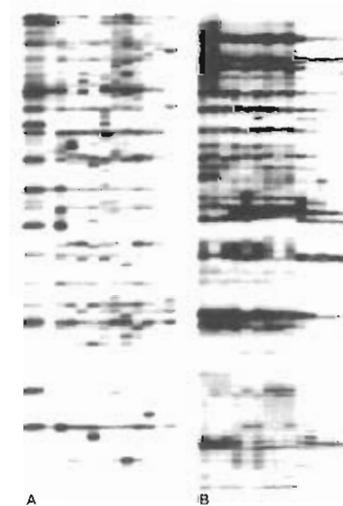


Fig. 21.21 – Fingerprint genomici di pollo prodotti usando marcatori S-SAP (A) e M-AFLP (B) con primer disegnati per ibridarsi specificatamente in corrispondenza di motivi ripetuti, rispettivamente, minisatelliti o microsatelliti (foto: M. Soattin).

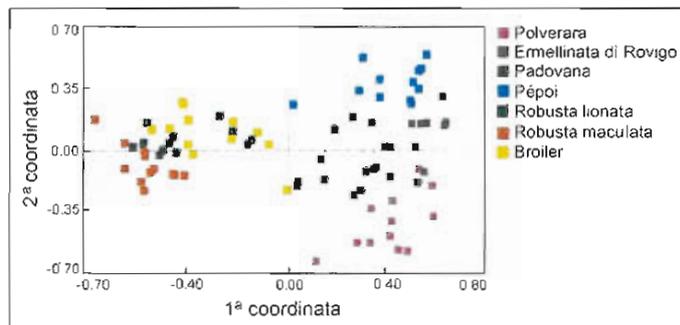


Fig. 21.22 – Centroidi di razze autoctone di polli definiti usando le matrici di similarità genetica. Fonte: M. Soattin e M. Cassandro.

e prodotti di origine animale; vi) determinare le relazioni di parentela tra individui.

Nel breve e medio termine non è pensabile una sostituzione totale dei metodi tradizionali di selezione con quelli moderni basati sulle conoscenze del genoma, ma è verosimile una loro sempre maggiore integrazione. Le potenziali applicazioni dei marcatori molecolari lasciano intravedere un uso sempre più consistente di questi strumenti diagnostici sia per il miglioramento che per la salvaguardia delle produzioni zootecniche.

21.3.2 Basi genetico-molecolari dei caratteri qualitativi e quantitativi

La ricerca a livello genomico è cominciata una quindicina di anni fa con l'identificazione dei geni responsabili di alcuni caratteri qualitativi negli animali domestici. Secondo stime recenti, dei quasi 300 caratteri controllati da singoli geni complessivamente studiati nelle specie animali, al momento sono stati caratterizzati circa un quarto di questi geni. Ciò ha consentito la messa a punto di test del DNA per identificare le mutazioni che causano malattie ereditarie semplici ai fini della selezione genotipica. Tuttavia, anche quando il gene non risulta noto, è possibile usare marcatori molecolari associati alla manifestazione del carattere corrispondente in modo da effettuare una selezione genotipica indiretta.

Gli alleli responsabili di malattie genetiche sono generalmente presenti a frequenze molto basse nelle popolazioni così che le malattie, che si manifestano per lo più allo stato recessivo, raramente arrivano a colpire più dello 0,1% degli individui. Per questo motivo la loro rilevanza economica è piuttosto limitata. Bisogna, comunque, considerare che per alcune malattie a controllo monogenico, l'uso diffuso dell'inseminazione artificiale ha portato la percentuale di portatori sani presenti tra gli animali *top-breeding* a raggiungere o superare valori del 10%, soprattutto nei cavalli e nei bovini. Per alcune di queste malattie sono stati sviluppati test del DNA che vengono usati normalmente per identificare gli animali portatori, allo stato eterozigote, degli alleli responsabili delle malattie.

Anche per molti caratteri quantitativi sono stati studiati i meccanismi di controllo genetico-molecolare e sviluppati saggi diagnostici basati sul DNA utili ai fini della selezione, soprattutto considerando che alcuni geni *major* nell'ambito di QTL mostrano modelli di segregazione tipicamente mendeliani. Marcatori molecolari associati a geni responsabili di malattie, idonei per intraprendere programmi di selezione genotipica, sono stati identificati nei suini, nei bovini e negli ovini attraverso analisi di associazione oppure mediante mappatura comparativa. Ad esempio, nei suini sono conosciuti due geni responsabili di elevata crescita muscolare associata a ridotta qualità della carne. La sindrome da ipertermia maligna, che causa la suscettibilità allo stress nei suini e che rende la carne morbida e pallida, è dovuta ad una mutazione recessiva del gene *RYR1* (*ryanodine receptor 1*) che agisce a livello dei canali di rilascio del calcio nei muscoli scheletrici. Da alcuni anni è disponibile un test del DNA che consente di

ni filogenetiche esistenti tra popolazioni, agevolando così la caratterizzazione di pool genici e l'identificazione di singoli genotipi (Fig. 21.22).

In conclusione, l'adozione dei marcatori molecolari in zootecnia ha già permesso molte utili applicazioni nel miglioramento genetico degli animali di interesse zootecnico: i) clonare e caratterizzare geni che controllano caratteri produttivi; ii) mappare loci che controllano caratteri quantitativi; iii) diagnosticare malattie ereditarie; iv) selezionare genotipi con varianti alleliche o combinazioni geniche favorevoli; v) identificare animali

verificare direttamente la presenza di tale mutazione, permettendo così di evitare l'esecuzione di un test fenotipico per la sensibilità all'alotano. Un meccanismo completamente differente alla base dell'eccessiva crescita muscolare è stato individuato nelle pecore. Il gene *CLPG* (*callypige*) determina una notevole ipertrofia muscolare delle cosce: la manifestazione fenotipica è visibile solo negli animali eterozigoti, mentre gli animali omozigoti per la mutazione di questo gene manifestano un fenotipo normale.

L'estensiva identificazione di QTL nelle piante ha promosso l'esecuzione di una serie di incroci sperimentali nei polli, nei suini e nei bovini con l'intento di ricercare QTL per i caratteri economici più importanti, come la capacità di crescita e la fertilità degli animali, la composizione del latte, le caratteristiche qualitative della carne, nonché per i caratteri legati alla morfologia e alla salute degli animali (Fig. 21.23). La procedura di mappatura fine di questi loci richiede un numero ampio di animali da caratterizzare sia a livello fenotipico che genotipico.

Recentemente il clonaggio di QTL in razze di bovini si è dimostrato fattibile. Le basi geneticomolecolari di due differenti QTL che riguardano la composizione e la resa del latte sono state acquisite sfruttando un approccio di *linkage disequilibrium* (LD) che ha permesso di mappare e clonare due geni entrambi portatori di una mutazione mis-senso: uno codificante il diacilglicerolo aciltransferasi (*DGAT1*, *diacylglycerol acyltransferase*) coinvolto nella biosintesi dei trigliceridi e l'altro codificante il recettore dell'ormone della crescita (*GHR*, *growth hormone receptor*). Nei suini è stato identificato un QTL nella parte distale del cromosoma 2

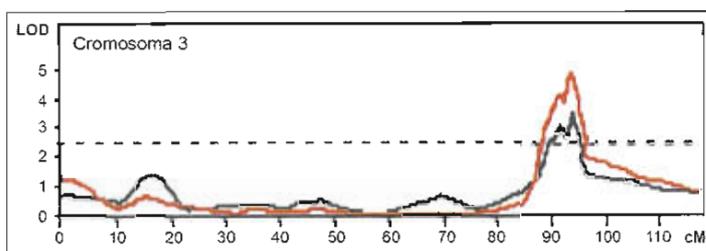


Fig. 21.23 - Localizzazione di un QTL in una mappa cromosomica.

nella regione dove è stato mappato il gene *IGF2* (*insulin-like growth factor*) codificante un fattore di crescita insulina-simile che influenza la massa muscolare e la composizione del grasso. L'analisi degli aplotipi in combinazione con l'analisi di co-segregazione di marcatori molecolari ha permesso di posizionare il QTL all'interno di un segmento di cromosoma di 500 kb. Nella regione del cromosoma 2 dove è stato mappato il QTL per la massa muscolare e la deposizione di grasso è stato identificato e caratterizzato anche il gene codificante una catepsina (*CTSF*, *Cathepsin F*), proteinasi lisosomale coinvolta nel turnover intra ed extracellulare di proteine, che influenza la qualità della carne per la produzione di prosciutti. In Fig. 21.24 è riportata la mappa genetica del cromosoma 2 di suino con indicazione del QTL per la qualità della carne e con la posizione dei geni *IGF2* e *CTSF*.

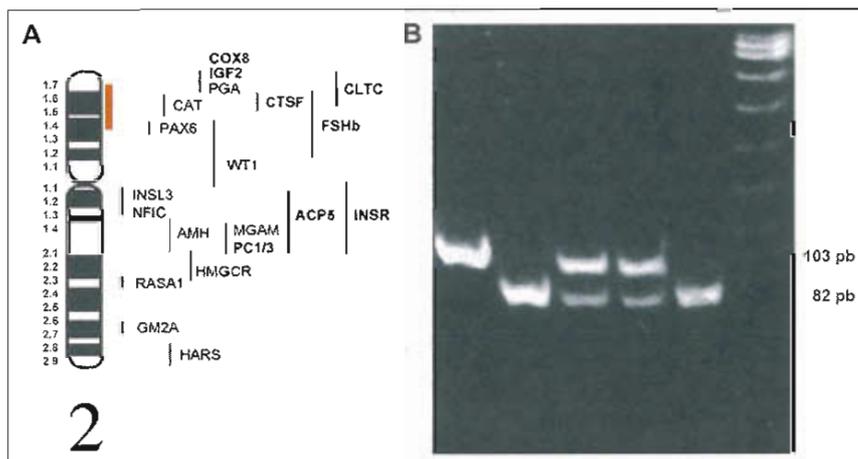


Fig. 21.24 - Mappa genetica del cromosoma 2 di suino con indicazione del QTL per la qualità della carne e con la posizione dei geni *IGF2* e *CTSF* (A); Analisi genotipica mediante marcatori CAPS di suini al locus per il gene codificante la catepsina (B).

Nell'arco di mezzo secolo la genetica si è spostata dalla scoperta della struttura del DNA al sequenziamento del genoma di un ampio numero di microrganismi fino ad arrivare a quello del genoma umano. Lo sviluppo di nuove tecniche ha permesso un aumento considerevole delle nostre conoscenze relativamente alle basi genetiche dei caratteri qualitativi. Negli ultimi vent'anni, nell'uomo sono state identificate più di 1.300 mutazioni ereditate secondo modelli Mendeliani. La ricerca nelle specie animali da allevamento è da sempre strettamente connessa con la conoscenza dei geni e della loro funzione nell'organismo umano. Tuttavia, le malattie genetiche difficilmen-

te giocano un ruolo chiave negli schemi moderni di selezione poiché nel tempo sono stati eliminati i portatori di mutazioni dalle popolazioni sperimentali attraverso programmi di “eradicazione”.

I caratteri quantitativi complessi come la crescita, la resistenza alle malattie, la qualità delle carni sono molto importanti per la selezione animale. Generalmente, la mappatura ad alta risoluzione è realizzata attraverso un aumento del numero di animali analizzati ed una valutazione più affidabile del loro fenotipo. Nelle piante di interesse agrario è stato dimostrato che l'identificazione dei QTL ed il clonaggio dei geni responsabili dei caratteri quantitativi possono essere concretamente realizzati. Negli animali da allevamento questo è complicato dall'impossibilità di disporre di ampie popolazioni segreganti. Pertanto è necessario mappare i caratteri attraverso un approccio di LD usando popolazioni sperimentali. Nei gameti gli alleli di un gene possono non essere combinati in modo casuale con gli alleli di un altro gene. Quando i geni non sono in equilibrio si parla di *linkage disequilibrium*, o disequilibrio delle fasi gametiche, ed equivale alla presenza contemporanea e non casuale in una popolazione di due geni con deviazione dall'equilibrio Hardy-Weinberg tale che la frequenza dei geni combinati insieme sia maggiore di quella derivabile semplicemente dal prodotto delle frequenze dei singoli geni. Questa condizione può essere causata e mantenuta principalmente da fattori quali l'associazione fisica dei loci corrispondenti e la combinazione di alleli favorevoli in termini di *fitness*, ma può anche essere dovuta al mescolamento di popolazioni con frequenze geniche distinte o al campionamento gametico casuale nelle piccole popolazioni.

Il LD può essere, quindi, attribuibile all'associazione di singoli alleli marcatori o combinazioni di alleli marcatori strettamente associati (aplotipi) con la mutazione nucleotidica che causa un effetto quantitativo a livello della manifestazione del carattere (QTN, *quantitative trait nucleotide*). L'ipotesi di base è che un nuovo allele appaia nella popolazione in seguito ad una mutazione oppure a causa della migrazione da un'altra popolazione, e che si diffonda rapidamente nelle nuove generazioni in risposta alla selezione artificiale. La mappatura dei loci affetti da LD sfrutta la successione degli eventi di ricombinazione che riducono la frequenza di un frammento cromosomico comune, identico per discendenza (IBD, *identical by descent*), attorno al nucleotide che condiziona il carattere quantitativo. Il successo di tale approccio dipende soprattutto dall'estensione del LD, cioè da quanto i blocchi cromosomici corrispondenti all'aplotipo sono conservati nel genoma. Rispetto alle popolazioni umane, nei bovini è stato osservato che il LD può estendersi a segmenti cromosomici più lunghi ed, in genere, il numero di marcatori richiesti per l'identificazione di tali regioni caratterizzate da LD è molto più basso.

21.3.2.1 Caso di studio - Ricerca e analisi di geni candidati al controllo della qualità della carne nei bovini

L'eredità dei caratteri quantitativi alla base della qualità delle carni nelle varie razze di bovini è al momento poco nota a livello genetico-molecolare. Esistono numerose evidenze sperimentali che dimostrano che la qualità della carne è migliore in certe razze e peggiore in altre. Ad esempio, è noto che esistono differenze consistenti in termini di tipo di grassi (saturi contro insaturi) tra razze da carne e da latte.

Il miglioramento genetico ha permesso di conseguire successi considerevoli nei bovini, portando alla selezione di razze altamente specializzate per la produzione di latte o di carne. Fino ad oggi, la selezione per caratteristiche qualitative è stata invece meno curata, nonostante esistano moltissimi dati che dimostrano una notevole variazione tra razze per le caratteristiche chimiche, fisiche, istologiche, reologiche e organolettiche della carne. Benché una parte consistente della variazione sia attribuibile

Chimiche* Umidità, quantità di proteine e lipidi, profilo amminoacidico, valore biologico delle proteine, minerali, vitamine, pH
Reologiche Durezza, coesione, elasticità, masticabilità
Fisiche Dimensioni, resistenza al taglio, potere di ritenzione idrica, calo alla cottura, solubilità del tessuto connettivo
Organolettiche Colore, aroma, sapore, tenerezza, succosità
Istologiche Grana, tessitura, tipo di fibre, spessore delle fibre, distribuzione dei grassi, distribuzione del connettivo
Sanitarie Carica batterica, presenza di patogeni e di sostanze nocive

*Contenuto di mioglobina della carne, espresso in mg/100 g di carne fresca: vitello: 2; vitellone: 10; bovino adulto: 18 (Fonte: Del Monte, 1979).

Tab. 21.5 – Principali caratteristiche qualitative della carne (Fonte: M. Cassandro).

a fattori ambientali, è indubbio che i fattori genetici abbiano un ruolo rilevante nel determinare la qualità della carne, in termini di composizione degli acidi grassi e delle proteine, tipo e spessore delle fibre muscolari, distribuzione dei grassi e del tessuto connettivo, ecc. Le principali caratteristiche qualitative della carne nei bovini sono riassunte in **Tab. 21.5**.

Da qualche anno sono in atto programmi di ricerca a livello mondiale volti ad identificare le regioni cromosomiche dove risiedono i QTL associati a particolari caratteristiche qualitative della carne, riconducibili non solo alle proprietà chimico-fisiche, ma anche a durezza, sapore, ecc. Il mappaggio di marcatori molecolari strettamente associati a tali QTL potrebbe consentire, da un lato, di intraprendere programmi di selezione assistita, dall'altro, di clonare i geni responsabili o coinvolti nel controllo di specifiche caratteristiche.

L'identificazione di marcatori molecolari associati a QTL per caratteristiche qualitative della carne richiede alcune indagini preliminari che possono essere così riassunte: i) Comparazione diretta tra diverse razze con animali allevati nelle stesse condizioni al fine di stabilire la componente genetica della variazione per ciascuno dei caratteri quantitativi studiati. Tale conoscenza è fondamentale non solo per confermare la significatività dei singoli QTL mappati ma anche per testare la validità di eventuali geni candidati. ii) Selezione di polimorfismi per singoli nucleotidi (SNP) da impiegare come marcatori codominanti per l'identificazione di alleli di geni ritenuti candidati al controllo di specifici caratteri quantitativi. I geni candidati sulla base dei quali possono essere generati marcatori di tipo SNP sono usualmente selezionati in funzione del ruolo biochimico potenzialmente svolto nella composizione del muscolo e nel suo sviluppo nonché del prodotto proteico codificato quando esso costituisce un elemento strutturale del muscolo. La disponibilità di queste informazioni consente di saggiare geni candidati e di mappare QTL sulla base degli aplotipi generati dai marcatori SNP.

L'analisi dei geni candidati si è rivelata, dopo il sequenziamento del genoma delle principali specie animali, una delle strategie più efficaci per stabilire l'associazione tra varianti alleliche di un gene e determinate caratteristiche morfologiche e/o funzionali degli individui che compongono una popolazione. Tale analisi prevede la valutazione di polimorfismi nucleotidici o aplotipi molecolari riconducibili a specifici geni che si ritengono potenzialmente coinvolti nell'espressione di un particolare carattere quantitativo in base alle informazioni disponibili sui prodotti proteici da questi codificati e/o sul processo metabolico in cui questi sono coinvolti. Molti studi sono stati condotti per mappare marcatori molecolari associati a geni responsabili della manifestazione fenotipica di un certo carattere e che potrebbero essere sfruttati in programmi di selezione assistita. Al momento, per i bovini è stata stilata una lista che comprende alcune centinaia di geni candidati, responsabili della formazione di elementi struttura-

Tab. 21.6 – Principali geni candidati al controllo della qualità della carne nei bovini. A cura di: M. Soattin.

Gene candidato	Crom.	Funzione putativa	No. accessione
CAPN1 (Proteasi calcio-dipendente)	29	Proteasi cisteinica (μ -calpaina) che degrada le proteine miofibrillari nel periodo post-mortem. Processo di intenerimento della carne.	AF248054 AF252504
DGAT1 (Diglicerolo aciltransferasi)	14	Enzima chiave nella biosintesi dei trigliceridi. Deposizione di grasso intramuscolare e accumulo di grasso nel latte.	AJ318490
TG (Tiroglobulina)	14	Interviene nel metabolismo dei lipidi. Deposizione di grasso intramuscolare e accumulo di grasso nel latte.	M35823
LEP (Leptina)	4	Ormone secreto dal tessuto adiposo. Regola l'appetito, la ripartizione dell'energia e il rapporto tra massa grassa e magra del corpo.	AB070368
UCP2 (Proteina non-legante)	15	Limita il numero di radicali liberi nelle cellule inibendo gli stress ossidativi.	BC011737
MT2A (Metalotioneina)	18	Lega metalli come rame e cadmio limitandone la tossicità. Inibisce lo stress ossidativo e le infiammazioni.	M76977
CPE (Carbossipeptidasi)	-	Coinvolta nella sintesi degli ormoni.	AY147818
MC1R e MC4R (Recettori melanocortinici)	18/24	Influenzano l'azione della leptina.	NM174108 NM005913
IGFBP3 (Fattore di crescita insulinico proteina-legante)	4	Trasportatore e modulatore principale dei fattori di crescita insulinici.	NM174556
CRH (Ormone corticotropina-rilasciante)	14	Causa il rilascio di glucocorticoidi con inibizione dell'appetito.	AF340152
POMC (Pro-opio melanocortina)	11	Interviene nella regolazione dell'appetito.	AN174151
GH (Ormone della crescita)	19	Controlla la crescita e il metabolismo.	AY912488
GHR (Recettore dell'ormone della crescita)	20	Interagisce con l'ormone della crescita.	AF140284
POU1F1 (Fattore di trascrizione)	1	Fattore di trascrizione che determina l'espressione di GH.	NM174579
FABP3 (Proteine acidi grassi-leganti)	10	Trasporto e riserva di acidi grassi (nel cuore).	NG001365
CAST (Calpastatina)	7	Inibitore della calpaina.	L14450
LOX (Lisilossidasi)	7	Enzima coinvolto nella formazione dei legami tra le fibre di collagene.	NM173932
SCD (Stearoil-CoA desaturasi)	26	Converte gli acidi grassi saturi in moninsaturi.	AB075020
AMPK (PRKAG3) (Proteina chinasi AMP-attivata)	2	Influenza il metabolismo del glicogeno.	DQ082732-6
Miostatina o GDF8 (Fattore della crescita e della differenziazione)	2	Controllo negativo sullo sviluppo muscolare.	AF019761
mtDNA (Geni mitocondriali)	-	Direttamente coinvolti nel mantenimento dei processi energetici cellulari.	AB074962 AB074968

li o coinvolti nella regolazione di processi metabolici, in grado potenzialmente di influenzare il fenotipo delle razze bovine da carne. Inoltre, per molti di questi geni si è provveduto all'identificazione di marcatori SNP e si è approntato un protocollo per la loro rilevazione. Le sequenze dei geni ritenuti candidati al controllo di importanti caratteristiche qualitative e quantitative possono essere reperite anche attraverso il confronto del genoma bovino con quello umano. In generale, le informazioni relative ad un gene candidato si possono acquisire anche valutando un suo omologo in una specie diversa da quella oggetto di studio e non necessariamente animale.

Allo stato attuale delle conoscenze, la **Tab. 21.6** include la lista dei più importanti geni ritenuti candidati al controllo della qualità della carne nei bovini.

La variazione allelica del gene *CAPN1* (*micromolar calcium-activated neutral protease*) è stata recentemente messa in stretta relazione con la tenerezza della carne nei bovini. Questo gene codifica una proteasi Ca-dipendente e muscolo-specifica, nota come μ -calpaina, ritenuta l'enzima chiave del processo di "maturazione post-mortem" poiché capace di degradare le proteine miofibrillari durante il periodo cosiddetto di frollatura. Più in particolare, il grado di tenerezza della carne sembrerebbe dipendere dalla regolazione dell'attività della μ -calpaina. È interessante sottolineare che il gene *CAPN1* è stato mappato nella regione telomerica del cromosoma 29 e che un QTL associato al carattere tenerezza è stato localizzato nella stessa regione cromosomica, avvalorando così la tesi che esso possa realmente essere un gene coinvolto nel controllo di questo carattere.

La deposizione di grasso intramuscolare, caratteristica definita marezza, negli animali di interesse zootecnico è stata oggetto di molte analisi molecolari volte alla determinazione e localizzazione di QTL. Nei bovini, un QTL associato al carattere marezza è stato mappato nella regione centromerica del cromosoma 14. Successivamente il gene *TG* (*thyroglobulin*) codificante una tireoglobulina, il precursore di un ormone tiroideo che interviene nel metabolismo dei lipidi regolando la produzione di grasso intramuscolare è stato mappato nella stessa regione cromosomica. Un altro gene candidato, *DGAT1* (*diacylglycerol acyltransferase*), è stato dimostrato essere coinvolto nel controllo della produzione di grassi nei bovini. Tale gene codifica un enzima che catalizza la fase finale della sintesi dei trigliceridi ed è stato messo in relazione anche con il contenuto di grassi nel latte. Ulteriori evidenze sperimentali hanno permesso di considerare *DGAT1* un gene candidato per la deposizione di grasso intramuscolare in quanto, oltre ad essere direttamente implicato nella sintesi dei trigliceridi, i suoi trascritti sono stati identificati anche nel tessuto adiposo oltre che a livello della ghiandola mammaria. Inoltre, questo stesso gene è stato mappato nella regione del cromosoma 14 dove è stato localizzato il QTL associato alla marezza.

La valutazione dell'effetto dei polimorfismi dei geni *TG* e *DGAT1* sul contenuto di grasso a livello dei muscoli semitendinoso e longissimus dorsi di 55 bovini (28 *Frisona tedesca* e 27 *Charolais*) ha messo in evidenza risultati significativi per entrambi i geni candidati ed in entrambe le razze. L'effetto di *DGAT1* è stato evinto a livello del muscolo semitendinoso mentre quello di *TG* a livello del muscolo longissimus.

Numerosi altri geni implicati in diversi processi metabolici sono stati valutati per verificarne il coinvolgimento nella determinazione di caratteristiche favorevoli della carne. Quattro dei geni valutati, il cui polimorfismo è stato studiato attraverso analisi di conformazione dei singoli filamenti (marcatori SSCP), analisi dei frammenti di restrizione (marcatori RFLP) oppure analisi di sequenziamento (marcatori SNP) sono stati considerati buoni candidati: gene *CPE* (*carboxypeptidase E*), gene *UCP2* (*uncoupling protein 2*), gene *MT2A* (*metallothionein IIA*) e gene *SIM1* (*single-minded homologue 1*). La carbosipeptidasi di tipo A è un enzima digestivo in grado di idrolizzare i legami tra amminoacidi in punti specifici delle catene polipeptidiche. La funzione della proteina codificata dal gene *UCP2* è quella di limitare il numero di radicali liberi nelle cellule. La metallothioneina è una proteina cisteinica avente il ruolo di trasportare metalli come il rame, lo zinco e il cadmio. Non sono invece disponibili informazioni sulla funzione del gene *SIM1*: si ritiene che questo possa determinare anomalie a carico del sistema nervoso e determinare disordini dello sviluppo.

Diversi geni candidati al controllo dell'obesità sono stati identificati attraverso lo studio di mutazioni puntiformi a loro carico seguendo un approccio di sequenziamento simultaneo. Uno di questi è il gene *LEP* (*leptin*), che presiede alla sintesi della leptina, un ormone secreto dal tessuto adiposo che agisce con un controllo a "feedback" sulla nutrizione. Altri geni appartengono alla famiglia *MCR* (*melanocortin receptors*) dei

recettori melanocortinici associati alla membrana, il recettore 1 della dopamina (*DRD1*, *dopamin receptor D1*) e il fattore di crescita insulinico legante la proteina 3 (*IGFBP*, *insulin growth factor binding protein*).

Alcuni SNP analizzati nei geni *CRH* (*corticotrophin-releasing hormone*), *POMC* (*pro-opiomelanocortin*) e *MC4R* (*melanocortin-4 receptor*) sono stati messi in relazione con l'incremento medio giornaliero, l'area della sezione del muscolo longissimus dorsi, il peso vivo dell'animale e quello della carcassa calda alla macellazione. Le informazioni attualmente disponibili suggeriscono che i prodotti genici di *CRH* e *POMC* svolgano un ruolo chiave nella regolazione dell'appetito, e che i recettori melanocortinici siano coinvolti nella regolazione dell'obesità. Nell'uomo il recettore codificato dal gene *MC4R* interagisce con la leptina, il neuropeptide Y e con l'ormone α *MSH* (*melanocyte-stimulating hormone*) regolando così lo sviluppo corporeo e l'appetito. Nei topi è stato dimostrato che l'inattivazione del gene *MC4R* determina l'insorgenza di obesità.

L'ormone che rilascia la corticotropina (*CRH*) causa indirettamente il rilascio di glucocorticoidi che sono considerati dei forti inibitori della crescita. La corticotropina, comunemente classificata come un ormone da stress, è prodotta nell'area del cervello adibita al controllo dell'appetito. Tale ormone determina il rilascio di glucocorticoidi che agiscono negativamente sull'appetito attraverso la produzione di leptina e un aumento della produzione di pro-opiomelanocortina. L'eccesso di quest'ultima comporta un aumento della sintesi dell'ormone α *MSH* il quale legandosi con il recettore della melanocortina provoca una riduzione dell'appetito. Inoltre, l'aumento di leptina, indotta dai glucocorticoidi, si esplicita attraverso la diminuzione del neuropeptide di tipo Y, uno stimolatore dell'appetito.

Recentemente l'analisi di una collezione di cloni di cDNA isolati da diversi muscoli di bovino ha portato all'identificazione di una serie di trascritti riconducibili a geni codificanti proteine coinvolte nel metabolismo energetico (*COX*, citocromo ossidasi e *NADH* deidrogenasi) e costituenti il sistema contrattile (catene di miosina e isoforme di troponina). Questi risultati indicano la possibilità di indagare le loro sequenze geniche allo scopo di saggiare nuovi geni potenzialmente candidati al controllo della qualità della carne.

Anche i geni *GH* (*growth hormone*) e *POU1F1* (*Pit1 transcription factor*) sono stati suggeriti come geni candidati associati alla variazione genetica dei caratteri legati alla produzione di carne in quanto i loro prodotti hanno un ruolo essenziale nei meccanismi fisiologici legati alla crescita. In particolare, *GH* codifica per l'ormone della crescita che esercita la sua azione, attraverso specifici recettori, sul feto e sullo sviluppo neonatale di mioblasti ed osteoblasti coinvolti nella crescita. L'ormone della crescita è stato proposto anche come uno dei responsabili della prolungata proliferazione cellulare che si osserva negli animali ipertrofici. *POU1F1* è invece un gene che codifica per un fattore di trascrizione (*Pit1*), responsabile dell'espressione dell'ormone della crescita nei mammiferi. La mancanza di *Pit1* riduce l'espressione del gene *GH* a causa di una diminuzione della proliferazione delle linee cellulari produttrici dell'ormone della crescita.

Influenzano la qualità della carne anche le *FABP* (*fatty acid binding protein*), un gruppo di proteine citoplasmatiche di basso peso molecolare (14-15 kDa) disperse nei diversi tessuti animali. Queste proteine, che rappresentano circa il 3-5% delle proteine cellulari totali, si legano a lunghe catene di acidi grassi, acidi grassi acil-CoA e acilcarnitina. Recentemente, sono state identificate numerose isoforme in cuore, fegato, intestino, milza, cervello, ecc. L'espressione delle varie isoforme non è comunque esclusiva del tessuto nella quale la proteina è stata isolata. Tre principali tipi di FABP identificate nel cuore (FABP-H), nel fegato (FABP-L) e nell'intestino (FABP-I) hanno evidenziato considerevoli differenze a livello amminoacidico (circa 30% di identità).

Molto studiata negli ultimi anni è la miostatina, un fattore di differenziazione e crescita coinvolto nel controllo dello sviluppo muscolare. La miostatina è un membro della famiglia *transforming growth factor* di tipo β che include proteine che mediano eventi chiave della crescita cellulare e dello sviluppo muscolare attraverso la trasduzione del segnale. In assenza della miostatina la muscolatura scheletrica del topo è due-tre volte maggiore rispetto a quella del fenotipo normale. Studi recenti hanno dimostrato che la miostatina agisce come un regolatore negativo della miogenesi, inibendo la proliferazione dei mioblasti durante il ciclo cellulare e la differenziazione muscolare.

Alcune razze bovine, come ad esempio la Bianca Blu Belga, la Piemontese, la Charolais e la Marchigiana, sono caratterizzate da un fenotipo “doppia coscia” dovuto ad una mutazione del gene codificante la miostatina. Nei bovini sono state rilevate numerose mutazioni al locus corrispondente, molte delle quali sono comunque silenti o hanno un effetto neutrale. Nonostante la manifestazione del fenotipo “doppia coscia” sia geneticamente molto eterogeneo, tale carattere è principalmente dovuto alla presenza di un codone di stop a livello del terzo esone del gene.

Gli animali con fenotipo “doppia coscia” presentano meno tessuto adiposo e più muscolo con una maggiore proporzione di tagli di carne pregiati. A questa mutazione sono però connessi anche alcuni svantaggi come una fertilità ridotta, una minore facilità di parto e una maggiore suscettibilità allo stress.

Nella sequenza del gene codificante la miostatina sono state identificate sei mutazioni principali (Fig. 21.25) che determinano la produzione di una proteina inattiva, cioè incapace di regolare la deposizione di fibre muscolari. Tali mutazione possono essere così riassunte:

- 1) Mutazione denominata **nt419(del7-ins10)**: dovuta ad una inserzione/delezione in posizione 419 dell'esone 2 dove sette nucleotidi successivi vengono sostituiti da dieci nuovi nucleotidi che comportano la formazione di un codone di stop all'estremità N-terminale a livello dell'amminoacido 140. Tale mutazione è stata riscontrata nella razza Maine-Anjou;
- 2) Mutazione denominata **Q204X**: causata da una transizione C–T del nucleotide in posizione 610 dell'esone 2 che determina la formazione di un codone di stop anticipato. Tale mutazione è stata riscontrata nelle razze Charolais e Limousine;
- 3) Mutazione denominata **E226X**: causata da una transversione G–T del nucleotide in posizione 676 dell'esone 2 che determina la formazione di un codone di stop a livello dell'amminoacido 226. Tale mutazione è stata riscontrata nella razza Maine-Anjou;
- 4) Mutazione denominata **nt821(del11)**: dovuta ad una delezione di 11 pb alla posizione 821 che comporta una troncatura del dominio attivo C-terminale della proteina. Tale mutazione è stata riscontrata nelle razze Belgian Blue, Blonde d'Aquitane, Limousine, Parthenaise, Asturiana e Rubia Gallega;
- 5) Mutazione denominata **E291X**: causata da una transversione G–T del nucleotide in posizione 874 che porta alla formazione di un codone di stop a livello del

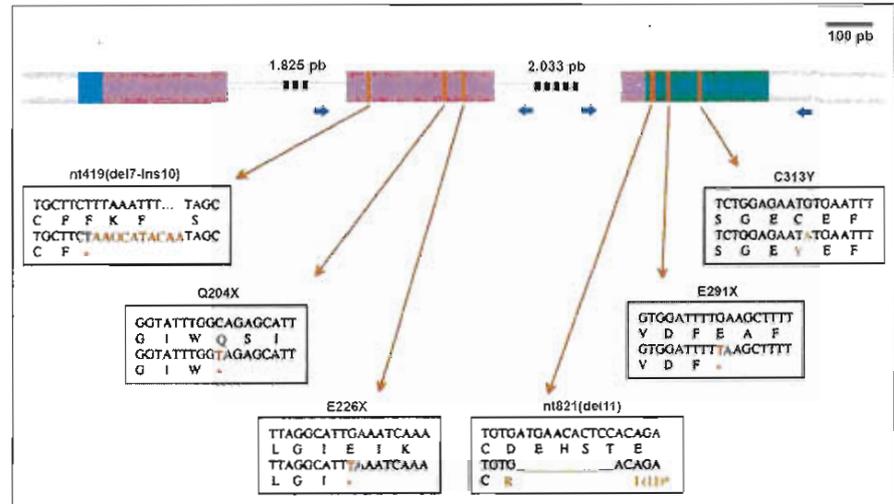


Fig. 21.25 – Rappresentazione schematica delle mutazioni riscontrate nel gene bovino codificante per la miostatina. Fonte: L. Karim *et al.* (2000).

dominio attivo C-terminale. Tale mutazione è stata riscontrata nella razza Marchigiana;

- 6) Mutazione denominata **C313Y**: causata da una transizione G–A del nucleotide in posizione 938 risultante in una sostituzione di una cisteina altamente conservata in una tiroxina. Tale mutazione è stata riscontrata nelle razze Gasconne e Piemontese.

Oltre a queste mutazioni ne sono state riscontrate altre a livello di regioni introniche come pure di regioni codificanti ma che non determinano alcuna troncatura della proteina. Ad esempio, una mutazione (denominata F94L) dovuta ad una transizione C–A del nucleotide in posizione 282 dell'esone 1 che comporta la traduzione di una leucina al posto di una fenilalanina. Altre due mutazioni sono state identificate a livello dell'esone 1 (denominata S105C) e dell'esone 2 (denominata D182N).

Studi recenti hanno evidenziato relazioni significative tra caratteristiche qualitative della carne e variazioni della sequenza di geni mitocondriali, sia in bovini da latte che da carne. Sfruttando le informazioni relative all'intera sequenza del genoma mitocondriale è possibile correlare la variazione di specifiche caratteristiche della carcassa con il polimorfismo di specifiche sequenze mitocondriali.

21.3.2.2 Caso di studio - Mappaggio di QTL che controllano la qualità del latte nei bovini

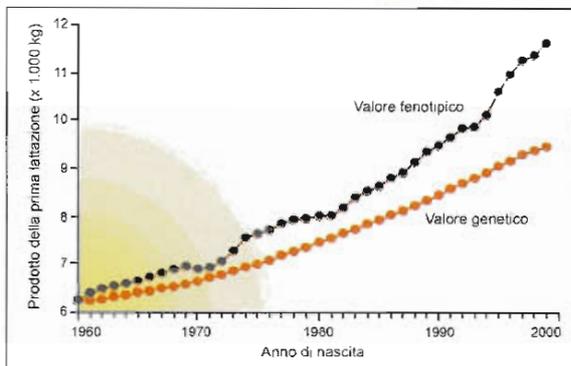


Fig. 21.26 – Andamento produttivo delle vacche da latte nel periodo 1960-2000 con indicazione della progressione del valore genetico e di quello fenotipico (modificato da: J.C.M. Dekkers e F. Hospital, 2002).

La produzione media di latte per lattazione in alcune razze bovine, come ad esempio la Holstein, negli ultimi cinquanta anni è quasi raddoppiata e più della metà di questo progresso è attribuibile alla selezione genetica (Fig. 21.26). In generale, la produzione media di latte, espressa come quintali per capo all'anno, è passata da circa 25 del 1910 ad oltre 90-100 nel 2000.

Fino a pochi anni fa, a causa del limitato numero di marcatori genetici disponibili, era estremamente difficile determinare i meccanismi ereditari alla base della trasmissione e della manifestazione dei caratteri quantitativi negli animali. Attualmente, la disponibilità di mappe fisiche con cloni sequenziati e di mappe genetiche sature di marcatori molecolari consente di identificare

e localizzare con precisione le regioni cromosomiche dove risiedono i geni che controllano un carattere quantitativo. Quasi tutti i QTL descritti nelle specie di interesse zootecnico in realtà non riflettono un singolo locus mendeliano, ma un tratto cromosomico che verosimilmente si identifica, in tutto o in parte, con un blocco cromosomico delimitato da siti preferenziali di ricombinazione (→ Cap. 14).

L'obiettivo principale delle ricerche sui loci che controllano i caratteri quantitativi (QTL, *quantitative trait loci*) è quello di identificare geni e/o marcatori molecolari a questi associati che possano essere sfruttati in programmi di miglioramento genetico attraverso la selezione assistita (MAS, *marker-assisted selection*). Sia le analisi teoriche che gli studi simulati concordano sul fatto che la selezione assistita da marcatori molecolari abbia reali potenzialità di incrementare il guadagno genetico conseguibile, specialmente nel caso di caratteri a bassa ereditabilità per i quali la selezione tradizionale risulta meno efficace.

Nei bovini, sia nelle vacche da latte che nei vitelli da carne, la MAS potrebbe venire usata per scegliere i giovani tori da sottoporre alle prove di progenie, aumentando così il differenziale di selezione e riducendo altresì l'intervallo potenziale tra generazioni. Una volta identificato un QTL per un carattere di interesse, è innanzitutto necessario individuare tra le popolazioni sperimentali le famiglie che sono segreganti per quel QTL. Bisogna tuttavia considerare che se la regione cromosomica dove risiede il QTL oggetto di studio è stata finemente mappata con marcatori molecolari stret-

tamente concatenati tra loro e in forte *linkage disequilibrium* (LD) con il carattere quantitativo, le associazioni tra singoli alleli marcatori o tra combinazioni di alleli marcatori – aplotipi – e alleli alternativi di un dato QTL dovrebbero mantenersi e rivelarsi utili in tutte le popolazioni di una razza senza la necessità di essere verificate a livello di singole famiglie. La selezione assistita per un QTL con marcatori molecolari che possiedano tali caratteristiche può essere quindi intrapresa nell'ambito della razza e non di singole famiglie, e può portare anche all'identificazione di geni fondamentali del QTL che presiedono a determinate reazioni biochimiche o che sottintendono a specifici percorsi metabolici.

La disponibilità di mappe genetiche sature di loci molecolari consente di saggiare il genoma dei bovini nel suo complesso (*whole genome scanning*) valutando intervalli cromosomici brevi delimitati da coppie di marcatori strettamente associati (*interval mapping*) al fine di identificare sia i QTL maggiori che quelli minori per ognuno dei caratteri quantitativi studiati.

Una revisione approfondita e dettagliata delle informazioni disponibili in letteratura relativamente ai QTL per le caratteristiche quali-quantitative del latte nei bovini ha permesso la definizione di una mappa di associazione integrata con indicazione delle regioni cromosomiche dove più verosimilmente risiedono i singoli loci e dei marcatori molecolari più utili ai fini della selezione assistita nelle vacche da latte. La maggior parte delle decine di pubblicazioni passate in rassegna, riporta e commenta di QTL coinvolti nel controllo delle più importanti caratteristiche di interesse per l'industria casearia, come produzione di latte e composizione del latte intesa come quantità assoluta e relativa di grassi e proteine, e di cellule somatiche (*somatic cell score*, SCS). Solo un numero modesto di lavori ha valutato caratteristiche più complesse come la suscettibilità alla mastite, il grado di fertilità e i fattori legati alla sanità degli animali.

La mappa consenso dei QTL mostra alcune regioni cromosomiche caratterizzate da un'alta densità di QTL. Il dato più sorprendente è che per le caratteristiche quantitative studiate il numero di QTL complessivo è risultato piuttosto basso, compreso tra 4 e 12 con un numero medio pari a 8. Poiché è improbabile che caratteri complessi, come sono molti di quelli quantitativi analizzati nelle vacche da latte, possano dipendere da così pochi geni, si può ipotizzare che nei materiali geneticamente migliorati attualmente disponibili per diverse razze molti alleli favorevoli risultino fissati in tutte le linee esaminate.

Numerosi QTL per la produzione e la composizione del latte sono stati identificati in tutti e 29 gli autosomi del genoma bovino. Il confronto dei risultati acquisiti ha messo in evidenza QTL principali per la produttività nei cromosomi 1, 3, 6, 9, 14 e 20, mentre QTL addizionali sono stati identificati in altri cromosomi (ad esempio, 2, 11, 15, 22, 24, 25 e 28) solo occasionalmente (Fig. 21.27).

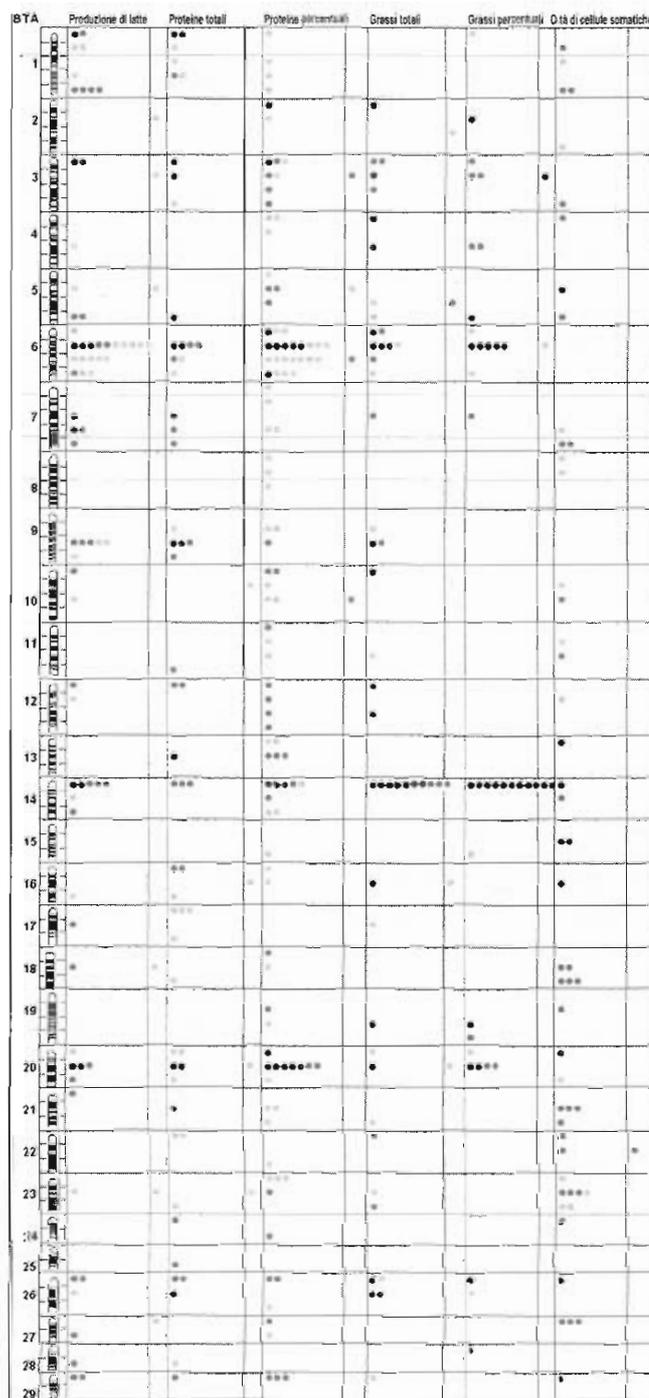


Fig. 21.27 – Rappresentazione schematica dei principali QTL per la qualità del latte mappati nel genoma bovino usando marcatori molecolari. Fonte: M.S. Khatkar *et al.* (2004).

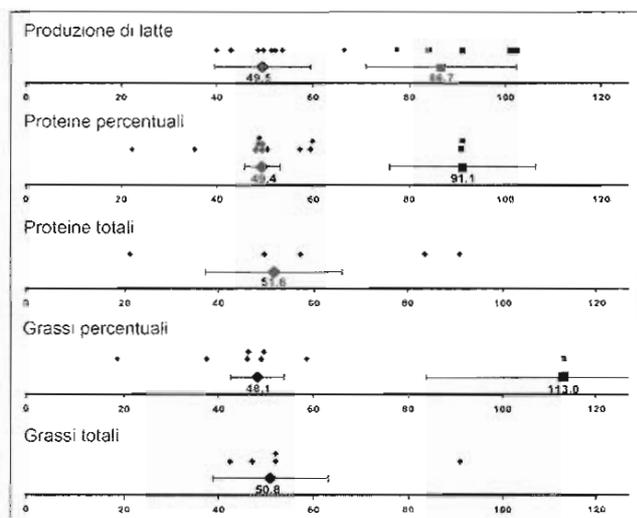


Fig. 21.28 – QTL principali per la qualità del latte mappati sul cromosoma 6 bovino (BTA6). Fonte: M.S. Khatkar *et al.* (2004).

Le analisi statistiche condotte sui caratteri quantitativi, basate sulla stima dell'effetto delle sostituzioni alleliche ai singoli QTL, hanno permesso di ricavare una mappa consenso delle regioni cromosomiche più significative. Tali analisi hanno messo in evidenza due regioni cromosomiche, particolarmente influenti sulla produttività in latte, nel cromosoma 6 intorno a 49 cM e a 87 cM in grado di spiegare, rispettivamente, il 4,2% e il 3,6% della varianza fenotipica totale per questo carattere (Fig. 21.28). Inoltre, la prima di queste due regioni cromosomiche, identificata dal marcatore BM143, è risultata coinvolta anche nel controllo di altre caratteristiche del latte, come la quantità totale e percentuale di grassi e proteine, mentre la seconda è localizzata attorno al complesso delle caseine.

QTL secondari associati alla quantità assoluta e percentuale di proteine del latte sono stati identificati nei cromosomi 1, 3, 9, 14 e 20. È interessante rilevare che il QTL

del cromosoma 20 è stato posizionato nella regione dove è stato mappato il gene *GHR* (*growth hormone receptor*) codificante il recettore dell'ormone della crescita. Per il QTL principale localizzato nella regione mediana del cromosoma 6 è stato dimostrato un effetto di sostituzione allelica variabile tra 0,07% e 0,15%. Per l'altro QTL principale localizzato nella regione subterminale del cromosoma 6 comprendente il complesso delle caseine è stato riportato un effetto anche sulla quantità assoluta e percentuale di grassi. Il QTL principale avente un effetto altamente significativo sulla quantità di grassi nel latte è stato comunque identificato in prossimità della regione centromerica del cromosoma 14. Un QTL secondario per queste stesse caratteristiche è stato mappato attorno a 41 cM nel cromosoma 3 per il quale è stato riportato un

Tab. 21.7 – Statistiche riassuntive sui QTL per la produttività e la qualità del latte. MY = produzione di latte; PY = proteine totali; PP = proteine percentuali; FY = grassi totali e FP = grassi percentuali. Fonte: M.S. Khatkar *et al.* (2004).

Cromosoma	Carattere	Posizione (cM)		Varianza (%)	
		Valore	ES	Valore	ES
6	MY	49,5	4,96	4,18	3,12
6	MY	86,7	7,89	3,63	5,57
6	PP	49,4	1,83	1,53	1,30
6	PP	91,1	7,60	-	-
6	PY	51,6	7,18	-	-
6	FP	48,1	2,84	-	-
6	FP	113,0	14,59	-	-
6	FY	50,8	6,01	-	-
1	MY	12,2	8,08	-	-
1	MY	41,6	7,12	-	-
1	MY	97,6	17,30	-	-
3	MY	55,5	8,63	-	-
9	MY	67,5	7,49	1,71	4,72
10	MY	21,5	9,85	-	-
14	MY	0,1	4,97	-	-
14	FP	0,1	0,47	-	-
14	FY	1,4	4,71	-	-
20	MY	37,7	8,18	-	-
20	PP	38,5	1,86	-	-
20	PP	49,6	5,01	-	-

effetto medio di sostituzione allelica pari allo 0,07%. Numerosi QTL secondari associati alla quantità assoluta e percentuale di grassi del latte sono stati individuati nei cromosomi 5, 6, 9, 20 e 26.

Le statistiche relative ai QTL per la qualità del latte sono riassunte in **Tab. 21.7**.

Parecchi QTL hanno evidenziato di essere coinvolti nell'espressione di più caratteristiche qualitative del latte. In particolare, i QTL mappati nei cromosomi 3, 6, 9, 14, 20 e 23 hanno manifestato effetti pleiotropici sulla quantità assoluta e relativa di proteine e grassi. I risultati in favore di una proprietà pleiotropica di alcuni QTL, capaci di influenzare due o più caratteristiche diverse e non necessariamente correlate tra loro, suggeriscono che la selezione naturale abbia portato alla creazione di regioni cromosomiche con geni strettamente associati che raramente ricombinano e che verosimilmente determinano la capacità adattativa e riproduttiva degli individui.

Si ritiene che le metodologie di mappaggio dei QTL per caratteri legati alla qualità del latte mediante progenie segreganti consentano di individuare le regioni cromosomiche corrispondenti entro un intervallo di confidenza di circa 20 cM o più. Marcatori molecolari a tali distanze dai QTL non sono considerati adatti per essere sfruttati in programmi di selezione assistita. Tuttavia, quando vengono seguite strategie basate sulle misure del disequilibrio di associazione è possibile raggiungere un mappaggio più fine e preciso dei QTL, tale che i marcatori molecolari possano ritenersi affidabili per la selezione assistita.

Nota chiave – Saggi diagnostici: analisi di geni che influenzano la qualità del latte

Numerosi studi condotti sulla specie bovina hanno dimostrato che le singole varianti genetiche delle proteine del latte manifestano differenze qualitative di apprezzabile entità, che influenzano in maniera diretta la qualità del latte e la sua resa in formaggio. Per poter predisporre piani di selezione che considerino anche questi parametri vengono genotipizzati i possibili riproduttori di sesso maschile delle razze da latte con metodiche basate sull'analisi del DNA. Con i protocolli attualmente disponibili è

possibile conoscere alla nascita il genotipo dei maschi e delle femmine con un semplice prelievo di sangue o di bulbi piliferi. Inoltre dal liquido seminale utilizzato per la fecondazione artificiale è possibile determinare direttamente il genotipo dei tori non più in vita.

I saggi diagnostici valutano il polimorfismo ad una serie di loci: Bovini: α 1-Caseina: B, C e G; Caseina: A1, A2, A3 e B; k-Caseina: A, B e E; β -Lattoglobulina: A e B; α -Lattoalbumina: A e B. Ovini: α 1-Caseina: A, C e D; α -Lattoglobulina: A e B. Caprini: α 1-Caseina: A, B, C, D, E, F e O; β -Caseina: A, B e O; k-Caseina: A e B.

La maggior parte delle indagini genomiche finalizzate alla ricerca e al mappaggio di QTL nei bovini è stata basata sull'impiego di marcatori microsatelliti (SSR), molto spesso integrati da marcatori SNP (→ Cap. 17). È verosimile pensare che i marcatori SNP prenderanno il posto dei microsatelliti, specialmente quando combinati con strategie di selezione di aplotipi associati a QTL basati sul calcolo del LD. In effetti i polimorfismi di tipo SNP sono molto abbondanti nei genomi, presentano un basso tasso di mutazioni e si prestano ad essere visualizzati attraverso procedure automatizzate. Al momento sono in atto numerose ricerche volte ad identificare SNP a carico di geni fondamentali nei bovini e tali informazioni potranno essere sfruttate sia per il mappaggio ad intervalli dei QTL che per il clonaggio posizionale di geni associati ai QTL.

Il confronto degli effetti esercitati dai singoli QTL sulla manifestazione di un dato carattere ha messo in evidenza differenze quantitative consistenti, anche tra famiglie nell'ambito di uno stesso esperimento. Tali differenze potrebbero essere in parte dovute alla segregazione di alleli diversi di uno stesso QTL principale oppure alla segregazione di alleli a diversi QTL secondari. Un dato interessante emerso è quello che indica la presenza nel genoma di alcune regioni cromosomiche in grado di spiegare proporzioni significative della variazione fenotipica riscontrata per i caratteri quantitativi di produzione e composizione del latte. Nel complesso si può ritenere che

questi caratteri nelle vacche da latte siano controllati da pochi geni aventi ampio effetto unitamente a molti geni con effetto modesto. Alcuni autori hanno stimato che i caratteri quantitativi di produzione e composizione del latte possano essere determinati da 50-100 geni, dei quali meno del 20% in grado di spiegare circa il 90% della varianza genetica. Le sperimentazioni condotte usando animali da laboratorio hanno comunque evidenziato la necessità di analizzare anche le interazioni tra loci (epistasia) e le interazioni genotipo-ambiente, oltre ai possibili effetti di *imprinting* per comprendere pienamente l'eredità dei caratteri quantitativi nelle vacche da latte.

L'identificazione del gene o dei geni contenuti in un QTL e delle relative forme alleliche in grado di condizionare la manifestazione fenotipica di un carattere quantitativo rappresentano le sfide da affrontare in futuro. Una delle difficoltà principali è connessa alla bassa precisione con cui un QTL viene solitamente localizzato in una mappa genetica. Anche seguendo una procedura di mappaggio che permetta di posizionare un QTL in una regione cromosomica di lunghezza inferiore a 5 cM, il clonaggio posizionale del gene rimarrebbe un compito estremamente difficile da realizzare. Al momento la strategia più promettente è quella basata sul clonaggio posizionale di geni candidati selezionati attraverso procedure di mappaggio genomico comparativo. In questo caso è comunque necessario integrare la strategia di identificazione di geni candidati con tecnologie di validazione basate sull'analisi del trascrittoma e del proteoma.

In conclusione, la maggior parte dei lavori basati sull'impiego dei marcatori molecolari per il mappaggio di QTL ha riguardato la produzione quantitativa e la composizione qualitativa (soprattutto grassi e proteine) del latte. Molto lavoro rimane ancora da fare per implementare le conoscenze genetico-molecolari di questi caratteri nelle vacche da latte. Tuttavia, alcune delle informazioni acquisite e verificate nelle mappe consenso appaiono affidabili ed utilizzabili per eseguire programmi di selezione assistita usando i marcatori molecolari più strettamente associati ai QTL. Al momento, sembra meritare particolare attenzione la regione mediana e subterminale del cromosoma 6 (BTA6) dove sono stati localizzati numerosi QTL per caratteristiche quali-quantitative del latte.

Quadro 21.2 – Miglioramento genetico animale: aspetti generali

A cura di Francesca Maria Sarti e Francesco Panella

Dipartimento di Biologia vegetale e Biotecnologie agroambientali e zootecniche,
Università degli Studi di Perugia

Lo scopo del miglioramento genetico nel contesto zootecnico è quello di rendere gli animali più idonei a produrre secondo le esigenze dettate dal mercato (Fig. 21.29). Tale finalità può essere conseguita seguendo due principali modalità operative:

1. aumentare la frequenza dei geni favorevoli attraverso la programmazione di accoppiamenti tra individui ritenuti "geneticamente" migliori (selezione);
2. utilizzare le potenzialità di popolazioni diverse per cercare nuove combinazioni genetiche che esaltino la capacità produttiva (incrocio).

I caratteri da migliorare nelle popolazioni di interesse zootecnico possono essere, in generale, ricondotti alle seguenti tre categorie: i) **morfologici** – legati alle caratteristiche esteriori previste dagli standard di razza, sono considerati solo nella selezione dei

tipi genetici ben definiti e codificati; ii) **morfofunzionali** – riferiti alle caratteristiche morfologiche connesse alla produttività, secondo interpretazioni zoognostiche; iii) **produttivi** – indicativi della capacità produttiva in termini quantitativi e qualitativi. Si possono citare, a titolo di esempio, per i caratteri morfologici: assenza o presenza di corna, tipo e colore del mantello o del vello; per i caratteri morfofunzionali: forma della mammella, larghezza della groppa, lunghezza del tronco; per i caratteri produttivi: latte prodotto in un determinato lasso di tempo (lattazione standard), pesi ad età tipiche (alla nascita, ad un mese, ad un anno).

Va inoltre tenuto presente che notevole attenzione viene posta anche nella individuazione dei geni responsabili della suscettibilità, o resistenza, a determinate patologie; tale argomento però non verrà dibattuto nel prosieguo che si rivolgerà in prevalenza agli aspetti economico-produttivi.

La selezione

Il problema principale da risolvere nel lavoro di selezione è quello di individuare i soggetti geneticamente migliori da far accoppiare per ottenere una generazione filiale più produttiva. I programmi selettivi vengono pertanto definiti seguendo modalità diverse per i vari tipi di carattere e tenendo conto, oltre che del

tipo di espressione fenotipica (i caratteri legati alla produzione di latte possono essere osservati solo sulle femmine), anche della loro ereditabilità e ripetibilità.

Per ereditabilità si intende la quota di variabilità che può essere fissata con la selezione; il suo coefficiente (h^2) può assumere valori compresi tra 0 (caratteri non ereditabili) ed 1 (caratteri completamente ereditabili) e si calcola come rapporto tra varianza genetica additiva e varianza fenotipica:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

I coefficienti di ereditabilità presentano valori diversi nelle diverse specie e nei vari caratteri oggetto di selezione, come si può osservare in Tab. 21.8.

La ripetibilità (r) indica invece quanto un carattere si ripete, nello spazio e nel tempo, sullo stesso individuo ed assume valori sempre maggiori o, al limite uguali, alla ereditabilità.

Selezione per i caratteri morfologici e morfofunzionali

La selezione per questi caratteri viene condotta, sia nei maschi che nelle femmine, mediante una valutazione morfologica che si concretizza con l'attribuzione di giudizi (punteggi numerici) da parte di esperti appositamente addestrati. Tale tipo di giudizio, che trova i suoi limiti nella soggettività del valutatore, è stato sostituito, in molte specie, dalla valutazione morfologica lineare; questa si basa sulla descrizione lineare delle varie regioni del corpo tramite valori numerici, variabili in modo continuo tra due estremi rappresentanti il valore minimo e massimo che i caratteri considerati nella selezione assumono nella popolazione e, quindi, nella successiva suddivisione di questo intervallo in un opportuno numero di classi. Questa metodologia consente di ottenere l'oggettività della valutazione, fornendo quindi dati più idonei ad una successiva elaborazione statistica.

Selezione per i caratteri produttivi

La selezione per questi caratteri è resa piuttosto difficile dal fatto che la loro determinazione è dettata da molti geni la cui azione viene, peraltro, ampiamente modificata da un elevato numero di fattori ambientali (alimentazione, management, aspetti sanitari, clima, ecc.); da ciò si comprende come, osservando i fenotipi, sia piuttosto difficile riuscire ad individuare i soggetti geneticamente migliori. Il contributo relativo dei fattori genetici e dei fattori ambientali nella determinazione della variabilità fenotipica di un carattere quantitativo è misurato dalla ereditabilità (h^2); in altre parole, il valore dell'ereditabilità del carattere oggetto di selezione condiziona, non solo il metodo di valutazione genetica da seguire, ma anche il progresso conseguibile con la selezione stessa.

Valori elevati di questo parametro genetico (0,5-0,8) permettono di poter considerare attendibile la stima del genotipo a partire dal fenotipo dato che la variabilità fenotipica è molto ben spiegata da quella genetica e quindi l'ambiente ha una scarsa influenza su questi caratteri; in questi casi scegliere gli animali da destinare alla riproduzione in base al fenotipo dà risultati soddisfacenti in termini di selezione dato che, molto probabilmente, questi sono anche quelli con genotipo migliore. I caratteri legati alla produzione di carne rientrano in questo gruppo e giustificano la scelta degli animali in base alle loro prestazioni produttive misurate a parità di condizioni ambientali (*performance test*).

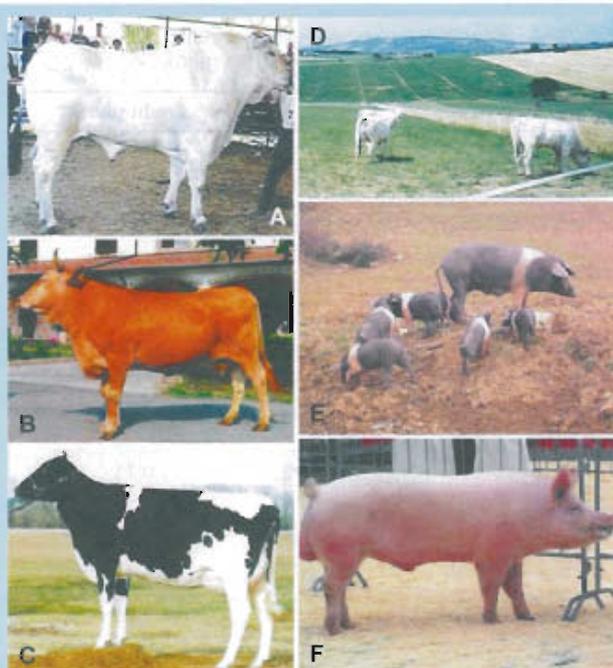


Fig. 21.29 – Esempi di razze bovine e suine: (A) Chianina (ANABIC); (B) vacca Reggiana; (C) vacca Frisona canadese; (D) chianine al pascolo (foto: M. Pauselli); (E) Cinta senese (foto: O. Franci); (F) verro di razza Large White italiana.

Valori di ereditabilità bassa o intermedia (0,20-0,50) suggeriscono che il genotipo possa essere piuttosto mascherato dalle condizioni ambientali e che, pertanto, una scelta basata sul solo fenotipo possa dare risultati incostanti; un esempio classico è la stima del genotipo di un toro per la produzione latte. Dato che tale produzione non è direttamente misurabile sull'animale da valutare dovrà essere rilevata su numerose figlie dello stesso distribuite in diversi allevamenti per poter così ottenere una precisa valutazione del genotipo del padre (*progeny test*).

Un ulteriore problema è quello di riuscire a depurare l'effetto genetico del padre sulla quantità di latte prodotta dalle figlie (da cui la stima del valore genetico del toro) dagli effetti ambientali che la influenzano. Lo sviluppo di algoritmi che le moderne tecnologie informatiche consentono di gestire, ha portato a definire dei modelli statistici (BLUP) che stimano indici genetici privi dell'errore derivante dall'interferenza ambientale.

Incrocio

Per incrocio si intende l'accoppiamento fra soggetti che appartengono a razze diverse della stessa specie; più precisamente il suo scopo è quello di accoppiare, a differenza della selezione, animali non imparentati fra loro e quindi geneticamente distanti. Le differenze genetiche tra le razze sono dovute sia al fatto che queste si sono sviluppate in ambienti diversi sia al fatto che sono state selezionate dagli allevatori per scopi differenti (ad esempio, produzione latte, carne, ecc.) ed il fine di questo metodo di miglioramento è quello di combinare in un solo soggetto (meticcio) caratteristiche desiderabili di due o più razze per sfruttare il fenomeno dell'eterosi o vigore ibrido.

Tab. 21.8 – Coefficienti di ereditabilità di alcuni caratteri nelle varie specie di interesse zootecnico (da: R.M. Bourdon).

Carattere	Ereditabilità
Bovini da carne	
Peso alla nascita	0,40
Peso allo svezzamento	0,30
Indice di conversione alimentare	0,40
Bovini da latte	
Produzione latte	0,25
Quantità di grasso (%)	0,50
Interparto	0,10
Equini	
Altezza al garrese	0,40
Temperamento	0,25
Velocità	0,40
Suini	
Numerosità della covata (nati vivi)	0,15
Peso allo svezzamento	0,10
Indice di conversione alimentare	0,35
Avicoli	
Taglia dell'uovo	0,45
Spessore del guscio	0,45
Spessore del petto	0,25
Ovini	
Peso a 60 d	0,20
Peso del vello	0,40
Numero di nati	0,15

L'incrocio deve essere perciò interpretato come l'esatto contrario della depressione da consanguineità che è una diretta conseguenza della selezione; infatti, mentre quest'ultima genera un aumento dell'omozigosi per l'accoppiamento tra soggetti simili (parenti), l'incrocio determina un aumento dell'eterozigosi per l'accoppiamento di individui appartenenti a razze o popolazioni diverse. Il manifestarsi del vigore ibrido nei meticci si esprime in seguito alla complementarietà tra le razze incrociate e consiste nell'ottenimento di una progenie più produttiva rispetto alle razze originarie che appunto differiscono l'una dall'altra, ma hanno caratteri complementari.

Nei bovini da carne, ad esempio, incrociare un toro "grande" con una vacca "piccola" consente di unire nella generazione filiale F_1 i buoni accrescimenti del padre agli scarsi fabbisogni di mantenimento della madre per ottenere così animali idonei per il mercato, prodotti in maniera economica.

Le biotecnologie e il miglioramento genetico

Le biotecnologie applicate in campo animale possono essere ricondotte a due grandi categorie: i) biotecnologie della riproduzione e ii) tecnologie molecolari.

Molto spesso il miglioramento genetico viene confuso con la riproduzione ma, in realtà, questi sono due campi distinti che, però, nell'applicazione pratica inevitabilmente si intersecano. Infatti, la selezione e le decisioni relative agli accoppiamenti programmati, cioè quali maschi e quali femmine far accoppiare, vengono prese in funzione delle tecnologie riproduttive disponibili al momento.

Tra le biotecnologie applicate alla riproduzione ricordiamo: l'inseminazione strumentale (IS) più impropriamente nota come fecondazione artificiale (FA), la sincronizzazione dei calori, il trasferimento embrionale (*embryo transfer* o ET), il sessaggio del seme, la fecondazione in vitro (IVS) e la clonazione.

Diverse sono le tecnologie molecolari che interessano il miglioramento animale; prima fra tutte il DNA *fingerprinting*, una metodica che consente di caratterizzare graficamente il DNA creando un'impronta genetica unica per ogni individuo e largamente utilizzata per la corretta attribuzione delle parentele.

Come già ricordato, i caratteri di interesse economico (produzione latte, carne, uova, ecc.) studiati in campo animale sono poligenici e quindi presentano un determinismo genetico molto complesso rispetto ai semplici caratteri qualitativi; a tale scopo la ricerca scientifica si è orientata verso lo studio di loci polimorfici (marcatori molecolari) o di geni maggiori (detti anche geni candidati) strettamente associati a caratteri quantitativi in modo tale da poter essere sempre ereditati in blocco; si tratta quindi di scoprire geni che consentano di marcare con la loro presenza un QTL (*quantitative trait locus*) o, meglio ancora, un ETL (*economic trait locus*).

Il conseguente sviluppo della MAS (*marker-assisted selection*) e, ancora meglio, della GAS (*genotype-assisted selection*) rappresentano delle metodiche innovative che potranno essere efficientemente integrate negli schemi tradizionali di valutazione genetica dei riproduttori.

Bibliografia

Bourdon R.M. (1997). *Understanding animal breeding*. Prentice-Hall, USA.
Pagnacco G. (2004). *Genetica animale applicata*. Casa Ed. Ambrosiana, Milano.

21.4 Sicurezza alimentare e legislazione: tracciabilità e rintracciabilità

La produzione di carni in Italia è cresciuta considerevolmente nell'ultimo decennio. Accanto all'aumento di produzione totale di carni si è avuta una notevole variazione della ripartizione delle tipologie di prodotto consumato. In particolare, in passato la quasi totalità della carne veniva acquistata intera o in parti, mentre adesso molto prodotto viene consumato preparato (precotto) o trasformato (disossato), con una progressiva diminuzione delle carcasse acquistate intere rispetto al totale delle produzioni. A tale proposito è sorta la necessità di sviluppare delle procedure atte a garantire l'origi-

ne dei prodotti animali. Un numero sempre maggiore di imprese del comparto agro-alimentare si è dotato di un sistema di rintracciabilità interno, o comunque riferito alla parte di filiera di competenza, ma si pone con sempre più urgenza l'esigenza di poter documentare l'intera catena agro-alimentare da monte a valle, dal produttore al consumatore, dal conferimento, alla lavorazione e/o trasformazione fino alla vendita.

L'Unione Europea, con l'approvazione del Regolamento CE n. 178 del 28.01.2002, ha reso obbligatoria a partire dal 1° gennaio 2005 la rintracciabilità agro-alimentare, definendola come la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione animale o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione. Le imprese, con le loro associazioni, organizzazioni, consorzi, ecc. scelgono la rintracciabilità non solo per ottemperare a norme obbligatorie, ma soprattutto come strategia di sviluppo per vari obiettivi: i) una risposta all'inquietudine del mercato e dei consumatori; ii) uno strumento di gestione interna del rischio, di coordinamento di filiera (rapporto clienti/fornitori), di vantaggio competitivo; iii) un requisito di conformità ai fini della certificazione di qualità.

Con il termine di **tracciabilità** si intende il processo informativo che segue il prodotto da monte a valle della filiera produttiva, mentre per **rintracciabilità** si intende il processo inverso che permette di risalire da valle a monte le informazioni distribuite lungo la filiera. I benefici per i consumatori si possono sinteticamente ricondurre alla prevenzione delle frodi, all'aumento delle garanzie sulla identificazione di determinati ingredienti presenti nei vari prodotti alimentari, alla possibilità di scelta tra alimenti prodotti in zone e con modalità diverse. La tracciabilità deve essere riferita ad ogni singola porzione di prodotto. Risulta pertanto di estrema utilità, specie per i prodotti animali le cui parti giungono spesso al consumatore separatamente l'una dall'altra, la messa a punto di un sistema di tracciabilità genetica basato su marcatori molecolari, che possa offrire in qualsiasi momento la possibilità di accertare l'origine delle carni, senza i margini di errore evidenziati dai tradizionali sistemi di etichettatura.

La sensibilità dei consumatori nei confronti della sicurezza alimentare è notevolmente aumentata negli ultimi tempi, soprattutto in seguito alle nuove tendenze agrarie (impiego di OGM) e alle nuove emergenze sanitarie (come, ad esempio, la BSE). Nel settore zootecnico, in particolare, si sono verificati spiacevoli eventi quali le epidemie di influenza aviaria e di afta epizootica, che hanno destato forti preoccupazioni nell'opinione pubblica. Questi eventi hanno minato la fiducia di molti consumatori, inducendoli a ridurre il consumo o addirittura ad interrompere l'acquisto dei consueti prodotti alimentari di origine animale. A questo si aggiunga il disorientamento creato da troppi e spesso contrastanti messaggi che in tema di prodotti alimentari giungono ai consumatori dalle varie fonti di informazione. D'altro canto anche gli agricoltori si trovano ormai inseriti in un sistema commerciale sempre più globale dove risulta difficile, senza particolari accorgimenti o adeguamenti tecnici, valorizzare le produzioni locali, legate al territorio, o dotate di specificità e tipicità (Fig. 21.30).

Per quanto concerne la sicurezza alimentare bisogna tuttavia considerare che negli ultimi cinquanta anni il sistema produttivo alimentare si è evoluto passando dal semplice controllo del prodotto finito (igiene, proprietà nutrizionali ed organolettiche) alla successiva e progressiva applicazione della procedura di analisi dei rischi e con-

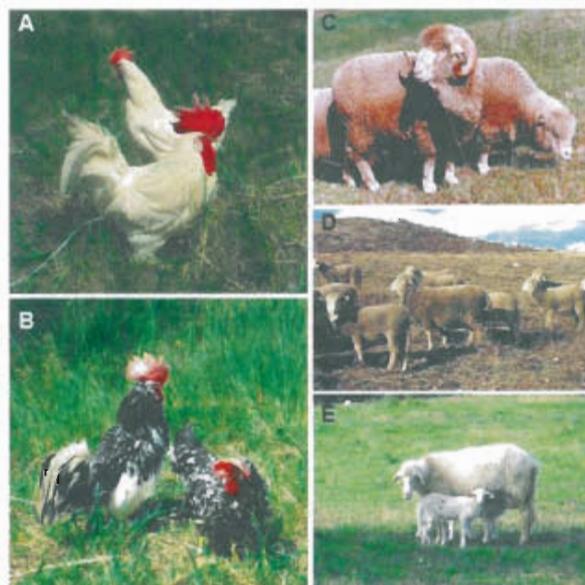


Fig. 21.30 – Esempi di razze autoctone: (A) pollo di Livorno e (B) Ancona; (C,D) arieti e pecore di razza Sopravvissana; (E) razza Sarda (foto: M. Pauselli).

trollo dei punti critici (HACCP, *Hazard Analysis Critical Control Point*) lungo tutte le fasi del processo produttivo. Nel 1993 tale procedura di controllo è divenuta obbligatoria nell'Unione Europea. In effetti, con il passare degli anni, effettuare il controllo soltanto sul prodotto finito si è dimostrato non più sufficiente a garantire la sicurezza di un prodotto alimentare composto da più elementi e sottoposto a più tecnologie. La necessità di prevenzione ha portato ad estendere il controllo a tutti gli elementi e le fasi del processo di produzione: dalle materie prime, alle tecnologie di trasformazione, al prodotto finito, con lo scopo di eliminare i potenziali rischi per garantire un "alimento sicuro". Il controllo deve quindi iniziare dalla produzione, continuando durante la lavorazione, la distribuzione e la commercializzazione. Un adeguamento necessario a garantire la sicurezza alimentare è stato quello che ha previsto l'introduzione del concetto di tracciabilità nel settore agro-alimentare.

La tracciabilità di filiera rappresenta uno strumento potenzialmente in grado di circoscrivere il rischio e di responsabilizzare ogni operatore. È evidente che la possibilità di risalire la filiera, dalla tavola fino al luogo di produzione, tutela sia i produttori che i consumatori. La tracciabilità appare indispensabile a garantire non soltanto i consumatori, ma anche la correttezza delle operazioni di ciascun operatore della filiera produttiva. Le garanzie maggiori connesse alla tracciabilità sono proprio per gli operatori del settore che vedono azzerare i rischi connessi a comportamenti scorretti od azzardati da parte di altri operatori.

La possibilità di controllare e di intervenire durante le varie fasi del sistema produttivo alimentare consente agli operatori di isolare la filiera produttiva in caso di emergenze (contaminazione), di gestire i processi produttivi (flussi delle materie prime) attraverso appropriata documentazione cartacea e di conferire trasparenza al sistema produttivo nel suo complesso. I consumatori, a loro volta, sono in condizione di verificare tutte le fasi della filiera produttiva, potendo così risalire a tutti gli interventi attuati durante il processo produttivo.

Gestire i sistemi di tracciabilità significa fare in modo che gli operatori mettano i consumatori in condizione di identificare e risalire facilmente all'esatto percorso seguito da un prodotto alimentare.

Il crescente interesse dei consumatori verso la salubrità e la qualità degli alimenti ha indotto la Commissione Europea e, sul piano nazionale, il Ministero della Salute a considerare come priorità strategica il raggiungimento degli standard più elevati possibili di sicurezza alimentare. Le linee guida della nuova politica comunitaria in materia di sicurezza alimentare prevedono di utilizzare le potenzialità offerte dalle biotecnologie e di rafforzare la competitività del settore agro-alimentare, garantendo al tempo stesso uno sviluppo che tuteli la salute e la sicurezza dei consumatori e la salvaguardia dell'ambiente. I principali regolamenti comunitari sono: i) Regolamento 1760/2000 sull'etichettatura della carne bovina; ii) il Libro bianco sulla sicurezza alimentare; iii) Regolamento 178/2002.

Le principali esperienze europee sulla tracciabilità degli alimenti derivano dall'applicazione del Regolamento n. 1760/2000 relativo all'etichettatura delle carni bovine (tracciabilità convenzionale). La realizzazione di sistemi di tracciabilità della carne ha consentito di affrontare le problematiche tecniche ed organizzative connesse a specifici settori produttivi, consentendo lo sviluppo di protocolli operativi in tutti i settori coinvolti, con particolare riferimento a quello dell'acquisizione e dello scambio di informazioni sull'origine della carne, dal produttore al consumatore. In seguito all'esperienza nel settore delle carni bovine è stato possibile mettere a punto nuove applicazioni di tracciabilità nei settori del latte e dei suoi derivati, delle carni suine, della pesca, dei prodotti ortofrutticoli, dell'olio d'oliva e del vino.

Il Libro bianco sulla sicurezza alimentare, pubblicato il 12 gennaio 2000, illustra i piani per una nuova politica alimentare lungimirante e preventiva. Esso prevedeva il

miglioramento della legislazione tramite una serie di norme coerenti e trasparenti, il potenziamento dei controlli dall'azienda alla tavola e il rafforzamento delle capacità del sistema di consulenza scientifica, allo scopo di garantire un elevato livello di tutela dei consumatori e della loro salute. Le priorità strategiche del libro bianco sono state quelle di creare un'autorità europea per la sicurezza alimentare, applicare in maniera coerente un approccio legislativo che tenga conto delle varie fasi della filiera produttiva, e stabilire il principio secondo il quale i primi responsabili della sicurezza alimentare sono direttamente gli operatori del settore agro-alimentare e del settore zootecnico, con particolare riferimento a quelli responsabili della nutrizione animale.

Il Regolamento UE n. 178/2002, all'articolo 18, ha introdotto il principio di rintracciabilità. Tale regolamento, incentrato sulla necessità di definire ed attuare regole comunitarie armonizzate, aveva come obiettivo l'identificazione di tutti gli operatori lungo la catena produttiva nel settore dei prodotti agro-alimentari. In accordo con il Regolamento 178, gli operatori europei degli alimenti e dei mangimi devono disporre di sistemi e di procedure per l'individuazione sia della fonte di approvvigionamento delle materie prime che delle imprese alle quali hanno fornito i propri prodotti, secondo il criterio "*one step back, one step beyond*". Poiché tali informazioni sono a disposizione delle autorità competenti, la rintracciabilità si configura come uno strumento neutrale il cui scopo non è quello di catalogare i prodotti a seconda della loro qualità ma di consentire agli operatori e alle autorità di controllo di gestire e verificare la sicurezza dei prodotti. Ciò implica che la rintracciabilità debba essere supportata da idonea documentazione in ogni segmento della filiera produttiva. Qualora in un punto qualsiasi della filiera venga riscontrata una mancanza di conformità dell'alimento o del mangime, il sistema di rintracciabilità deve consentire, a valle, il richiamo del prodotto già uscito dalla tutela dell'operatore, a monte, il percorso a ritroso della catena produttiva verso l'origine, al fine di individuare le cause della non conformità e di adottare le opportune misure correttive.

Il Regolamento UE n. 178/2002 ha previsto anche l'istituzione di un'Autorità Europea per la sicurezza alimentare quale punto di riferimento scientifico indipendente, vertice di una rete di corrispondenti autorità da costituirsi in ogni Stato membro così come l'istituzione di un sistema ufficiale di controllo e di allerta in ciascun Stato membro. Infine a livello mondiale, sia in ambito di *Codex Alimentarius* che di *International Standard Organisation (ISO)*, sono in via di elaborazione standard internazionali atti a uniformare i sistemi di rintracciabilità nelle filiere agro-alimentari di tutti i Paesi attivi nel commercio internazionale.

La **tracciabilità** di un prodotto alimentare, importante per il produttore ed il trasformatore, può essere definita come l'insieme delle informazioni riguardanti tutta la filiera di produzione dello stesso (origine dei prodotti alimentari, luogo di produzione e/o trasformazione, origine delle materie prime utilizzate e tecniche di produzione e/o trasformazione seguite). Nel settore zootecnico la tracciabilità consiste nella possibilità di controllare l'identità degli animali e di verificare l'origine dei prodotti carne, latte e loro derivati lungo i diversi passaggi della filiera agro-alimentare. La necessità di mettere a punto sistemi affidabili ed economici per tracciare i prodotti alimentari di origine animale ha assunto un'importanza sempre maggiore da quando la globalizzazione del commercio ha reso impossibile il controllo diretto della produzione da parte dei consumatori.

La tracciabilità, oltre a fornire un sistema di controllo per l'igiene e la sicurezza degli alimenti, consente di garantire il consumatore da possibili frodi, salvaguardare categorie a rischio (individui allergici o intolleranti a particolari alimenti o additivi), tutelare le scelte alimentari individuali (motivi religiosi o salutistici). Inoltre, la possibilità di verificare con sistemi oggettivi e scientifici l'origine dei prodotti di derivazione animale accresce il valore della certificazione di qualità (marchi IGP, DOP), favo-

rendo lo sviluppo di aree ad economia marginale attraverso la valorizzazione di prodotti tipici e di nicchia.

La **rintracciabilità** è, invece, il processo che raccoglie, archivia e collega le informazioni precedentemente rilasciate, fino all'anello più lontano della catena produttiva permettendo così di fornire una corretta informazione al consumatore. Con quest'ultima si intende la capacità di ricostruire la storia di un prodotto attraverso l'identificazione e la documentazione di tutti i materiali e gli operatori nonché delle attività che concorrono alla produzione di un bene. Nel comparto agro-alimentare ciò risulta particolarmente utile per la collettività e vantaggioso per le autorità di controllo. La rintracciabilità è quindi un'esigenza del consumatore moderno, che accanto al bisogno di sicurezza, manifesta una crescente necessità di mettere in relazione un prodotto alimentare con un territorio, una cultura ed una tradizione.

La tracciabilità e la rintracciabilità nel sistema agro-alimentare rappresentano inoltre un potente mezzo di comunicazione e di assicurazione per il consumatore e un forte motivo di competizione fra le imprese. Da recenti analisi di mercato è stato dimostrato come le certificazioni volontarie di prodotto (DOP, IGP), di sistema (Iso 9000), la rintracciabilità (norma Uni 10939), le certificazioni ambientali (Iso 14000) ecc., sono strumenti attualmente molto richiesti e di forte visibilità sul mercato.

Gli obiettivi della tracciabilità sono molteplici: i) offrire trasparenza a tutela della sicurezza del prodotto; ii) fornire informazioni dettagliate per valorizzare le produzioni di qualità; iii) rendere disponibili per il consumatore i documenti relativi al prodotto, agli ingredienti, alla loro provenienza e alle fasi di lavorazione per rendere più immediata la gestione documentale della tracciabilità.

Le informazioni raccolte da un sistema di tracciabilità hanno principalmente due destinatari: il consumatore, per informarlo sull'origine di un prodotto e sulle sue caratteristiche, e l'autorità di controllo, per consentirle il controllo dei prodotti ed il ritiro di quelli eventualmente difettosi.

È possibile distinguere due categorie di tracciabilità, la **tracciabilità convenzionale** e la **tracciabilità genetica**. Per garantire una corretta conoscenza del percorso, che va dalla produzione alla utilizzazione di un determinato prodotto alimentare, è stata studiata una tracciabilità basata sull'etichettatura. Questa tracciabilità comunemente definita convenzionale, utilizza supporti cartacei ed informatici per la registrazione e quindi il monitoraggio dei prodotti alimentari lungo la filiera di trasformazione. L'etichettatura ha rappresentato il primo importante passaggio nel miglioramento della sicurezza alimentare, ed è stata la prima risposta data al consumatore in seguito alle emergenze alimentari verificatesi in questi ultimi anni in Europa.

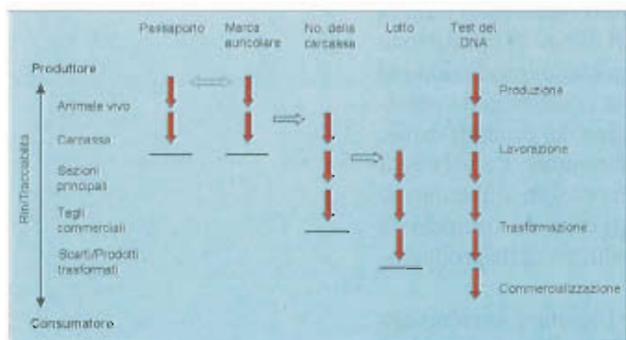


Fig. 21.31 – Esempio di schemi di tracciabilità e rintracciabilità relativi all'industria della carne.

La Fig. 21.31 mostra uno schema di tracciabilità globale implementato all'interno dell'industria della carne. Le prime fasi della filiera di trasformazione, dalla macellazione dell'animale alla distribuzione dei tagli al dettaglio, sono caratterizzate dalla tracciabilità convenzionale e quindi da una serie di documenti quali il passaporto degli animali vivi, la marca auricolare, il numero della carcassa e di macellazione. Un altro esempio di tracciabilità convenzionale si riscontra anche nel settore delle produzioni ittiche, dove ritroviamo diversi metodi per tracciare i pesci e i loro prodotti derivati quali marche esterne, transponditori inseriti nella carcassa, marcatori chimici inorganici (nitrato di potassio, pigmenti) e altri strumenti elettronici informatici.

L'esigenza di ottenere corrette informazioni è stata raccolta da una serie di norme comunitarie che impongono nuovi criteri e obblighi per l'etichettatura. Le norme comunitarie in materia di etichettatura delle carni prevedono due tappe: i) nella prima

distribuzione e trasformazione. Successivamente, tutte le informazioni relative ad ogni singola carcassa sono state registrate in una banca-dati che consente la tracciabilità del singolo animale dall'allevamento alla tavola del consumatore (Fig. 21.31).

L'identificazione genetica rappresenta quindi uno strumento potente ed affidabile per controllare e validare i sistemi di identificazione tradizionali, considerando che il DNA è inalterabile, estraibile da ogni parte dell'animale e che la sua sequenza nucleotidica è unica e specifica per ogni soggetto. Inoltre, il recente sviluppo di una moltitudine di marcatori molecolari per l'analisi dei polimorfismi del DNA genomico ha reso i sistemi diagnostici per l'identificazione genetica degli animali di semplice applicazione, sostenibili economicamente, affidabili e adatti all'automazione.

I metodi di analisi del DNA per identificare i singoli animali o per tracciare i prodotti di origine animale presentano numerosi vantaggi: i) la specificità dei risultati: il patrimonio genetico di qualsiasi animale è unico, creato da meccanismi e forze che producono e guidano la composizione genica come ricombinazione, mutazione e selezione; ii) la flessibilità e il grado di polimorfismo: è possibile analizzare e sfruttare sequenze specifiche di DNA che permettono l'identificazione a differenti livelli, cioè di individuo (marcatori polimorfici tra individui entro razza o specie), di razza (marcatori neutrali razza-specifici e polimorfici entro specie oppure varianti alleliche di geni candidati), di specie (polimorfismi molecolari a carico del DNA genomico o del DNA mitocondriale); iii) la riproducibilità dei risultati: le analisi a livello di DNA non vengono influenzate dal tessuto, dal sesso o dall'età dell'animale e neanche da fattori ambientali come la nutrizione o la condizione di allevamento degli animali; iv) la stabilità del materiale genetico: la molecola del DNA è molto stabile, molto più stabile di proteine e grassi; v) la praticità: qualsiasi campione biologico può essere utilizzato per effettuare l'analisi del DNA (sangue, peli, carne, latte, ecc.). I campioni possono essere raccolti in qualsiasi punto della filiera, dall'allevamento al macello, fino al punto vendita.

La tracciabilità genetica non presenta le limitazioni caratteristiche del sistema di tracciabilità convenzionale mediante etichettatura. Essa infatti si basa direttamente sul prodotto alimentare e non sull'etichetta del prodotto alimentare, consentendo così di tracciare i tagli di carne fino al singolo animale di origine e di verificare la corrispondenza con la sua etichettatura. Si prospetta quindi la possibilità di un'etichettatura basata sulla tracciabilità genetica a supporto di quella convenzionale che può certamente contribuire a salvaguardare il consumatore e a tutelare il produttore e il trasformatore da possibili errori, frodi o alterazioni di varia natura.

21.5 Tecniche di genomica e proteomica al servizio della sicurezza alimentare

Negli ultimi tempi i consumatori hanno acquisito una maggiore consapevolezza riguardo alla qualità dei prodotti alimentari, richiedendo garanzie sull'autenticità dei componenti e sulla loro origine.

In passato, l'autenticazione dei cibi comprendeva il rilevamento delle proteine specie-specifiche, con saggi che impiegavano una varietà di metodi immunologici ed elettroforetici, ma che nascondevano delle insidie. Essendo i prodotti il risultato di un processo che prevedeva anche trattamenti col calore, la composizione proteica complessiva poteva risultare alterata a causa di eventi di denaturazione. Inoltre, la maggior parte dei metodi commerciali era orientata verso l'uso e l'analisi di proteine del plasma, che è una frazione facilmente contaminabile e che può portare a risultati scarsamente interpretabili.

Ora l'attenzione si è concentrata verso saggi basati sul DNA come fonte di informazione. In effetti, il DNA ha numerosi vantaggi rispetto alle proteine: i) è più

termostabile di molte proteine; ii) è presente nella maggioranza delle cellule degli organismi; iii) può potenzialmente fornire più informazioni delle proteine. Inoltre, la tecnologia di analisi del DNA è più rapida e adatta ad essere automatizzata, semplificando così notevolmente le procedure di autenticazione.

21.5.1 Metodi basati sul DNA per l'autenticazione dei prodotti alimentari

I primi studi condotti usando il DNA per riconoscere la carne di animali di diverse specie sono stati basati su metodi semplici. Solitamente, specifiche sonde di DNA opportunamente marcate venivano usate per l'**ibridazione del DNA** dei campioni da analizzare, preventivamente trasferiti su membrane, mediante esperimenti di *Slot-blot* o *Dot-blot* (Fig. 21.33). Ricorrendo ad appropriate condizioni di stringenza, le sonde di DNA genomico derivanti da determinate specie erano in grado di ibridarsi unicamente con il DNA della stessa specie con modesti problemi di reattività incrociata. L'isolamento di tali sonde è stato possibile anche non disponendo di grosse conoscenze preliminari del genoma delle specie in esame. Il legame specie-specifico tra la sonda e la sequenza bersaglio era dovuto principalmente all'ibridazione di sequenze ripetitive complementari. Tali sequenze, combinate in tandem e disperse in tutto il genoma, sono note come sequenze satellite e i marcatori basati sulla procedura di ibridazione di tipo *Southern blot* sono detti VNTR (*variable number of tandem repeats*).

L'impiego di questi marcatori molecolari in combinazione con sonde specie-specifiche ha permesso l'identificazione inequivocabile di campioni di pollo e maiale, usando campioni di DNA estratto e purificato sia dalle carni fresche che da quelle cotte presenti in prodotti commerciali. Le sonde specifiche di caprini, ovini e bovini hanno invece mostrato qualche problema di reattività incrociata, con ogni probabilità a causa dell'elevata omologia tra le sequenze di DNA satellite nelle differenti specie (Fig. 21.34). Le difficoltà principali sono state riscontrate soprattutto per la discriminazione tra carne di ovini e di caprini dal momento che le sequenze di DNA satellite di queste due specie sono risultate molto simili.

In seguito, le procedure di ibridazione con sonde di DNA specie-specifiche sono state messe a punto ai fini dell'identificazione delle carni di bovini, suini ed ovini, così come di pollo, tacchino e coniglio nei prodotti crudi. La presenza di specie diverse, in proporzioni variabili, è stata dimostrata in molti prodotti commerciali, sia freschi che inscatolati, anche sottoposti a trattamenti termici. Inoltre, l'ibridazione del DNA con sonde specifiche si è dimostrata utile anche per l'identificazione di differenti razze di bovini.

Dato che le sonde specie-specifiche sono in genere composte da oligonucleotidi ripetuti di lunghezza inferiore a 100 basi, l'ibridazione è tecnicamente possibile anche quando interviene una considerevole degradazione del DNA nel campione da analizzare. L'intensità del segnale potrebbe anche essere valutata per quantificare le singole specie presenti in miscugli di carne, in base al numero di sonde marcate ibridatesi con la sequenza bersaglio. Tuttavia, è necessaria una certa cautela dal momento che l'intensità del segnale può essere influenzata da fattori come l'origine del tessuto o il sistema di analisi.

In generale, i metodi basati sull'ibridazione del DNA sono tecnicamente complessi da realizzare ed è principalmente per questo motivo che in tempi recenti sono stati messi a punto altri metodi basati sull'**amplificazione del DNA** per mezzo della PCR (*polymerase chain reaction*). Tale tecnica permette di sintetizzare rapidamente milioni di copie di un frammento di DNA ed i prodotti risultanti dall'amplificazione enzimatica possono essere analizzati attraverso un'ampia varietà di metodi.

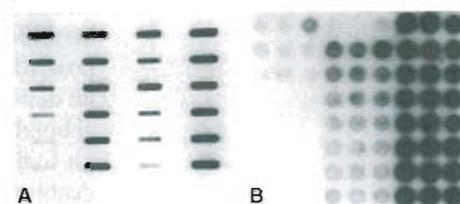


Fig. 21.33 – Risultati di analisi di ibridazione di tipo *Slot-blot* (A) e *Dot-blot* (B).

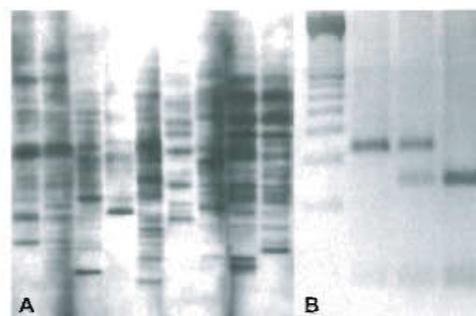
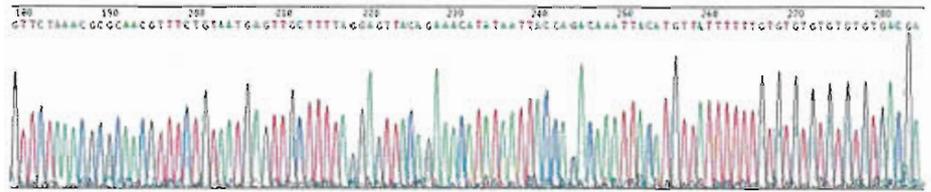


Fig. 21.34 – Profili VNTR (A) e RFLP (B) ottenuti in campioni di DNA bovino e suino usando, rispettivamente, sonde genomiche multi-locus e singolo locus.

Fig. 21.35 – Risultato di una reazione di sequenziamento: si tratta di un clone genomico di pollo contenente un motivo ripetuto di tipo GT/AC.



Il metodo più diretto per ottenere informazioni sui prodotti della PCR è basato sul loro **sequenziamento** (Fig. 21.35). Le informazioni così ottenute sono state usate per identificare l'origine delle carni in numerose specie animali. Il DNA mitocondriale possiede numerosi vantaggi rispetto al DNA nucleare, soprattutto per l'identificazione delle specie dei prodotti alimentari di origine animale. Esso è relativamente più abbondante di quello nucleare, presenta un'eredità di tipo materno così normalmente gli individui possiedono soltanto un allele e le possibili ambiguità di sequenza nei genotipi eterozigoti sono evitate. L'elevato tasso di mutazione che caratterizza il genoma mitocondriale, rispetto a quello del genoma nucleare, porta ad un accumulo di un numero sufficientemente elevato di variazioni puntiformi a livello nucleotidico tali da permettere la discriminazione di specie anche tra loro molto vicine filogeneticamente. Tuttavia il DNA mitocondriale presenta un certo grado di variabilità anche entro la stessa specie e così deve essere considerato con attenzione quando la discriminazione tra organismi è basata sui polimorfismi per singola base (SNP, *single nucleotide polymorphism*).

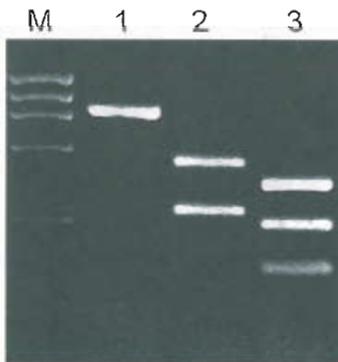


Fig. 21.36 – Profili di restrizione di prodotti di amplificazione: marcatori CAPS, detti anche PCR-RFLP.

Il metodo indiretto per ottenere informazioni sui prodotti della PCR è basato sulla loro digestione con specifici enzimi di restrizione. A titolo di esempio, utilizzando primer disegnati su una sequenza satellite di ovini è stato possibile amplificare sequenze di DNA specifiche negli ovini ed altre omologhe nei caprini, non rinvenibili nel genoma di altre specie. I prodotti della PCR sequenziati hanno mostrato un grado di similarità pari al 92%. Tuttavia, quattro siti di restrizione sono risultati differenti tra la sequenza di ovini e quella di caprini, così da rendere possibile la distinzione delle due specie attraverso una digestione enzimatica dei prodotti di amplificazione. Tali polimorfismi possono essere visualizzati attraverso una semplice analisi elettroforetica senza ricorrere al sequenziamento. In alcuni casi è, infatti, sufficiente ricorrere ad una serie incrociata di digestioni del DNA amplificato per riuscire a distinguere più specie unicamente in base al profilo elettroforetico generato dai frammenti amplificati e ristretti. Questa tecnica, frequentemente riportata come **PCR-RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ma che sarebbe più corretto indicare come **analisi CAPS** (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), ha trovato ampio uso per l'identificazione di molte specie di carne e di pesce (Fig. 21.36). Tali procedure consentono di realizzare screening di prodotti di origine animale finalizzati alla tracciabilità delle specie anche in laboratori poco attrezzati.

La disponibilità di informazioni dettagliate di sequenze genomiche per molte specie ha consentito di approntare anche protocolli di identificazione di animali e prodotti alimentari attraverso l'analisi di polimorfismi basati su pochi e perfino singoli nucleotidi. A tale scopo si impiegano primer specie-specifici disegnati sulla sequenza di determinati geni, di origine nucleare o mitocondriale, da usare in reazioni di PCR sito-specifiche. Ricorrendo a condizioni di reazione adeguatamente controllate, tali primer consentono di generare un prodotto di amplificazione soltanto in presenza di DNA della specie cercata nel campione oggetto di analisi. La conoscenza completa della sequenza nucleotidica permette di predire il risultato atteso, così che l'identificazione della specie possa venire confermata in base alla lunghezza del prodotto di amplificazione una volta separato mediante elettroforesi in gel di agarosio o di

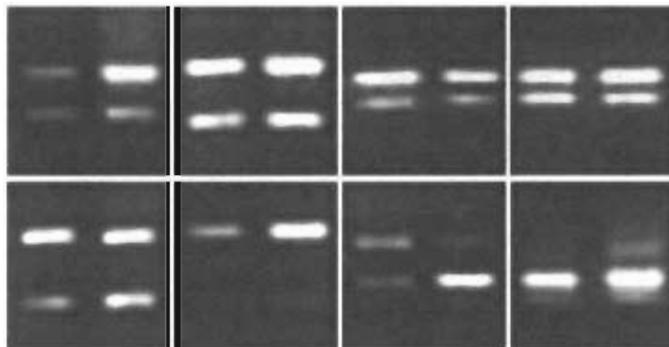


Fig. 21.40 – Prodotti amplificati di DNA di topo: il diverso peso molecolare è riconducibile a membri distinti dei geni codificanti le actine.

elettroforetici di prodotti di amplificazione specie-specifici. La famiglia multigenica delle actine include un numero elevato di membri, le cui sequenze codificanti sono altamente conservate mentre gli introni occupano posizioni diversificate ed hanno dimensioni variabili (Fig. 21.39). È tale organizzazione delle regioni introniche che rende possibile l'identificazione delle specie. Le coppie di primer da usare per le reazioni di PCR sono solitamente disegnate all'interno di una parte della regione codificante, altamente conservata in differenti isoforme di actina, che risulta però interrotta da un introne in tutti i membri della famiglia multigenica. L'uso

di questi primer consente di saggiare contemporaneamente molti loci del gene dell'actina, generando così profili elettroforetici composti di prodotti amplificati di diversa dimensione come diretta conseguenza delle variazioni di composizione e posizione dell'introne. Tali profili risultano riproducibili e sono polimorfici tra individui di specie diverse mentre appaiono uguali tra individui della stessa specie o tra razze all'interno di una specie (Fig. 21.40).

In conclusione, volendo effettuare un confronto tra le metodologie basate sul DNA per l'autenticazione dei prodotti alimentari di origine animale, è opportuno considerare innanzitutto la riproducibilità e l'utilità dei metodi descritti. I metodi basati sull'ibridazione del DNA sono relativamente dispendiosi in termini di tempo e per la marcatura della sonda bisogna spesso ricorrere a radioisotopi. Tuttavia, in appropriate condizioni sperimentali, tali metodi si sono dimostrati efficaci ed affidabili per l'identificazione di carni di molte specie animali, anche disponendo di campioni di DNA relativamente degradato. Un limite tecnico è rappresentato dalle notevoli quantità di DNA necessarie per attuare l'ibridazione.

I metodi basati sulla PCR possono essere attuati con molto meno materiale di partenza, visto che il metodo prevede una reazione di amplificazione. Inoltre, non è generalmente richiesto DNA di elevata qualità, benché la presenza di contaminanti nei campioni può inibire l'attività polimerasica. L'uso di più combinazioni di primer specie-specifiche in reazioni di PCR multiplex costituisce un sistema rapido ed affidabile per l'identificazione di più specie simultaneamente. In questi casi è ovviamente necessaria la conoscenza preventiva della sequenza da ricercare al fine di disegnare primer specifici per l'amplificazione e può essere altresì richiesta la conoscenza di siti interni di restrizione per escludere la possibilità di falsi-positivi.

L'analisi CAPS (PCR-RFLP) basata sulla restrizione dei prodotti amplificati è ampiamente usata per la discriminazione delle specie di provenienza di alimenti di carne e pesce. Tali metodi presentano lo svantaggio di una modesta riproducibilità nei casi di amplificazioni aspecifiche e/o digestioni parziali. La procedura è comunque semplice da realizzare tecnicamente perché i prodotti della PCR sono digeriti con enzimi di restrizione e risolti elettroforeticamente ricorrendo a normali gel di agarosio. L'analisi SSCP richiede, invece, gel a più alta risoluzione, come quelli di poliacrilammide, per la separazione dei prodotti di PCR denaturati in quanto i polimorfismi sono dovuti a variazioni della struttura secondaria dei filamenti di DNA. In generale, condizioni stabili di reazione sono determinanti per la riproducibilità delle analisi.

Quali sono allo stato attuale delle conoscenze scientifiche e metodologiche le problematiche legate all'analisi di autenticazione dei prodotti alimentari?

I budget richiesti per effettuare le analisi degli alimenti sono generalmente più bassi di quelli dedicati alla ricerca sanitaria. La qualità, più che la quantità, del DNA usato per l'esecuzione delle analisi è un fattore determinante per la riproducibilità e l'affidabilità dell'esito finale. L'intensivo processamento industriale degli alimenti, come

quello che prevede la lavorazione e la conservazione delle carni e del pesce, può causare una significativa degradazione del DNA, limitando la dimensione dei prodotti che possono essere ibridati, amplificati e/o digeriti. Si ritiene che i test di routine condotti con DNA degradato possano portare ad identificare frammenti di dimensione uguale o inferiore a 120-150 pb. Questo è un importante fattore da tenere in forte considerazione quando si mette a punto un test da usare per l'analisi dei prodotti trasformati.

Una notevole varietà di metodi basati sull'analisi del DNA sono ora disponibili per l'autenticazione dei prodotti alimentari di origine animale. Tali metodi variano per la loro complessità tecnica ed attuabilità economica. Entrambi questi fattori sono responsabili delle decisioni prese all'interno dei laboratori deputati all'esecuzione dei controlli alimentari. Con un controllo più assiduo dei prodotti alimentari, in risposta alle richieste dei consumatori, i test attualmente disponibili potranno essere adottati in relazione alle richieste formulate dal mercato. Tuttavia, prima che questo accada, dovranno essere validati i metodi di analisi disponibili in modo da rendere i loro protocolli facilmente attuabili ed i risultati forniti riproducibili.

21.5.2 Nota tecnica: Riconoscimento delle carni mediante analisi del DNA

L'identificazione delle specie animali presenti come impasto nei prodotti a base di carne adibiti all'alimentazione umana e animale costituisce un problema tipico nell'analisi merceologica in quanto la miscelazione di carne di specie animali diverse è consentita purché le specie di appartenenza vengano dichiarate. La grande varietà di prodotti a base di carne esistente sul mercato, quali insaccati, conserve, precotti, surgelati, ecc. (**Fig. 21.41**) impone un controllo accurato degli ingredienti dichiarati dal produttore, soprattutto quando una specie che fornisce carne pregiata può essere fraudolentemente addizionata o sostituita con un'altra che dà un prodotto di qualità peggiore ad un costo più basso. La discriminazione fra specie è importante per il consumatore anche per altre ragioni, come ad esempio problemi igienico-sanitari, allergie specifiche nei confronti di determinati tipi di carni o restrizioni della dieta inerenti a motivi religiosi.

Da ultimo il riconoscimento delle specie utilizzate per produrre derivati proteici, contenuti nei mangimi, assume un'importanza fondamentale – anche se in modo indiretto – nella tutela della salute umana. Si considerino a questo proposito, i problemi sanitari sorti in Gran Bretagna negli ultimi anni per la diffusione dell'encefalopatia spongiforme dei bovini (BSE). L'insorgenza di questa patologia, il rischio di una sua trasmissione all'uomo e la relazione esistente tra la trasmissione della patologia e l'uso di farine animali nei mangimi per uso zootecnico, hanno indotto all'attuazione di misure precauzionali su tutto il territorio comunitario sul quale vige attualmente il divieto di somministrare ai ruminanti con la dieta proteine derivate dai mammiferi. Questa doverosa decisione, risalente al 20 giugno 1994, se da un lato tutela il patrimonio zootecnico europeo dalla diffusione della malattia e di conseguenza il consumatore, dall'altro pone l'annoso problema della necessità di disporre di mezzi idonei al controllo dell'osservanza di tale divieto. Poter identificare la presenza di una farina animale ed eventualmente riconoscerne la specie di origine all'interno di un mangime composto, assume così particolare rilevanza presso gli operatori sanitari e zootecnici.

Tradizionalmente la caratterizzazione della specie nei prodotti a base di carne destinati al consumo umano avviene mediante tecniche elettroforetiche ed immunologiche che si basano, entrambe, sulla separazione e sul riconoscimento di proteine specie-specifiche. Il limite principale di tali metodiche risiede nella loro scarsa applicabilità a campioni processati. Infatti la denaturazione delle proteine indotta dalle alte temperature è una modificazione irreversibile che rende di difficile interpretazione i risultati. Sebbene in letteratura vengano riportati lavori in cui l'elettroforesi su



Fig. 21.41 – Insaccati di carne suina.

gel di poliacrilammide viene utilizzata per il riconoscimento della specie in campioni di carne trattati termicamente (80-100°C per 30 min oppure 120°C per 6-20 min), il limite di sensibilità di questo strumento di indagine, inteso come concentrazione minima alla quale una certa specie risulta identificabile all'interno di una miscela, risulta piuttosto elevato (10%).

I metodi immunologici, che si basano sull'interazione tra antigene ed anticorpo, possono essere raggruppati sostanzialmente in due categorie, con le loro numerose varianti: i) la doppia immunodiffusione in gel di agar (metodo Ouchterlony); ii) test immunoenzimatico ELISA.

L'immunodiffusione, comunemente utilizzata come metodo di *screening*, ha trovato un'ampia utilizzazione grazie al ricorso di kit disponibili in commercio. Anche i metodi immunoenzimatici, benché considerati di conferma, possono risultare di relativamente facile applicazione. Il punto debole dei metodi immunologici risiede principalmente nella reattività incrociata evidenziata tra specie filogeneticamente vicine. La sensibilità di questi metodi è inoltre soggetta ad una notevole variabilità in relazione al tipo di miscela e al trattamento termico subito dal campione. Recentemente sono stati implementati saggi ELISA in grado di evidenziare, all'interno di una farina di pesce, proteine di ruminante fino ad una parte per 6.000, anche quando il materiale subisce un riscaldamento fino a 145°C. Ciò significa che è possibile disporre di un metodo immunologico per il controllo delle farine di pesce che consente di accertare addizioni fraudolente di proteine di origine animale e di basso costo.

Attualmente, in linea con il D.M. 13 aprile 1994 "Approvazione dei metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali", per i controlli è utilizzato un metodo microscopico, attraverso il quale è possibile il riconoscimento dei costituenti solidi dei mangimi, sia vegetali che animali, e quindi il differenziamento dell'origine zoologica delle farine animali, sulla base della conformazione di frammenti di ossa, peli, setole, corna, unghie, e sulla base della struttura istologica delle particelle più fini.

Oltre a dette tecniche sono state proposte anche altre alternative come l'elettroforesi su gel di poliacrilammide e sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE), cromatografia liquida ad elevata risoluzione (HPLC) e isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide. Quest'ultima tecnica, applicata alle frazioni proteiche, è quella più studiata: si basa sull'analisi per elettroforesi in gel a gradiente di pH dopo estrazione in urea concentrata. Il campo elettrico applicato al gel induce le molecole proteiche a muoversi in funzione della loro carica netta. Ciascuna si focalizzerà nella zona del gel a pH corrispondente al proprio punto isoelettrico. La successiva colorazione ha lo scopo di visualizzare ciascuna banda per la lettura densitometrica. L'isoelettrofocalizzazione, come la tecnica ELISA, è molto usata per identificare le specie in prodotti a base di carni cotte e non di salumeria e per differenziare i diversi tipi di carni ottenute dalle varie specie di animali.

L'attuale divieto di impiegare derivati proteici, ad esempio di ruminanti, per alimentare questi stessi animali, visto il rischio di una possibile trasmissione all'uomo di agenti patogeni resistenti a trattamenti termici, ha aumentato l'importanza di rendere di facile impiego metodi innovativi atti ad analizzare anche matrici alimentari che abbiano subito un processo di denaturazione termica quali mangimi e farine di carne. A questo scopo trovano applicazione le tecniche proprie di biologia molecolare basate sull'analisi del genoma che permettono di identificare le diverse specie presenti, anche a partire da piccole quantità di materiali seppure processati poiché la denaturazione del DNA indotta dalle alte temperature è una modificazione generalmente reversibile.

L'identificazione di specie animali mediante l'analisi del DNA sfrutta le differenze (polimorfismi) a carico della sequenza nucleotidica dei geni, sia nucleari che mitocondriali. Spesso la scelta ricade su questi ultimi dal momento che, in una singola cellula, per ogni copia di genoma nucleare sono presenti 100-1.000 copie di genoma mitocondriale. Per questa ragione la probabilità di riuscire ad estrarre ed amplificare

frammenti di DNA mitocondriale anche da campioni molto degradati è molto maggiore che per il DNA nucleare. All'interno del mtDNA vengono solitamente valutate regioni del gene del Citocromo b o del gene codificante ATPasi, che sono coinvolti nel processo di respirazione e le cui sequenze risultano altamente conservate in tutti i vertebrati.

La possibilità di lavorare sugli acidi nucleici garantisce senza dubbio notevoli vantaggi rispetto alle proteine. Il DNA è presente in ogni cellula, è isolabile da tutte le matrici biologiche ed è molto più resistente delle proteine ai trattamenti termici. Le metodologie per il riconoscimento di sequenze specie-specifiche presenti negli acidi nucleici (DNA mitocondriale e DNA satellite) sono basate sull'analisi di marcatori molecolari. L'identificazione di tali sequenze può avvenire sostanzialmente impiegando due tecniche: i) ibridazione su membrana (*slot/dot blot*) di sequenze specie-specifiche con sonde oligonucleotidiche complementari preventivamente marcate con radionuclidi o ricorrendo ad altri sistemi (fluoresceina, digossigenina) seguita da analisi autoradiografica; ii) l'amplificazione mediante PCR di sequenze specie-specifiche con primer oligonucleotidici disegnati direttamente su tali sequenze seguita da separazione elettroforetica su gel di agarosio o di poliaccrilammide (Fig. 21.42).

Prove di laboratorio volte a verificare l'applicabilità del metodo di ibridazione per l'identificazione della specie nei mangimi contenenti farine animali hanno mostrato che l'intensità del trattamento termico subito dal campione diminuisce significativamente la capacità della sonda di ibridare specifiche sequenze complementari di DNA nucleare. L'uso del metodo di amplificazione di specifiche sequenze di DNA mitocondriale ha messo in evidenza la presenza di un'ampia variabilità nucleotidica intraspecifica e soprattutto interspecifica nei mammiferi, negli uccelli e nei pesci. L'identificazione di regioni polimorfiche in geni come, ad esempio, quelli del citocromo b e dell'ATPasi 8, ha suggerito l'applicazione di tecniche molecolari volte al riconoscimento della specie o delle specie di origine presenti in prodotti alimentari a base di carne, destinati al consumo umano.

Allo stato attuale delle conoscenze, l'approccio metodologico con il migliore grado di sensibilità e di affidabilità per l'identificazione delle diverse specie animali è quello che prevede l'amplificazione di specifiche sequenze di DNA mitocondriale e la dige-

stione del prodotto di PCR con specifici enzimi di restrizione seguiti dall'analisi dei frammenti amplificati-digeriti mediante elettroforesi o sequenziatore. Tale tecnica, molto spesso chiamata PCR-RFLP, rappresenta in realtà una vera e propria tecnica CAPS (→ Cap. 17) poiché non prevede alcuna ibridazione tipo Southern blot ma solo amplificazione mediante PCR combinata a restrizione con endonucleasi. Essa è molto utilizzata per la tracciabilità genetica-molecolare di animali terrestri e marini (→ **Capitolo 21.3**).

I **marcatori molecolari** di tipo CAPS prevedono, durante una prima fase, l'amplificazione del DNA con una specifica coppia di primer al fine di ottenere un frammento di dimensioni uguali in tutti i campioni biologici da analizzare. Segue una seconda fase inerente la digestione del frammento mediante endonucleasi allo scopo di generare frammenti di restrizione specie-specifici. La combinazione dei primer per l'amplificazione con le endonucleasi per la restrizione consentono di ottenere un profilo elettroforetico composto di un insieme di frammenti amplificati-digeriti caratteristico di ogni specie.

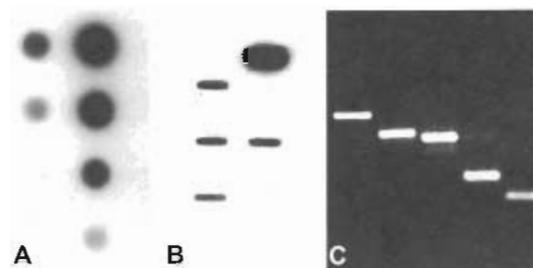


Fig. 21.42 – Esempio di segnali di ibridazione e di amplificazione di sequenze specifiche: (A) tecnica Dot-blot; (B) Slot-blot; (C) PCR.

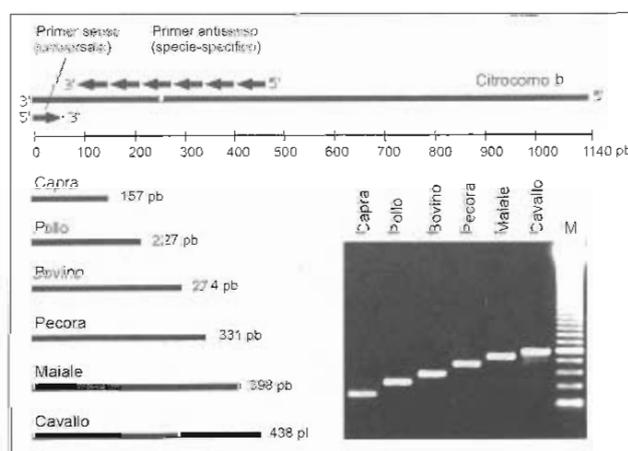


Fig. 21.43 – Tecnica di PCR multiplex: (A) rappresentazione schematica dei prodotti di PCR analizzabili usando primer antisenso specie-specifici; (B) prodotti di PCR specie-specifici.

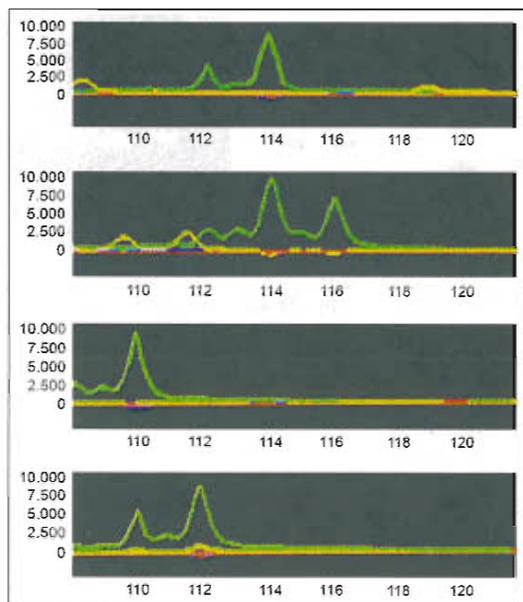


Fig. 21.44 – Analisi di frammenti con sequenziatore: esempio di picchi generati mediante elettroforesi capillare che evidenziano distinti marcatori molecolari.

Tab. 21.9 – Sequenze dei primer Cyt-b1/Cyt-b2 e Meat-1/Meat-2.

Cytb1 (senso)	5' – CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA - 3'
Cytb2 (antisenso)	5' – GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA - 3'
Meat1 (senso)	5' – CATCGACCTTCCGACCCCATCAACAT - 3'
Meat2 (antisenso)	5' – TGTTCTACTGGTTGGCCTCCAATTCA - 3'

Al momento sono noti anche protocolli di **PCR multiplex** che permettono l'identificazione di molte specie animali di interesse alimentare, come bovino, suino, pollo, ovino, caprino ed equino. In questo caso si utilizza un solo primer *forward*, disegnato su una regione conservata della sequenza del gene citocromo b mitocondriale, e sei primer *reverse*, ciascuno disegnato su una regione polimorfica della sequenza così da risultare specifico per ogni specie. L'amplificazione condotta con tali combinazioni di primer consente di ottenere sei prodotti di PCR di lunghezza diversa, ciascuno caratteristico di una specie. In Fig. 21.43: i frammenti di 157, 227, 274, 331, 398 e 438 pb corrispondono, rispettivamente, a caprini, polli, bovini, ovini, suini ed equini.

L'analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione e restrizione viene solitamente effettuata su gel di agarosio. Un limite di queste tecniche è quindi rappresentato dalla capacità di rilevamento dei campioni, pari a circa 0,25 ng di DNA per tutti gli alimenti. Tale limite può essere superato ricorrendo all'analisi elettroforetica capillare mediante sequenziatori. I sequenziatori, oltre ad essere utilizzati per la determinazione della sequenza nucleotidica di frammenti di DNA, consentono anche la separazione di frammenti di DNA in base alla loro lunghezza. L'analisi dei frammenti specie-specifici ottenuti mediante PCR di tipo multiplex prevede la marcatura del primer *forward* con un fluoroforo in posizione 5' (Fig. 21.44).

Negli ultimi anni, l'analisi di frammenti mediante elettroforesi capillare è diventata una tecnica particolarmente utile ed affidabile per l'identificazione delle specie su

base genetico-molecolare. Una volta convertite le sequenze specie-specifiche in singoli frammenti amplificati mediante PCR, qualsiasi variazione anche minima della loro lunghezza diventa per lo strumento un dato sufficiente all'identificazione della specie. L'analisi di frammenti con sequenziatori è ampiamente utilizzata per discriminare non solo specie animali, ma anche specie vegetali e microbiche.

La tecnica STS, basata sull'amplificazione di un frammento di DNA avente la stessa lunghezza in tutte le specie animali, può essere realizzata con i primer specifici

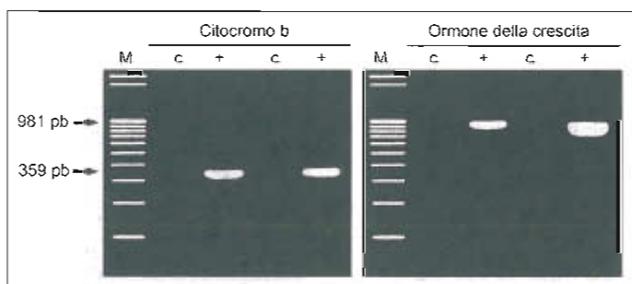


Fig. 21.45 – Prodotti di PCR relativi a sequenze specifiche del Citocromo b (c = controllo; + = campione positivo) e dell'ormone della crescita (c = controllo; + = campione positivo).

per una regione del gene del citocromo b oppure con i primer specifici per una regione del gene codificante l'ormone della crescita (Tab. 21.9). L'analisi PCR di campioni di DNA mitocondriale con le combinazioni di primer Cyt-1/Cyt-2 e Meat-1/Meat-2 specifiche per il gene citocromo b e per il gene codificante l'ormone della crescita generano, rispettivamente, un prodotto di 359 pb e 981 pb (Fig. 21.45). Tale sistema è applicabile sia al prodotto fresco che trasformato. I prodotti di PCR sono sottoposti a digestione con enzimi di restrizione al fine di ottenere così frammenti di DNA di lunghezza specifica per ogni specie di animale. Nelle Tab. 21.10 e 21.11 sono elencate le endonucleasi utilizzabili per la restrizione dei prodotti di amplificazione corrispondenti ai geni citocromo b e ormone della crescita e riportate le dimensioni dei corrispondenti frammenti di restrizione. In particolare, gli enzimi più appropriati ai

Enzimi Specie	Alu I	Rsa I	Taq I	Hinf I	Hae III	Mbo I
Maiale	244 155	359	218 141	359	153 132 74	244 115
Bovino	190 169	359	359	198 117 44	285 74	359
Cinghiale	244 115	359	218 141	198 161	153 132 74	244 115
Bufalo	190 169	n.d.	191 168	359	285 74	244 115
Pecora	359	359	359	198 161	159 126 74	244 115
Capra	359	359	218 141	198 161	230 74 55	213 115 31
Cavallo	274 169 105 85	359	359	n.d.	n.d.	359
Pollo	359	210 149	359	188 161 10	159 126 74	359
Tacchino	359	149 109 101	359	198 161	126 103 74 56	359

Tab. 21.10 – Dimensione dei frammenti amplificati di sequenze specifiche dei geni per il Citocromo b dopo digestione con endonucleasi di restrizione (Fonte: N. De Beni e F. Cattapan, 2002).

Enzima	Grandi animali			Animali da cortile				Selvaggina					
	Manzo	Cavallo	Maiale	Coniglio	Pollo	Tacchino	Anatra	Cinghiale	Capriolo	Cervo	Camoscio	Lepre	Fagiano
<i>Alu I</i>	452 325 196	401 320 241 149 127	430 241 149 127	816 165	n.d.	n.d.	608 373	525 259 140	690 265	719 161 101	719 161 101	458 412 111	580 396
<i>Hsp92 II</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	592 165 79 48	525 254 114 71	553 170 79 55	n.t.	n.t.
<i>Hae III</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	420 175 106	361 195 80 41	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Rsa I</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	703 167	593 175 106	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Tab. 21.11 – Dimensione dei frammenti amplificati di sequenze specifiche dei geni per l'ormone della crescita dopo digestione con endonucleasi di restrizione (Fonte: N. De Beni e F. Cattapan, 2002).

fini dell'identificazione delle specie di carni sono risultati i seguenti: *HaeIII* e *HinfI* per le carni bovine, *RsaI* e *HinfI* per le carni avicole (pollo e tacchino), *HaeIII* e *AluI* per le carni suine e *HaeIII* e *MboI* per le carni ovine. In Fig. 21.46 è riportato un esempio di profili elettroforetici ottenuti trattando con enzimi di restrizione i prodotti di amplificazione di DNA mitocondriale isolato da carne bovina, suina ed equina. È possibile identificare le singole specie animali in funzione del peso molecolare dei prodotti amplificati-ristretti: ogni specie sarà caratterizzata da una determinata combinazione di marcatori.

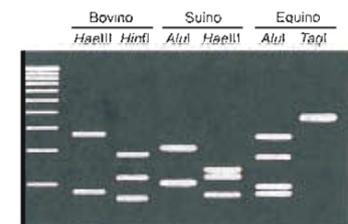


Fig. 21.46 – Profili elettroforetici di marcatori CAPS ottenuti trattando con enzimi di restrizione i prodotti di amplificazione di DNA mitocondriale isolato da campioni di carne di bovino, suino ed equino.

Tab. 21.12 – Sequenze del primer *forward* (universale) e dei primer *reverse* (specie-specifici) disegnati sulla sequenza del gene Citocromo b appartenente al genoma mitocondriale.

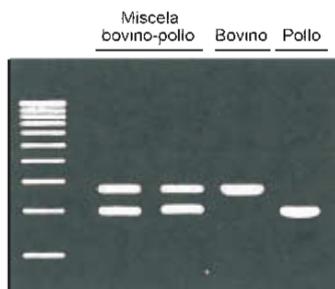


Fig. 21.47 – Rappresentazione dei prodotti di amplificazione ottenuti mediante PCR multiplex usando DNA isolato da miscele di carne di bovino e pollo e da carne pura delle singole specie.

Primer	Sequenza (5' - 3')	T _m	
Forward (senso)	GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAA	80,0°C	
Reverse (antisenso)	Capra	TCTGACAATGTGAGTTACAGAGGGA	68,1°C
	Pollo	AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG	67,1°C
	Manzo	CTAGAAAAGTGTAAAGACCCGTAATATAAG	60,5°C
	Pecora	CTATGAATGCTGTGGCTATTGTCGCA	71,2°C
	Maiale	GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA	64,9°C
	Cavallo	CTCAGATTCACGACGAGGGTAGTA	67,3°C

La tecnica di PCR multiplex, invece, consiste nell'ottenimento di frammenti di DNA di lunghezza diversa dal gene citocromo b, ciascuno corrispondente ad una determinata specie animale. Ad esempio, i frammenti di lunghezza pari a 157, 227, 274, 331, 398 e 439 pb corrispondono, rispettivamente, alle specie *Capra hircus*, *Gallus gallus*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa* ed *Equus caballus* (Fig. 21.47). Ciò è possibile utilizzando un miscuglio di primer composto da un primer *forward* identico per tutte le specie e da sei primer *reverse* ciascuno specifico per una data specie (Tab. 21.12).

L'identificazione dei prodotti di PCR è possibile attraverso una normale analisi elettroforetica con gel di agarosio oppure attraverso analisi elettroforetica capillare con gel di poliacrilammide mediante sequenziatore.

In conclusione, è possibile effettuare analisi molecolari per accertare la presenza di farine di carne in mangimi e per identificare con precisione la specie o le specie animali in vari prodotti alimentari. Entrambe le tecniche basate sulla PCR consentono di verificare la presenza anche a basse concentrazioni di carne di vari mammiferi e volatili di interesse commerciale, compresa la selvaggina. Tuttavia, l'amplificazione seguita dalla restrizione sembra essere la procedura più facilmente applicabile. La procedura di analisi in PCR multiplex richiede maggiori investimenti economici ed ottimizzazioni tecniche.

Quadro 21.3 – Tracciabilità genetico-molecolare dei pesci

A cura di Luca Bargelloni, Rosa Lopparelli e Enrico Novelli

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova

Tracciabilità genetica degli alimenti di origine animale

Le recenti emergenze che hanno riguardato il consumo di carni di varia origine animale hanno messo in luce la necessità di poter identificare in ogni passaggio lungo la filiera produttiva l'allevamento e il singolo animale da cui origina un determinato prodotto. Nelle specie terrestri di interesse per l'alimentazione umana (bovini, suini, avicoli) la tracciabilità ed il controllo della qualità si fondano ormai su un approccio genomico integrato. Da un lato sono stati caratterizzati, per ciascuna specie in numero sempre crescente, marcatori molecolari ipervariabili (polimorfismi a carico di motivi microsatelliti, o SSR, e di singoli nucleotidi, o SNP) che permettono di determinare con certezza l'identità dei singoli capi e dei prodotti derivati, dall'altro grazie agli strumenti della genomica funzionale e della proteomica viene analizzato il

profilo di espressione dei diversi organi o tessuti in particolari condizioni. Nel caso di prodotti alimentari in cui non sia facilmente riconoscibile la specie animale di origine (prodotti semilavorati e pronti all'uso), è indispensabile garantire con certezza quale/i specie siano state utilizzate per la loro preparazione. L'identificazione di specie animale nella produzione, trasformazione, commercializzazione e somministrazione degli alimenti, infatti, ha molteplici ricadute di natura legale (codice di procedura penale), sanitaria, merceologico-commerciale, etica e religiosa. Per quanto riguarda i prodotti della pesca e dell'acquacoltura, le metodiche analitiche di tipo genetico-molecolare sono disponibili in modo assai limitato, nonostante la crescente importanza economica e sociale dei prodotti ittici.

Importanza della tracciabilità dei prodotti ittici

Nel comparto dei prodotti della pesca la consueta compra-vendita di prodotto anatomicamente integro ha lasciato posto, secondo un andamento in continua crescita, al prodotto trasformato (filetto e tranci, fresco e surgelato), che ha raggiunto quasi il 40% del volume economico complessivo relativo al consumo

di pesce. Per questi prodotti lavorati, l'identità è spesso affidata alla sola documentazione fiscale di accompagnamento, mentre l'attuale normativa comunitaria (Reg. CE 2065/2001) sancisce in modo inequivocabile l'obbligo di riportare in etichetta il nome della specie animale, oltre che la metodologia di produzione e l'area marina di provenienza.

Le figure economiche che si occupano delle transazioni all'ingrosso di prodotto fresco e congelato, l'industria conserviera che acquista materie prime e semilavorati, i servizi sanitari pubblici di ispezione e vigilanza sulla filiera ittica avvertono la necessità di metodologie analitiche di facile applicabilità in filiera quali strumenti di tutela nella stipula di contratti di compra-vendita all'ingrosso, per la verifica periodica e l'implementazione del protocollo di tracciabilità, per la tutela del cliente e del consumatore. I prodotti della pesca conservati alla temperatura del ghiaccio fondente sono alimenti di grande pregio dietetico-nutrizionale e valore commerciale, ma sono altrettanto deperibili e qualunque intervento di controllo che richieda il supporto del laboratorio deve mettere in vincolo la partita di prodotto per il minor tempo possibile al fine di non compromettere la freschezza della stessa. Inoltre, la possibilità di certificare la specie e l'origine geografica potrebbe concorrere allo sviluppo di un marchio di eco-compatibilità (*eco-labelling*, Comunicazione della Commissione Europea COM(2005)275) per i prodotti della pesca.

Il caso dei "pesci piatti" (Pleuronectiformi) rappresenta un esempio pratico delle potenzialità della tracciabilità genetica applicata ai prodotti ittici. Le specie appartenenti alle famiglie *Soleidae* (sogliole) e *Pleuronectidae* (platessa, passera, halibut, ecc.) sono frequentemente oggetto di sostituzione con specie di minor valore nel commercio del prodotto in filetto a preincartamento e preconfezionato, sia fresco che surgelato. Allo stesso modo, le specie appartenenti all'ordine Squaliformi sono oggetto di azioni fraudolente: la sostituzione di tranci o filetti di palombo con carni di esemplari di minor pregio è purtroppo frequente. Si ricorda che la commercializzazione degli squali è esclusivamente in trancio e filetto, condizione che rende il prodotto - specialmente se congelato - difficilmente identificabile (Fig. 21.48). Altrettanto complesso risulta il mercato degli Scombridi dove la



Fig. 21.48 - Lavorazione di squaliforme mediante decapitazione, spelatura, eviscerazione e filettatura.

materia prima, sia quella destinata al commercio all'ingrosso come prodotto fresco da consumo diretto che quella destinata all'industria conserviera, è oggetto di grande attenzione per la variegata complessità delle specie oggetto di commercio il cui valore risulta essere estremamente variabile. Anche le filiere dei molluschi cefalopodi (soprattutto totani e calamari) e quelle dei lamellibranchi hanno visto la crescita della quota di mercato di prodotto trasformato, surgelato piuttosto che precotto in salamoia, facendo venir meno i punti di repere morfologici utili per la classificazione tassonomica.

I prodotti della pesca e i pesci in particolare sono, inoltre, ascritti nel gruppo degli alimenti con potere allergenico. Potenziali allergeni sono stati descritti in diverse specie ittiche, tra cui quelle appartenenti all'ordine dei Gadiformi (merluzzi e nasello) sono probabilmente le più note. La lavorazione dei merluzzi, comune in varie tipologie di prodotto (hamburger, spiedini, filetti, ecc.), richiede una scrupolosa pulizia della linea di lavorazione al fine di eliminare ogni residuo di proteina appartenente a questa famiglia (antigene Gad c1 o proteina M). È noto, infatti, che la presenza anche in tracce di proteine con potere allergenico è sufficiente a scatenare la risposta immunitaria dei soggetti sensibili la cui gravità è variabile ma oggetto di grande attenzione da parte delle Autorità Sanitarie, come contemplato anche dalla Direttiva Comunitaria 89/2003 sugli allergeni nelle produzioni alimentari. L'identificazione di specie trova riscontro anche laddove sia necessario procedere con il riconoscimento di soggetti oggetto di protezione e/o di temporanea sospensione della pesca o ancora di divieto di utilizzo a fini alimentari in quanto dimostrato essere velenosi e nocivi per la salute del consumatore (Reg. CE 853/2004).

L'utilizzo a scopo analitico-diagnostico di metodologie basate sull'analisi di un profilo proteico, diffusamente utilizzate in passato, si sono dimostrate inefficaci nel caso di prodotto trasformato (cotto piuttosto che marinato, salato o anche surgelato). Le tecniche molecolari sono oggi quelle di elezione per perseguire l'obiettivo dell'identificazione tassonomica della specie utilizzata nelle produzioni alimentari, anche nel comparto dei prodotti della pesca. L'impiego di sequenze geniche appartenenti al DNA mitocondriale permette, in maniera assolutamente affidabile, la corretta identificazione del tessuto utilizzato nella preparazione di un alimento. Ciò risulta indispensabile per la corretta informazione al consumatore che passa attraverso l'istituto dell'etichettatura per il quale il DM 14/01/2005 e il DM 25/07/2005 riportano l'elenco aggiornato della nomenclatura scientifica e comune delle specie marine utilizzabili nelle produzioni alimentari.

Strumenti molecolari per l'identificazione di stock e di specie nei prodotti ittici

È ormai ampiamente noto e riconosciuto che la diversità delle sequenze geniche può essere impiegata, direttamente o indirettamente attraverso il confronto a livello proteico, per identificare e discriminare specie, sia vegetali che animali. A livello di singola specie, inoltre, la variabilità genetica presente tra individui co-specifici permette l'identificazione individuale. La caratterizzazione di marcatori ipervariabili (AFLP, microsatelliti e più recentemente SNP) in numerose specie ittiche permette di ottenere profili genetici unici (DNA *fingerprinting*), grazie ai quali è possibile assicurare un'effettiva tracciabilità del prodotto ittico lungo la filiera come già avviene per altre specie terrestri. La disponibilità di

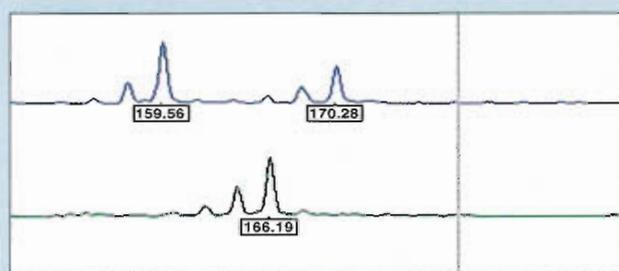


Fig. 21.49 - Profilo molecolare di due individui di branzino per un marcatore microsatellite.

marcatori genetici altamente variabili, infine, consente di assegnare un individuo alla popolazione geografica di origine con elevata confidenza statistica, a condizione che sia stato analizzato un numero sufficiente di campioni provenienti da diverse aree geografiche. Un esempio di quest'ultima applicazione è rappresentato dal caso del branzino (*Dicentrarchus labrax* L.) allevato in modo estensivo nelle valli da pesca del Veneto. Il branzino di valle è considerato un prodotto tipico ed ha un valore di mercato assai più elevato di quello allevato in modo intensivo. Per tutelare questo prodotto garantendone l'origine sono stati raccolti campioni di questa specie da diverse aree geografiche e dalle principali valli da pesca. I campioni sono stati analizzati costruendo un profilo genetico individuale costituito da 14 marcatori microsatelliti ipervariabili (Fig. 21.49). Utilizzando un programma di analisi basato sulla massima verosimiglianza (*maximum-likelihood*) è stato possibile assegnare gli individui alle singole valli di origine con un'elevata precisione (Fig. 21.50).

Per quanto riguarda l'identificazione di specie, così come per altri organismi, l'approccio più frequentemente utilizzato prevede l'amplificazione mediante PCR di uno o più frammenti di geni mitocondriali e l'analisi del prodotto amplificato per mezzo di metodiche quali digestione con enzimi di restrizione o sequenziamento diretto. La scelta del DNA mitocondriale è motivata principalmente dalla disponibilità di primer universali o comunque utilizzabili per ampi gruppi tassonomici e dalla molteplicità di copie di DNA mitocondriale in una singola cellula. Quest'ultima caratteristica consente di amplificare il frammento di interesse anche da campioni di quantità limitata, fortemente degradati perché sottoposti a molteplici passaggi di lavorazione/

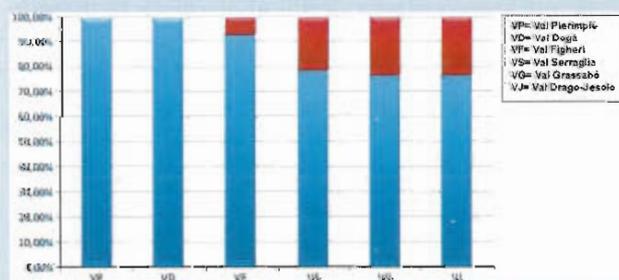


Fig. 21.50 - Percentuale di individui di branzino di valle assegnati correttamente.

trasformazione del prodotto. I geni più frequentemente utilizzati sono quelli codificanti il citocromo b (*cyt b*), l'RNA ribosomiale 16S (*16S rRNA*), la citocromo ossidasi I (*COI*). Un problema di particolare interesse pratico-applicativo è rappresentato dall'identificazione di specie appartenenti alla classe dei Selaci (squali e razze), pesci impiegati nell'alimentazione umana in tutto il mondo. Il problema dell'identificazione di specie si pone in relazione al diverso valore economico e all'impossibilità di ricorrere al riconoscimento morfologico qualora il pesce venga sottoposto a "toielettatura" (decapitazione, spellatura, eviscerazione, sfilettatura, porzionamento) prima della commercializzazione. In alternativa alle metodologie di identificazione basate sull'analisi delle proteine, sono state impiegate metodologie basate sul più stabile DNA mediante l'analisi PCR-RFLP di frammenti di geni mitocondriali. Un esempio dell'applicazione di queste metodologie è data dall'identificazione di soggetti di 8 specie diverse di squaliformi condotta nei nostri laboratori. I campioni di DNA sono stati prima amplificati con primer universali per *cyt b*, ottenendo frammenti da 359 pb che sono stati in seguito sequenziati. Sulla sequenza nucleotidica ottenuta, opportunamente allineata con le sequenze delle medesime specie riportate in *GenBank*, si sono messe a punto le mappe di restrizione, individuando così un set di cinque enzimi di restrizione in grado di discriminare le varie specie (Fig. 21.51).

DNA barcoding

Nel 2003, Paul D. Hebert ha proposto e dimostrato che la sequenza nucleotidica di un singolo gene può ritenersi sufficiente per la differenziazione e l'identificazione di tutti, o comunque

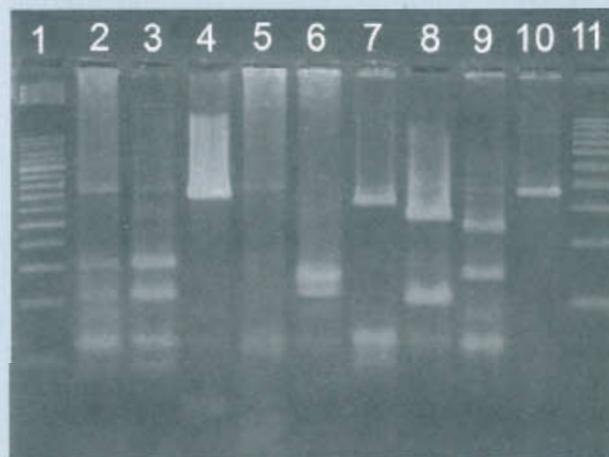


Fig. 21.51 - Analisi PCR-RFLP. I frammenti di 359 pb ottenuti con primer universali per *cyt b* sono stati sottoposti a digestione con gli enzimi di restrizione (indicati tra parentesi caso per caso) e ad elettroforesi in gel di agarosio (3%). Corsia 1: ladder 50 pb; corsia 2: *Mustelus mustelus*, palombo (*MseI*); corsia 3: *Mustelus asterias*, palombo (*MseI*); corsia 4: *Isurus oxyrinchus*, smeriglio (*SmaI*); corsia 5: *Scyliorhinus canicula*, gattuccio (*HpyCH4V*); corsia 6: *Galeorhinus galeus*, canesca (*BsaI*); corsia 7: *Squalus acanthias*, spinarolo (*AluI*); corsia 8: *Alopias superciliosus*, squalo volpe (*HpyCH4V*); corsia 9: *Prionace glauca*, verdesca (*SmaI*); corsia 10: controllo non digerito; corsia 11: ladder 100 pb.

della stragrande maggioranza, delle specie animali sia terrestri che marini. Tale approccio si basa sul sequenziamento di un frammento del gene mitocondriale *COI* codificante la subunità I della citocromo ossidasi (*Cytochrome oxidase subunit I*) che dovrebbe essere ottenuto teoricamente per tutte le specie del gruppo tassonomico di interesse. La metodologia è stata denominata "DNA barcoding" in quanto le varianti di una sequenza nucleotidica di una regione specifica di questo gene è assimilabile ad un codice a barre: ogni specie è riconoscibile in base ad una data sequenza altamente conservata o attraverso un gruppo di sequenze estremamente simili a livello nucleotidico. Rispetto alle metodologie presentate nel paragrafo precedente, quest'ultima non presenta particolari differenze concettuali, ma prevede l'analisi di un numero di specie assai più elevato e soprattutto propone che un solo gene, considerato di riferimento, *COI*. Questo approccio sembra essere assai promettente soprattutto se applicato a problemi di identificazione di specie di interesse commerciale, ed ha già trovato una parziale applicazione ad un gruppo di pesci teleostei presenti nei mari australiani. Altri autori hanno sviluppato un programma computerizzato per l'identificazione di specie ittiche, basandosi però sul frammento *16S rRNA*, considerato più informativo. Non vanno tuttavia dimenticati i potenziali problemi legati all'utilizzo del DNA barcoding, quali la presenza di polimorfismi ancestrali comuni a più di una specie, flusso genico specifico del solo sesso maschile (il DNA mitocondriale si eredita per via strettamente materna), selezione a carico di geni mitocondriali, fenomeni di introgressione e presenza di copie nucleari del gene *COI*, come illustrato da C. Moritz e C. Cicero.

Bibliografia

- Ellegren H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435-45.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 270: 313-321.
- Meyer R., Höfelein C., Lüthy J., Candrian U. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. AOAC International* 78: 1542-1551.
- Moritz C., Cicero C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLOS Biology*, 2: 1529-1531.
- Sobrinho B., Brion M., Carracedo A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*, 154: 181-94.
- Steinke D., Vences M., Salzburger W., Meyer A. (2005). Taxit: a software tool for DNA barcoding using distance methods. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360: 1975-1980.
- Ward R.D., Zemlak TS, Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360: 1847-57.
- Wolf C., Rentsch J., Hübner P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1350-1355.

21.6 Genomica per la sicurezza alimentare e per la produzione animale sostenibile

Lo sviluppo sostenibile è un argomento diventato prioritario nella politica globale negli ultimi anni a partire da un gruppo di Nazioni leader, quelle del G8, che hanno intrapreso la via della sicurezza alimentare e dello sviluppo sostenibile, anche dietro la forte spinta dell'opinione pubblica. In Italia così come nel resto dell'Europa, la sicurezza alimentare ha bisogno di essere incentivata poiché negli ultimi anni i casi di malattie alimentari sono considerevolmente aumentati.

Una importante fonte di malattie microbiologiche della carne, delle uova e del latte è rappresentata dagli animali portatori sani. Oltre a queste malattie, i casi di encefalopatia spongiforme bovina (BSE, *Bovine Spongiform Encephalopathy*) e di influenza aviaria (AI, *avian influenza o bird flu*), nonché la contaminazione dei prodotti per l'alimentazione animale con diossina, rappresentano minacce molto serie per la sicurezza alimentare.

Il termine "agricoltura sostenibile" è usato correntemente per rappresentare qualsiasi sistema produttivo connesso all'agricoltura biologica o all'agricoltura eco-compatibile. La sostenibilità non è basata soltanto su una filosofia produttiva ma è focalizzata sulla relazione di tre fattori fondamentali: sociale, economico e ambientale.

Nel contesto di agricoltura sostenibile, la conservazione della diversità biologica, così come il miglioramento genetico degli animali domestici e la sicurezza sanitaria degli alimenti, hanno giocato in passato e giocheranno sempre più in futuro un ruolo

fondamentale. I selezionatori di razze animali hanno effettivamente modificato il genoma delle specie da allevamento per secoli. Osservando i caratteri fenotipici e selezionando gli individui superiori come progenitori per le future generazioni, hanno accresciuto la frequenza degli alleli favorevoli ed eliminato quelli deleteri, senza possedere informazioni sui geni corrispondenti e sui loro meccanismi molecolari di espressione. Attualmente, le strategie di selezione animale si basano su alcuni fattori che bilanciano le richieste di una elevata produttività con il miglioramento di alcuni caratteri funzionali, come la fertilità e la longevità degli animali.

Durante l'ultimo decennio, alcuni progetti di ricerca sono stati realizzati con l'intento di acquisire maggiori conoscenze sui genomi della maggior parte delle specie di animali da allevamento e di clonare geni coinvolti nella manifestazione di caratteri importanti in termini economici. L'applicazione pratica delle conoscenze teoriche acquisite sui geni e sui genomi animali può condurre ad un nuovo approccio per risolvere i problemi esistenti nel campo della salute e del benessere animale, nonché della quantità, della qualità e della sicurezza dei prodotti alimentari di origine animale.

21.6.1 Sicurezza alimentare

Per la sicurezza alimentare, il contributo delle tecniche di analisi genomica ai fini della selezione è stato fino ad ora limitato, ma può essere consistente in futuro soprattutto nei suini e negli ovini. Ad esempio, nei suini sono stati identificati due geni che determinano maggiore resistenza nei confronti di differenti ceppi di *E. coli*. Inoltre, è stata identificata una mutazione recessiva nel gene *FUT1* (*fucosyl-transferase*) per la resistenza contro l'edema e la diarrea post-svezzamento. Tuttavia, lo sfruttamento di tale risultato ai fini della selezione non è semplice perché il gene *FUT1* è strettamente associato al gene *RYR1* che controlla la sensibilità all'alotano. In passato la selezione per animali tolleranti allo stress ha ridotto la frequenza di alleli resistenti a tali disfunzioni. Di conseguenza, la selezione di linee resistenti omozigoti potrà ridurre ulteriormente la variabilità genetica anche per altri caratteri.

La selezione genetica per la resistenza a patogeni specifici non potrà assicurare allevamenti liberi da patogeni poiché le infezioni frequentemente rimangono latenti negli animali infetti, che risultano clinicamente sani. Il contributo della selezione per la resistenza genetica negli animali e per un miglioramento degli standard di sicurezza alimentare è quindi al momento incerto. Tuttavia, sono stati sviluppati diversi metodi basati sull'analisi del DNA per rilevare moltissimi patogeni batterici presenti nei cibi. La strategia di monitoraggio dipende dal tipo di patogeno e dal suo ciclo vitale. Saggi biotecnologici potrebbero essere usati non solo per rilevare infezioni negli animali in vita, ma anche per monitorare i patogeni sui prodotti alimentari, nelle stalle e nell'intera filiera alimentare.



Fig. 21.52 – Esemplare di *Aubrac*, antica razza bovina a duplice attitudine (carne e lavoro), originaria del dipartimento di Aveyron, monti d'Aubrac, nel sud del Massiccio Centrale in Francia.

21.6.2 Produzione animale sostenibile

Recentemente è stato dimostrato che l'identificazione di geni presenti nei QTL responsabili di caratteri quantitativi è fattibile negli animali domestici seguendo approcci di clonaggio posizionale (*positional cloning* o *map-based cloning*). I maggiori ostacoli per lo studio dei caratteri riferiti alla salute, alle caratteristiche qualitative dei prodotti, alla robustezza e alla resistenza alle malattie restano a livello di valutazioni fenotipiche. La maggior parte di questi caratteri evidenzia, infatti, un'eredità poligenica e spesso una modesta ereditabilità. Per di più, le misurazioni quantitative riguardanti la salute e la robustezza degli animali sono difficili da condurre in condizioni di produzione (Fig. 21.52).

L'ereditabilità dei caratteri connessi alla rusticità e alla longevità è molto bassa, e l'eredità di tali caratteri è solitamente molto complessa. Misurare la resistenza a malattie contro specifici patogeni richiede un ambiente controllato e una esposizione controllata degli animali a patogeni che potrebbero essere in disaccordo con il benessere animale. Misurazioni di caratteri come la qualità della carne sono difficili da integrare nella catena della macellazione poiché ritardano i tempi di macellazione. In generale, valutare i caratteri importanti per la sostenibilità spesso non è semplice e richiede un notevole impegno finanziario e logistico. Inoltre, i vantaggi economici per il mercato non sono così chiari come per i caratteri classici solitamente valutati durante la selezione come il tasso di crescita, la fertilità, la produzione di carne o di latte.

Tali caratteri sono quelli che dovrebbero essere più studiati seguendo approcci moderni di genomica. La selezione assistita da marcatori appare tanto più vantaggiosa rispetto alla selezione classica quanto più il carattere da migliorare è difficile da misurare oppure quando può essere misurato solo alla fine del ciclo vitale o solo in un sesso, e quando i valori di ereditabilità sono molto bassi.

Recenti studi sui caratteri quantitativi in numerose specie animali hanno dimostrato che i QTL con ampi effetti possono essere identificati anche per alcuni caratteri importanti per le produzioni sostenibili. Alcuni autori hanno riferito su QTL per la qualità della carne di maiale, come l'intensità del colore, il livello di pH post-mortem e le perdite di cottura. Nei suini sono stati mappati con precisione numerosi QTL per la risposta neurocrina, misurando i livelli di cortisolo e di ormone adenocorticotropo (ACTH) nel sangue. Nei bovini sono stati identificati QTL per la presenza di cellule somatiche nel latte, caratteristica che può essere utile come indicatore per la salute della mammella e per la comparsa di mastiti. Nel pollo sono stati usati differenti parametri immunologici per localizzare QTL per la risposta anticorpale al virus della malattia di Newcastle.

I risultati di questi studi dimostrano che l'integrazione delle informazioni ottenute a livello genetico con quelle acquisite a livello fenotipico sono potenzialmente in grado di aiutare ad identificare le mutazioni negative. Le nuove tecniche di analisi dell'espressione di geni e di proteine, oltre ad usufruire di una conoscenza sempre maggiore del genoma umano, potranno agevolare il mappaggio dei geni corrispondenti ed il loro clonaggio posizionale nelle specie di maggiore interesse zootecnico.

Un approccio comparativo è stato considerato per l'identificazione del QTL per la resistenza al tripanosoma, una malattia dei bovini molto diffusa in Africa e trasmessa dalle mosche tse-tse. Attraverso l'analisi della discendenza ottenuta da un incrocio sperimentale condotto tra una specie tollerante, N'dama, ed una specie suscettibile, Zebu, è stato possibile identificare numerosi QTL che contribuiscono a tre differenti indicatori di tolleranza a tale malattia. Parallelamente, i QTL per la resistenza al tripanosoma sono stati testati e verificati nel topo. L'analisi genomica comparativa ha rivelato che solo una regione di omologia tra una delle regioni cromosomiche contenenti i QTL per la tolleranza al tripanosoma identificate nei bovini e una regione del QTL principale identificato nei topi è connessa al tempo di sopravvivenza dopo l'infezione. Questi risultati sottolineano la complessità della resistenza alle malattie e la necessità di mappare le maggiori fonti di variabilità genetica per un carattere nelle specie di interesse. Gli organismi modello possono essere di aiuto in una fase successiva a quella di mappaggio per l'isolamento e la caratterizzazione dei geni candidati, per l'analisi di mutazioni funzionali e per la comprensione dei processi biologici e dei meccanismi molecolari di base.

La sfida resta la comprensione delle basi genetico-molecolari dei principali caratteri fenotipici che possono essere oggetto di selezione, fino al livello fisiologico. L'attuazione della selezione assistita da marcatori molecolari associati a geni rilevanti per le produzioni zootecniche è in via di sviluppo e richiede l'implementazione dei meto-

di di stima dei caratteri quantitativi, per ogni specie in funzione della razza, al fine di raggiungere un mappaggio fine dei QTL e di sfruttare gli approcci di clonaggio posizionale dei geni.

L'avanzamento delle conoscenze di base relativamente al controllo genetico-molecolare dei caratteri più importanti per le produzioni zootecniche aiuterà a comprendere come la selezione potrà realmente modificarsi in futuro con l'applicazione della genomica. Ad esempio, recentemente alcuni ricercatori hanno identificato i QTL per la crescita dei polli, valutato gli effetti additivi e non dei geni ed analizzato anche le interazioni epistatiche tra questi: i risultati ottenuti suggeriscono che il processo di crescita è condizionato da pochi loci. Benché il processo di crescita del suo complesso coinvolga verosimilmente molti geni, i geni che esercitano gli effetti preponderanti sullo sviluppo del tessuto muscolare sono pochi. Le conoscenze genetiche permetteranno anche di valutare le relazioni biologiche e fisiologiche tra i diversi caratteri quantitativi. L'identificazione delle basi molecolari dell'eterosi, degli effetti genetici dovuti alla dominanza, promette di avere ricadute pratiche considerevoli e di aprire nuove prospettive per l'uso dei marcatori molecolari nei programmi di selezione. La selezione diretta a livello genico contribuirà seriamente a sviluppare produzioni animali più salutari e sostenibili. Al momento solo una parte esigua dei geni responsabili dei QTL è conosciuta nelle differenti specie agrarie, includendo organismi sia del regno animale che di quello vegetale. Le caratteristiche dei QTL, le interazioni epistatiche e pleiotropiche, il polimorfismo dei loci ostacolano fortemente l'identificazione dei geni responsabili. Le aspettative sono comunque positive per il futuro poiché sono ormai disponibili infrastrutture adeguate, sviluppi tecnologici e risorse bioinformatiche.

21.7 Genomica e proteomica: il futuro della ricerca sulla nutrizione

Il metabolismo umano è essenzialmente l'espressione di un equilibrio costante tra biosintesi e degradazione delle proteine che funzionano sia come enzimi, recettori, trasportatori, ormoni e altre molecole segnale che come elementi strutturali delle cellule, degli organi e dello scheletro.

Mentre in passato l'attenzione era rivolta verso la manifestazione fenotipica, intesa come risultato finale del metabolismo, misurando le concentrazioni e/o i cambiamenti dei prodotti metabolici, i nuovi strumenti molecolari permettono adesso di studiare ogni passaggio del flusso di informazioni biologiche dal DNA all'mRNA alle proteine, fino alla funzione. Inoltre, è possibile valutare il polimorfismo delle sequenze geniche, il livello di espressione di RNA e proteine. La genomica descrive su larga scala la sequenza nucleotidica del DNA di un organismo e consente di ottenere informazioni strutturali sui geni nonché di valutare il polimorfismo presente nelle regioni codificanti dei geni, mentre la trascrittomica consente di valutare in un campione biologico i livelli di mRNA relativi ad un numero anche consistente di geni contemporaneamente. Infine, la proteomica permette di identificare le proteine sintetizzate in una cellula, in un tessuto o in un organismo nel suo complesso e di studiarne i cambiamenti dei modelli di espressione.

L'analisi del genoma è basata sulle tecnologie di sequenziamento automatizzato del DNA e sulle metodologie di rilevazione di polimorfismi del DNA per lo studio di singoli geni o di interi cromosomi, anche attraverso la costruzione di mappe genetiche. L'analisi del trascrittoma prevede lo sfruttamento di tecniche e di sistemi di rilevazione di messaggeri da tessuti o organi, basati sull'amplificazione o sull'ibridazione degli mRNA (ad esempio, mediante *differential display* o *microarray*).

In **Fig. 21.53** sono riportati alcuni esempi di profili trascrizionali evidenziati con DD-cDNA-AFLP. L'analisi del proteoma richiede l'isolamento delle proteine da un campione biologico, la loro separazione attraverso elettroforesi monodimensionale o bidimensionale in gel di poliacrilammide e la visualizzazione delle proteine mediante coloranti o anticorpi specifici. Sia per i trascritti che per le proteine è possibile valutare in maniera quantitativa o semi-quantitativa i livelli di espressione e risalire alla sequenza nucleotidica di mRNA e a quella amminoacidica di proteine (→ Cap. 17 e 18).

L'applicazione di queste nuove tecniche nel campo delle scienze nutrizionali permetterà di estendere le conoscenze di base sui meccanismi che controllano l'espressione genica relativamente a fattori nutrizionali e di sviluppare biomarcatori utili per lo studio dei regimi nutrizionali e delle loro conseguenze sull'organismo. Inoltre, potrà anche essere valutata la sicurezza degli alimenti o dei loro ingredienti.

21.7.1 Applicazioni tecnologiche speciali di genomica animale

Il principio generale di ogni tecnologia di *array* è l'ibridazione degli oligonucleotidi secondo le regole di appaiamento delle basi azotate. Tale tecnologia prevede una disposizione definita di campioni usando piastre, membrane o vetrini come supporto. Tale disposizione può essere di due tipi: *macroarray* o *microarray*, a seconda che il diametro dello spot del campione di acidi nucleici sia pari a circa 500 µm oppure inferiore a 200 µm. Ogni *array* contiene complessivamente migliaia di spot e può fornire informazioni su migliaia di geni o di trascritti contemporaneamente.

Le due maggiori applicazioni della tecnologia degli *array* di DNA includono l'identificazione di SNP a carico della sequenza di geni e la determinazione del livello di espressione di mRNA (**Fig. 21.54**).

Esistono due varianti della tecnologia di "microdisposizioni" a seconda della natura della sequenza depositata sul supporto solido. In un sistema, un campione numeroso di cDNA di lunghezza compresa tra 500 e 5.000 pb è immobilizzato su un vetrino mediante una procedura robotizzata: l'*array* di cDNA viene ibridato con un set di mRNA di interesse per studiarne i livelli e i modelli di espressione. Nell'altro sistema, un campione numeroso di oligonucleotidi è sintetizzato direttamente su un vetrino a formare una sorta di *chip* di DNA: questo è ibridato con un DNA marcato del campione in esame così da determinare sia l'identità che la quantità delle sequenze complementari.

I recenti sviluppi nel MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry*) hanno reso possibile l'analisi di molecole biologiche, compresi oligonucleotidi e frammenti di DNA, come alternativa alla determinazione della sequenza dei nucleotidi mediante sequenziatori. Lo spettrometro di massa consente, ad esempio, di rilevare singoli oligonucleotidi e frammenti di DNA genomico generati dalla digestione con enzimi di restrizione in base al loro peso molecolare. Per misurare la massa delle molecole, il materiale da saggiare deve essere dissolto e ionizzato. Il sistema più utilizzato per la ionizzazione delle molecole, sia nucleotidi che peptidi e proteine, è quello basato sulla tecnica MALDI che prevede l'incorporazione delle molecole da saggiare in una matrice disidratata per essere in seguito volatilizzate sottovuoto attraverso raggi ultravioletti. Solitamente, tale sistema di ionizzazione di molecole è combinato con un analizzatore di massa di tipo TOF allo scopo di misurare il tempo trascorso dall'accelerazione delle molecole ionizzate al raggiungimento del rivelatore. L'uso del MALDI-TOF-MS permette una elevata velocità di analisi senza la necessità di marcare il DNA. L'applicazione dei più avanzati spettrometri di massa, completamente automatizzati, consente di effettuare un numero elevato di misurazioni e di acquisire un numero elevato di dati.

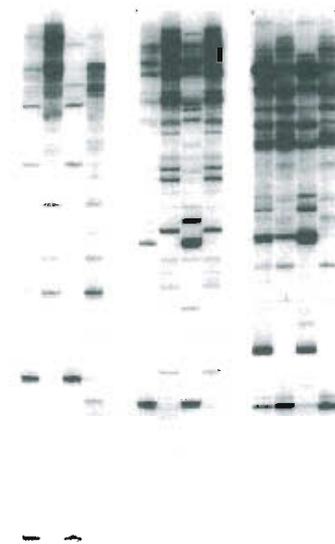


Fig. 21.53 – Profili trascrizionali evidenziati mediante *differential display*: sono visibili numerose bande riconducibili a messaggeri di geni differenzialmente espressi.

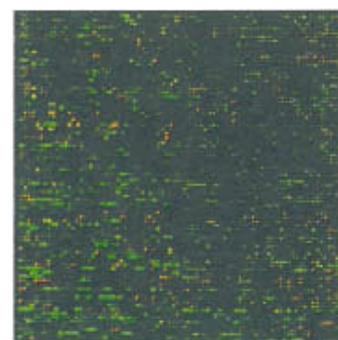


Fig. 21.54 – Risultato di un'analisi di ibridazione di una microdisposizione di cDNA (*microarray*) con una collezione di mRNA.

21.7.2 Applicazioni tecnologiche speciali di proteomica animale

Una procedura semplice e comunemente utilizzata per l'identificazione di una specifica proteina è quella che prevede l'analisi monodimensionale (Fig. 21.55). Tuttavia, l'analisi del proteoma è basata soprattutto sulla separazione delle proteine attraverso la tecnica 2D-PAGE, che è ancora il metodo di separazione delle proteine con la più alta risoluzione disponibile. L'analisi bidimensionale consente di separare le proteine in base al punto isoelettrico nella prima dimensione e al peso molecolare nella seconda dimensione. Tuttavia, non tutte le proteine possono essere risolte e separate in modo appropriato con la tecnica 2D-PAGE. Le proteine di natura alcalina e idrofobiche, le proteine di membrana così come le proteine con alto peso molecolare o quantitativamente poco rappresentate possono spesso costituire un problema ed evidenziare i limiti della tecnica.

La tecnica 2D-PAGE, benché si possa considerare ormai datata, è in realtà quella più standardizzata che permette la visualizzazione di mappe proteiche riproducibili ed affidabili.

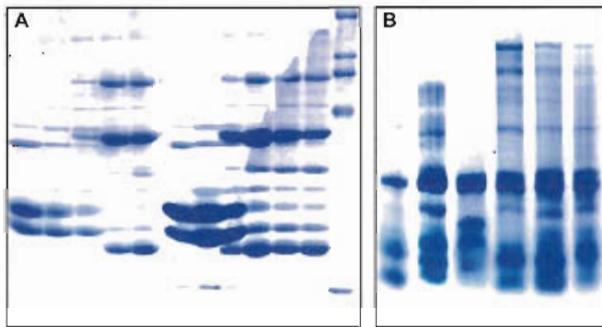


Fig. 21.55 – *Fingerprint* proteici: risultato di analisi 1D-PAGE delle proteine di carne (A) e di pesce (B).

La colorazione delle proteine nel gel è di cruciale importanza per la qualità delle analisi: recentemente, sono stati sviluppati coloranti fluorescenti che migliorano la sensibilità di rilevazione. L'assegnazione dei singoli spot proteici visualizzati sul gel e la comparazione tra i risultati ottenuti su diversi gel sono operazioni effettuate attraverso l'ausilio di appropriati software informatici per l'analisi di immagini (Fig. 21.56).

Quando sono utilizzati campioni di tessuto, questi contengono una popolazione variabile di cellule con differenti profili di espressione, fattore che contribuisce a creare differenze nelle mappe proteiche. Variazioni nel campione biologico rendono le analisi più complesse e possono richiedere una separazione delle popolazioni di cellule differenti per mezzo di marcatori cellulari specifici e tecniche di rilevazione basate sull'impiego di anticorpi specifici.

Per ottenere informazioni sulla struttura primaria di una proteina, la tecnica più rapida e avanzata è quella di *fingerprinting* basata sull'analisi della massa dei peptidi. Le proteine da caratterizzare vengono excise dal gel e sottoposte ad idrolisi attraverso un enzima proteolitico come la tripsina. Lo specifico profilo dei frammenti amminoacidici di una data proteina generati in seguito a tale idrolisi sito-specifica consente spesso di identificare nelle banche dati la proteina in base alle masse dei suoi peptidi. Il miscuglio di peptidi prodotti attraverso la digestione enzimatica è solitamente sottoposto ad un'analisi MALDI-TOF-MS. Lo spettro delle masse prodotto dai peptidi è valutato con programmi informatici usando algoritmi vari che consentono di predire ed identificare la proteina in esame attraverso il confronto con le masse ricavate dalla digestione virtuale della sequenza amminoacidica di una proteina presente nelle banche dati. Qualora la massa di un particolare peptide risulti diversa da quella attesa, basandosi sulla deviazione della misura si può anche predire una specifica modificazione post-traduzionale, come ad esempio la fosforilazione per aggiunta di gruppi fosfato, l'idrolizzazione della lisina, la glicosilazione o la combinazione con acidi grassi. Altre differenze

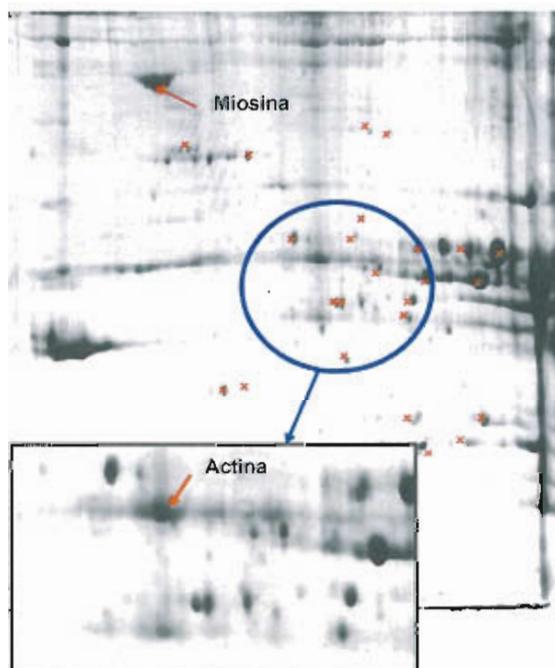


Fig. 21.56 – Mappa proteica della carne di tacchino. Le frecce indicano i complessi della miosina e dell'actina (foto: H. Remignon, ENSAT).

tra le masse predette e quelle misurate possono essere dovute a polimorfismi nelle sequenze codificanti dovuti ad inserzioni o delezioni che determinano sostituzioni di amminoacidi nella catena polipeptidica.

21.7.3 Applicazioni della genomica e della proteomica nelle scienze nutrizionali

Ogni processo nutrizionale dipende dall'interazione tra una moltitudine di proteine codificate da numerosi mRNA di geni espressi in un certo tipo di cellula o organo. Le alterazioni dei livelli di mRNA e delle proteine corrispondenti sono parametri critici per il controllo del flusso di un nutriente attraverso un canale metabolico. Le sostanze nutritive contenute nei cibi possono influenzare l'espressione genica sia direttamente, interferendo con l'apparato di controllo dell'espressione genica, che indirettamente, modificando le condizioni metaboliche indotte che a loro volta condizionano i livelli degli mRNA e/o delle proteine.

L'applicazione della genomica e della proteomica negli studi sulla nutrizione ha il grande potenziale di identificare specifici marcatori (biomarcatori) che corrispondono a un certo fattore nutritivo o prodotto metabolico. Fino a questo momento i biomarcatori delle funzioni cellulari sono stati identificati principalmente seguendo un approccio basato sulla conoscenza del metabolismo. Il nuovo approccio è essenzialmente basato sulla rilevazione di alcune migliaia di indicatori genetico-molecolari di stato metabolico.

L'applicazione di entrambe le tecnologie appare senza limitazioni in termini di soggetti di interesse analizzabili ricorrendo all'uso di colture cellulari o di organismi animali, mentre esistono chiare restrizioni verso l'adozione di tali strumenti sugli essere umani. Questo è dovuto principalmente alla mancanza di cellule disponibili per l'analisi. Tuttavia alcuni tessuti cellulari possono essere ottenuti in quantità sufficienti, come ad esempio tutti i tipi di cellule del sangue, che generalmente rappresentano una fonte interessante di materiale e possono venire usate come cellule *reporter*. Queste cellule hanno differenti cicli vitali, profili di espressione genica e sistemi di controllo, ed inoltre si trovano localizzate in differenti parti del corpo.

Esistono già esempi di applicazione di genomica e proteomica per lo studio della nutrizione. I risultati di uno studio tra quelli di più alto rilievo che dimostrano le potenzialità della genomica nutrizionale sono stati recentemente pubblicati relativamente agli effetti dell'invecchiamento e dell'apporto calorico nei topi. I profili di espressione genica durante il processo di invecchiamento sono stati analizzati nel muscolo scheletrico attraverso l'uso di microarray ad alta densità, rappresentanti complessivamente oltre 6.000 geni. Una delle più importanti conclusioni è che meno dell'1% di questi geni ha mostrato cambiamenti significativi del livello di espressione. A livello molecolare, l'invecchiamento è risultato associato ad una bassa espressione di geni metabolici e biosintetici. La maggior parte delle alterazioni di espressione genica è stata annullata o limitata dalla riduzione di apporto calorico con la dieta, dimostrandosi questo l'unico intervento capace di ritardare l'invecchiamento cellulare nei mammiferi. L'analisi dei profili trascrizionali degli animali alimentati secondo una dieta a bassa energia ha suggerito che la restrizione calorica ritarda il processo di invecchiamento, causando uno spostamento metabolico verso un più veloce turnover proteico ma anche un aumento della gluconeogenesi, cioè della formazione di glucosio a partire da altre sostanze diverse da carboidrati, nonché la soppressione dei fattori di shock termico e dei sistemi di detossificazione.

In futuro, è molto probabile che la genomica e la proteomica aiuteranno a comprendere e caratterizzare i meccanismi metabolici di base degli esseri viventi, non soltanto nell'uomo ma anche negli animali di interesse zootecnico.

21.8 Biotecnologie genetiche in medicina veterinaria

Le biotecnologie possono essere considerate come l'applicazione della conoscenza biologica a qualsiasi livello e rivestono notevole importanza nei programmi di sele-

zione genetica di varie specie animali. Alcune tecnologie, come quelle di ovulazione multipla e trasferimento embrionale (MOET, *Multiple Ovulation and Embryo Transfer*), ed altre tecnologie connesse quali la suddivisione e il sessaggio degli embrioni, la clonazione, l'individuazione di marcatori genetici mediante analisi del DNA, l'isolamento ed il trasferimento di geni per la produzione di animali transgenici, la micromanipolazione ed il congelamento di embrioni e gameti possono favorire il miglioramento genetico degli animali di interesse zootecnico.

21.8.1 Trasferimento, congelamento e micro-manipolazione degli embrioni

Il **trasferimento di embrioni** (*embryo transfer*) viene applicato principalmente nella specie bovina. La sua principale utilizzazione si ha nella selezione quando in una femmina di elevato valore genetico fecondata con un *top sire* viene indotta la superovulazione ottenendo così numerosi embrioni, tutti con elevata predisposizione produttiva, da impiantare su femmine riceventi. In questo contesto operativo, rispetto alle normali situazioni riproduttive, si dà notevole enfasi anche alla linea femminile per quanto concerne il miglioramento genetico. Questa tecnica, inoltre, può essere applicata per ottenere prole da bovine che, pur ovulando normalmente, sono incapaci di portare avanti la gravidanza fino al termine. È stato inoltre riportato che bovine donatrici, sieropositive per la leucosi e la brucellosi, non trasmettono l'infezione agli embrioni durante la fase del pre-impianto.

In questo campo il primo successo venne ottenuto nel coniglio oltre un secolo fa. Negli anni '30 del secolo scorso Warwick e collaboratori conseguirono per primi la nascita di agnelli da trasferimento embrionale omologo. Willet e collaboratori agli inizi degli anni '50 riuscirono ad ottenere vitelli da embrioni trapiantati con metodo chirurgico, mentre i primi tentativi di trapiantare embrioni in modo non chirurgico furono effettuati da Mutter e collaboratori negli anni '60 del secolo scorso. In seguito Sugie, applicando tale metodo, ottenne la nascita di un vitello vivo e vitale. Procedure pratiche per la raccolta di embrioni con metodo incruento furono successivamente descritte da diversi gruppi di ricerca fino a quando nel 1976 Brand e collaboratori misero a punto un metodo non chirurgico per il trasferimento degli embrioni.

Le procedure standard di trasferimento embrionale consistono nel trattamento della donatrice con ormoni ad azione follicolo-stimolante (FSH-P; b-FSH; hMG) che inducono la maturazione e la deiscenza multipla di ovocellule. Tali ovocellule, sette giorni dopo essere state fecondate, vengono raccolte dalla donatrice con metodo non chirurgico e trasferite, per via transcervicale, in bovine riceventi. Il perfezionamento e l'applicazione di altre metodiche, quali il congelamento e la micromanipolazione embrionale hanno ulteriormente favorito il miglioramento genetico dei bovini.

Riguardo al congelamento di cellule ed embrioni, già a metà del secolo scorso erano stati messi a punto sistemi per la crioconservazione di cellule spermatiche umane. Da allora sono stati fatti numerosi passi avanti nelle tecniche di crioconservazione, non solo di cellule ma anche di tessuti ed organi, e perfino di embrioni. Le procedure di crioconservazione prevedono l'esposizione iniziale e l'uso di sostanze crioprotettive, il raffreddamento a temperature inferiori a 0°C, lo stoccaggio, lo scongelamento e infine la diluizione e la rimozione del crioprotettore.

Il **congelamento di embrioni** è particolarmente utile ai fini della loro conservazione e manipolazione, e del loro trasferimento. I principali fattori che influenzano la sopravvivenza di embrioni congelati sono la specie, lo stadio di sviluppo, le sostanze crioprotettrici usate ed il sistema di crioconservazione adottato. I due momenti di potenziale pericolo per la sopravvivenza delle cellule sono la fase di raffreddamento

iniziale fino a basse temperature e quella del ritorno a temperature fisiologiche. Temperature di stoccaggio sufficientemente basse consentono la crioconservazione dell'embrione, anche per periodi prolungati, senza influenze negative sulla sopravvivenza dello stesso. Lo stoccaggio avviene generalmente a -196°C , la temperatura dell'azoto liquido. Ad una temperatura al di sopra di -80°C , le cellule perdono gradualmente la loro vitalità ma al di sotto di -130°C l'energia disponibile è insufficiente per molte reazioni. A queste temperature l'acqua si trova allo stato cristallino e nessuna reazione guidata termicamente avviene in sistemi acquosi.

Il solo pericolo conosciuto per gameti ed embrioni conservati a -196°C consiste nella rottura del DNA causata dalle radiazioni ambientali. È stato calcolato che per danneggiare irreversibilmente il 63% di una popolazione di cellule di mammifero crioconservata a -196°C , sottoposta a radiazioni terrestri di 0,1 rads/anno sarebbero necessari oltre 2.000 anni, mentre per la maggior parte delle cellule di mammifero più sensibili, quale l'ovocellula di topo, questo periodo è di circa 200 anni.

Attualmente, gli embrioni di bovino vengono congelati di routine nei casi di scarsità di riceventi rispetto agli embrioni ottenuti dalle donatrici. Recentemente si è osservato un notevole interesse riguardo alla importazione ed esportazione di embrioni congelati i quali, una volta trapiantati in bovine autoctone, permettono agli individui dopo la nascita di acquisire immunità colostrale che li renderà resistenti nei confronti di malattie diffuse nel luogo, contrariamente a quanto avviene importando animali già scolostrati.

Prima del congelamento gli embrioni di eccellente e buona qualità vengono equilibrati attraverso una serie di passaggi in una soluzione di D-PBS contenente concentrazioni crescenti di un crioprotettore, come il glicerolo o il dimetilsolfossido e successivamente posti in *paillette* di plastica e congelati gradualmente fino a -30°C , impiegando un congelatore biologico programmato. Dopo il congelamento gli embrioni vengono conservati in azoto liquido fino al momento del trasferimento. Una volta selezionate le potenziali bovine riceventi, le *paillette* contenenti gli embrioni vengono scongelate in bagno termostato a 37°C circa per un minuto. Prima del trasferimento è tuttavia necessario rimuovere il crioprotettore, mediante passaggi seriali in D-PBS contenente concentrazioni decrescenti del crioprotettore.

Nel 1982 Leibo ha messo a punto un metodo di congelamento degli embrioni detto "One step" che prevede nella stessa *paillette* il crioprotettore ed il saccarosio quale sostanza idratante l'embrione dopo lo scongelamento. Gli embrioni rimossi dall'azoto liquido, possono essere scongelati e trasferiti direttamente nell'utero della ricevente. Tale metodo è estremamente pratico in quanto non richiede l'impiego di micropipette, piastre sterili e stereomicroscopio per il trasferimento di embrioni congelati-scongelati. Nel complesso, le procedure di scongelamento e di trasferimento non chirurgico sono considerate relativamente semplici.

Altra tecnica per la crioconservazione degli embrioni è la vitrificazione descritta nel 1985 da Rali e collaboratori per embrioni di topo, che riduce al minimo il tempo procedurale ed elimina il bisogno della macchina per il congelamento. Con la vitrificazione, l'aumentata viscosità dei soluti che normalmente si verifica durante la fase di raffreddamento culmina in uno stato vitreo-solido sia all'interno che all'esterno della cellula.

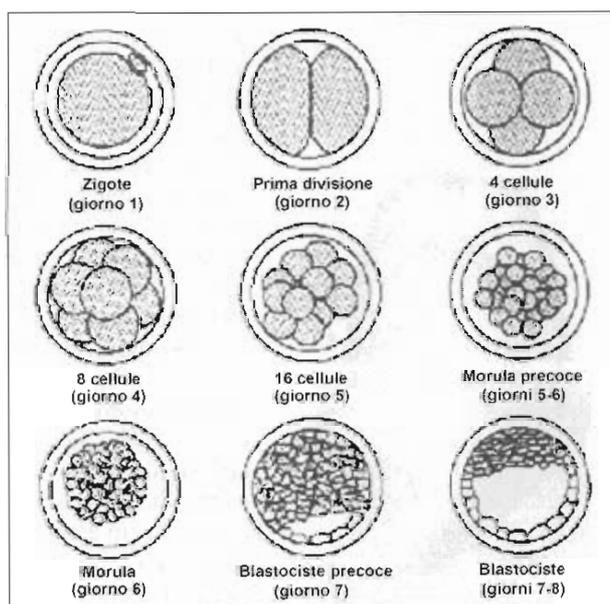


Fig. 21.57 – Rappresentazione schematica delle fasi iniziali di sviluppo dell'embrione nei bovini: dalla fecondazione allo stadio di blastociste (prima settimana); la morula comprende 32 cellule mentre la blastociste precoce 64 cellule.

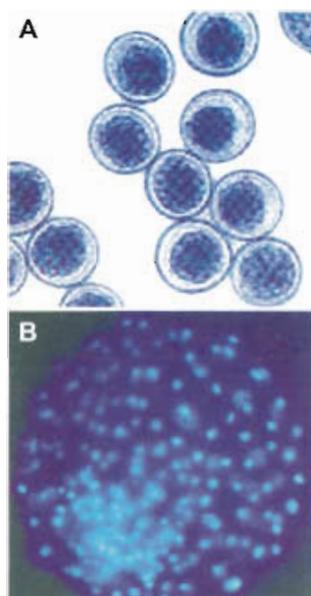


Fig. 21.58 – Embrioni bovini allo stadio di morula (A) e blastociste (B).

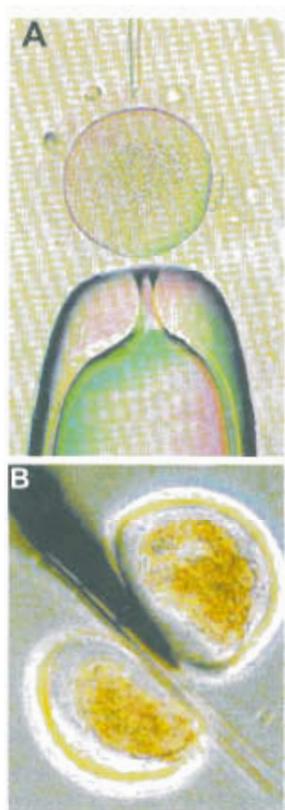


Fig. 21.59 – Micromanipolazione di cellule e embrioni: iniezione con microago (A) e dissezione con microbisturi (B).

I crioprotettori comunemente utilizzati per la vitrificazione sono il dimetilsolfossido, il propilene-glicole, il destrosio e l'acetamide. Generalmente viene preferito il dimetilsolfossido per la sua capacità di favorire la vitrificazione, per la permeabilità e per la bassa tossicità. Bisogna tuttavia ricordare che la tossicità dei crioprotettori, in generale, è strettamente correlata alla loro concentrazione e può essere notevolmente ridotta abbassando la temperatura nella fase di equilibratura e riducendo il tempo di esposizione dell'embrione al crioprotettore prima di procedere alla vitrificazione.

Per ottenere buoni risultati, indipendentemente dal metodo impiegato, è tuttavia necessario selezionare gli embrioni da destinare al congelamento. Infatti i dati disponibili indicano una stretta correlazione tra la qualità dell'embrione dopo lo scongelamento e le percentuali di impianto. Anche l'età dell'embrione influenzerebbe la capacità di sopravvivenza al congelamento e scongelamento: le morule precoci sopravvivono bene al ciclo di congelamento-scongelamento contrariamente alle blastociste tardive (Fig. 21.57). La zona pellucida di blastocisti espanse frequentemente si rompe durante il processo di congelamento. Tali embrioni così "denudati" presentano percentuali di gravidanza più basse e ciò potrebbe essere dovuto ai danni a carico dell'embrione determinati dalla rottura della zona pellucida al momento del congelamento.

Un'altra possibilità è offerta dal congelamento delle ovocellule. La disponibilità di ovocellule derivanti da ovaie prelevate al mattatoio immediatamente dopo l'abbattimento degli animali, ha portato a notevoli progressi nello sviluppo di tecniche per la maturazione, la fecondazione, la coltivazione e lo sviluppo *in vitro* degli embrioni. Tuttavia il periodo di sopravvivenza in coltura delle ovocellule di mammifero è un fattore che ostacola la messa a punto di numerose metodologie. Questa limitazione potrebbe essere ovviata mediante la crioconservazione di ovocellule, così come viene attualmente praticata per gli embrioni di molte specie animali. Il germoplasma di femmine con patrimonio genetico di elevato valore, compresi individui transgenici o appartenenti a specie in via di estinzione, potrebbe essere salvaguardato anche dopo la perdita della fertilità o la morte dell'animale. Tuttavia è generalmente riconosciuto che le capacità di sviluppo di ovocellule congelate è estremamente limitata. A tale proposito sono stati effettuati molti tentativi in diverse specie animali, compresa quella bovina, ma fino ad oggi solo nel topo, nel coniglio e nell'uomo si è ottenuta la nascita di soggetti vivi e vitali derivanti da ovocellule congelate-scongelate e fecondate *in vitro*. Gli insuccessi sono dovuti per lo più alla estrema sensibilità delle ovocellule alle procedure fino ad oggi utilizzate per il loro congelamento che presentano soltanto piccole modifiche rispetto a quelle seguite per il congelamento degli embrioni.

Gli embrioni a stadi precoci di sviluppo di numerose specie animali (Fig. 21.58), possono essere micromanipolati per ottenere demi-embriani, singoli blastomeri e per trasferire DNA esogeno (geni, pronuclei, nuclei, ecc.). La **micromanipolazione degli embrioni** prevede l'uso di un'appropriata strumentazione e di personale tecnico altamente specializzato. Bisogna disporre di uno stereomicroscopio o di un microscopio rovesciato, di due micromanipolatori dotati di movimento a trasmissione meccanica o elettronica, e di micropipette, microlame e microaghi. Per la micromanipolazione, l'embrione, posto in una piastra Petri contenente terreno di coltura, viene tenuto in posizione mediante una pipetta *holding* collegata ad uno dei due micromanipolatori, mentre la bisezione o la iniezione di DNA viene praticata utilizzando un microbisturi o un microago collegato all'altro micromanipolatore (Fig. 21.59). L'iniezione di DNA esogeno in singole cellule viene impiegata per creare animali transgenici, mentre la produzione di demi-embriani consente di ottenere gravidanze multiple. Più in particolare, la micromanipolazione mediante microiniezione è sfruttata per il trasferimento di sequenze geniche o interi nuclei all'interno di ovocellule non fecondate o di

singoli blastomeri. La micromanipolazione mediante dissezione è, invece, utilizzata per l'ottenimento di gemelli identici, triplette, quadruplette a partire da un singolo embrione, grazie alla totipotenza delle cellule embrionali non differenziate. Nel 1979 sono stati ottenuti per la prima volta due agnelli geneticamente identici ricorrendo alla tecnica cosiddetta di *embryo splitting* (Fig. 21.60).

Il trasferimento di metà embrione di classe eccellente o buona fornisce percentuali di gestazione simili a quelle ottenibili con embrioni della stessa qualità non micromanipolati. Quando embrioni di bovino di scarsa qualità sono stati impiegati per produrre demi-embrioni da trasferire si rilevava una notevole riduzione nella capacità di sopravvivenza se comparata con quella di demi-embrioni di qualità eccellente e buona. Migliori percentuali di gravidanza sono state ottenute quando coppie di demi-embrioni, piuttosto che un singolo demi-embrione, venivano trasferite nella ricevente. Le percentuali di gestazioni sono risultate simili quando le coppie di demi-embrioni venivano trasferite nello stesso corno uterino o una metà in un corno e l'altra metà nell'altro.

Il vantaggio derivante dalla suddivisione dell'embrione è quella di ottenere un numero maggiore di prole da una singola femmina. Inoltre una metà dell'embrione manipolato potrebbe essere trapiantata direttamente, mentre l'altra potrebbe essere congelata e impiegata successivamente. La micromanipolazione degli embrioni può offrire numerose opportunità per approfondire gli studi sulla progenie, per valutare caratteri recessivi indesiderati e per studiare le correlazioni materno-fetali.

La micromanipolazione è stata inoltre applicata a tecniche volte alla determinazione del sesso degli embrioni prima del trapianto. Le procedure per l'identificazione del sesso degli embrioni bovini che prevedono l'utilizzazione di blastomeri ottenuti mediante microchirurgia includono l'analisi citogenetica e l'individuazione di sequenze di DNA specifiche del cromosoma Y mediante il ricorso a marcatori molecolari PCR-derivati.

21.8.2 Sessaggio degli embrioni

La predeterminazione del sesso della prole ha un'influenza diretta non solo sull'intensità della risposta e sull'efficacia del programma di selezione, ma anche indiretta attraverso la modificazione dei sistemi di produzione animale. Sono stati proposti diversi metodi per prevedere il sesso del nascituro, però non tutti sono utilizzabili ed applicabili a livello commerciale. Per quanto concerne le tecniche usate per la determinazione precoce o la predeterminazione del sesso operando sui gameti, sono opportune alcune considerazioni. Dato che nei mammiferi lo spermatozoo è il responsabile del sesso della prole e data la facilità con la quale lo sperma può essere raccolto, il sessaggio di questo rappresenterebbe il metodo più vantaggioso per la determinazione del sesso della prole. Tuttavia i risultati fino ad oggi ottenuti non sono indicativi in quanto non hanno dato, al momento, una risposta costante.

La tecnica del **sessaggio degli embrioni** si basa sulla differenza cromosomica che esiste fra embrioni dei due sessi, in relazione alla presenza o assenza del cromosoma Y: gli embrioni di sesso maschile sono portatori di entrambi i cromosomi sessuali XY mentre gli embrioni di sesso femminile sono di tipo XX. Per evidenziare questa differenza si ricorre alla biopsia, cioè all'asportazione di alcune cellule dell'embrione utilizzando una microlama, in modo da ottenere un campione di DNA da sottoporre ad analisi.

Attualmente, le tecniche impiegate sono basate sulla determinazione del sesso degli embrioni a stadi precoci di sviluppo. A tal fine varie tecniche sono state svilup-



Fig. 21.60 – Clonazione via *embryo splitting* in pecora: due agnelli gemelli insieme alla madre nella quale erano stati impiantati i demi-embrioni. Fonte: University of Davis, CA (USA).

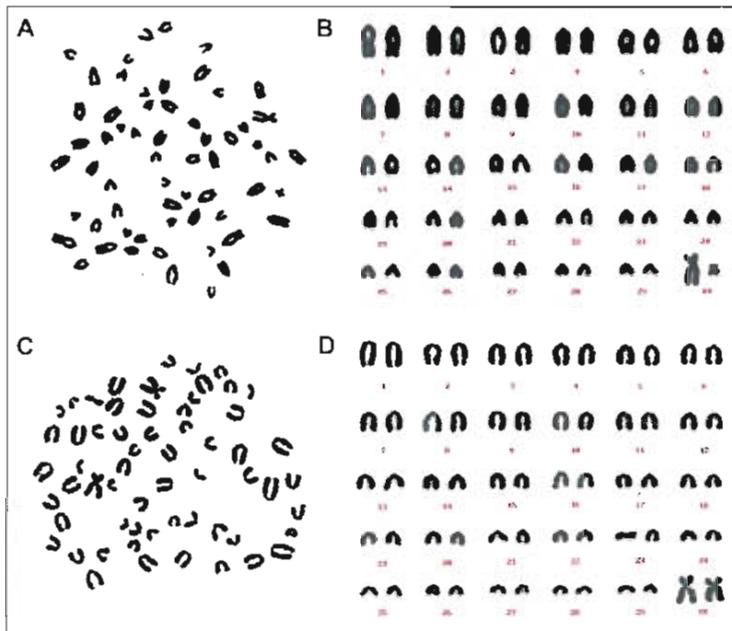


Fig. 21.61 – Piastre di cromosomi metafasici e relativi cariogrammi di bovini di sesso maschile ($2n=60, XY$) e femminile ($2n=60, XX$) (foto: L. Molteni e A. De Giovanni).

glicoproteico a livello di membrana cellulare, individuabile per mezzo di uno specifico anticorpo. La tecnica risulta piuttosto rapida e sufficientemente affidabile per il sessaggio degli embrioni. Le tecniche basate sulla valutazione dell'attività enzimatica legata al cromosoma X sono state, invece, abbandonate quasi del tutto per la modesta attendibilità dei risultati o per l'eccessiva laboriosità dei protocolli.

L'identificazione di sequenze DNA specifiche del cromosoma Y in diverse specie animali, compresa quella bovina, ha radicalmente cambiato le tecniche di sessaggio. Attualmente la tecnica PCR rappresenta senza dubbio la procedura più rapida e precisa per la determinazione del sesso di embrioni a stadi precoci di sviluppo.



Fig. 21.62 – Sessaggio degli embrioni: (A) micromanipolazione di embrione; (B) risultato di analisi PCR: la presenza (maschio) o l'assenza (femmina) del prodotto di amplificazione specifico del cromosoma Y permette di stabilire il sesso dell'embrione.

Il DNA isolato da porzioni di embrioni prelevate ricorrendo a biopsie viene analizzato mediante PCR usando una coppia di primer specifici per una sequenza nucleotidica del cromosoma Y. Tale tecnica consente di evidenziare la presenza o l'assenza del cromosoma maschile e quindi stabilire il sesso dell'embrione. Insieme al segnale relativo al prodotto di amplificazione riconducibile ad una sequenza del cromosoma Y, solitamente si analizza anche una sequenza conservata in modo da ottenere un segnale di controllo per tutti i campioni saggiati, indipendentemente dal sesso. I prodotti di amplificazione ottenuti possono essere visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio (Fig. 21.62). L'interpretazione del risultato è molto semplice: la presenza di una sola banda indica che la biopsia è stata effettuata da un embrione di sesso femminile mentre la presenza di due bande indica che la biopsia è stata condotta in un

embrione di sesso maschile. La diagnosi del sesso è accurata al 97% ed è importante notare che gli embrioni sessati possono essere congelati esattamente come quelli non sessati. Bisogna altresì rilevare che dopo l'asportazione di cellule mediante biopsia la maggior parte degli embrioni evidenzia una crescita normale benché le percentuali di gestazione sembrano essere più basse di quelle ottenibili da embrioni non manipolati.

I vantaggi delle tecniche di sessaggio degli embrioni basate sulla PCR sono rappresentati da rapidità, affidabilità e facilità di esecuzione. Il sesso dell'embrione può infatti essere determinato in poche ore impiegando un singolo blastomero e con possibilità di errore molto bassa.

pate ed applicate negli ultimi anni. Tra queste è possibile annoverare la caratterizzazione cariológica basata sul numero e sulla morfologia dei cromosomi, l'identificazione dell'antigene minore di istocompatibilità H-Y e la valutazione dell'attività enzimatica legata al cromosoma X.

Una delle prime tecniche applicate è stata l'analisi citogenetica che prevede l'individuazione dei cromosomi sessuali, generalmente distinguibili dagli autosomi allo stadio di pro-metafase. Benché piuttosto laboriosa, uno dei principali vantaggi connessi all'analisi citogenetica è quello che la tecnica permette anche di svelare anomalie del numero (mutazioni genomiche) e della struttura (mutazioni cromosomiche) dei cromosomi (Fig. 21.61).

Un'altra tecnica per il sessaggio degli embrioni si basa sull'individuazione dell'antigene di istocompatibilità H-Y prodotto da un gene localizzato nel cromosoma Y. Tutte le cellule di mammifero di sesso maschile presentano tale antigene

Quadro 21.4 – Embriogenesi umana e cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule non ancora differenziate, o non specializzate, che essendo totipotenti possono essere coltivate *in vitro* al fine produrre cellule di qualsiasi tipo o tessuto. Il primo successo fu ottenuto dal gruppo guidato da James Thomson, dell'Università del Wisconsin, USA, che riuscì ad isolare ed allevare in coltura cellule staminali pluripotenti prelevate da embrioni umani, notizia resa nota alla comunità scientifica nel novembre del 1998. Strettamente correlata alla ricerca sulle cellule staminali è la questione della clonazione. Innanzitutto è opportuno distinguere la clonazione riproduttiva dalla clonazione terapeutica: la prima ha come obiettivo l'ottenimento di un individuo con un patrimonio genetico identico a quello di un altro individuo, mentre la seconda ha come obiettivo l'ottenimento di cellule specializzate idonee per riparare o sostituire *in vivo* quelle danneggiate da lesioni così come quelle morte in seguito ad una malattia. Le biotecnologie applicate alle cellule staminali offrono la prospettiva di curare le malattie degenerative e, più in generale, tutte le patologie che causano danni non guaribili degli organi e dei tessuti.

Le cellule staminali possono essere coltivate *in vitro* nei laboratori per essere innestate *in vivo* in diversi tipi di tessuto, come nel cuore, nel cervello o nel fegato. Esistono diversi tipi di cellule staminali. Una classificazione generale prevede quattro tipi di cellule staminali: i) fetali, quando sono ricavate da aborti; il loro impiego in medicina equivale all'uso di organi espianati da cadaveri; ii) embrionali, provengono dalle cellule indifferenziate presenti nella regione interna dell'embrione (a meno di 14 giorni dalla fecondazione); l'isolamento di tali cellule richiede la soppressione dell'embrione; iii) cordonali, quando derivano dal cordone ombelicale; iv) adulte, sono cellule presenti nei tessuti e negli organi sviluppati (cellule cerebrali, ossee, cardiache, muscolari, epidermiche, ecc.); provvedono al mantenimento dei tessuti e alla loro eventuale riparazione, ma le loro potenzialità sono ridotte e vengono a mancare quando i tessuti e gli organi sono colpiti da patologie. Per le cellule staminali adulte esistono dati consolidati derivanti da applicazioni ampiamente sperimentate. Questo tipo di cellule staminali ha permesso la cura di malattie tumorali del sangue (leucemie), infarti e ustioni. In particolare, le cellule staminali provenienti dal midollo osseo hanno permesso di riparare tessuti cardiaci, mentre quelle dell'epidermide possono produrre i precursori delle cellule nervose dimostratisi adatti al trattamento di malattie neurodegenerative. Tra le potenziali applicazioni delle cellule staminali embrionali si possono citare la cura del diabete, di lesioni di cellule cerebrali (morbo di Parkinson e di Alzheimer), patologie cardiache, artriti, osteoporosi e fratture ossee, ecc.

In un futuro prossimo, la ricerca sulle cellule staminali potrà rivoluzionare il modo di curare tante altre malattie mortali come l'ictus, il diabete, le malattie cardiache compreso l'infarto e, addirittura, le paralisi. La possibilità di controllare lo spettacolare potere delle cellule staminali embrionali, allo scopo di curare vari tipi di malattie, entusiasma gli studiosi. Per esempio, il morbo di Parkinson e l'Alzheimer sono il risultato di lesioni in gruppi determinati di cellule cerebrali. Con la realizzazione di un trapianto di cellule staminali derivate da un embrione alla parte del cervello colpita, gli scienziati sperano di sostituire la parte di tessuto cerebrale danneggiata.

Gli atteggiamenti verso l'uso di cellule staminali a fini di ricerca o di cure mediche variano da uno Stato all'altro. In Italia e in Ger-

mania, per esempio, l'estrazione di cellule staminali da un embrione umano è considerata illegale. In Gran Bretagna, invece, è perfettamente legale, ma le leggi in materia sono rigorose: gli scienziati britannici possono utilizzare embrioni umani a fini di ricerca fino a quattordici giorni dopo la fecondazione dell'ovulo (Fig. 21.63). In questo momento, l'embrione è un insieme di cellule, grande più o meno come un quarto della testa di uno spillo (0,2 mm). In molti Paesi non esistono ancora leggi esplicite atte a disciplinare la ricerca sulle cellule staminali umane. Essendo l'utilizzo di embrioni una questione di grande controversia in termini etici, gli scienziati di tutto il mondo cercano altre fonti di cellule staminali. Il tipo di cellule staminali che si trova nel midollo osseo degli adulti sembra essere una possibilità. Queste cellule staminali sono potenzialmente già capaci di differenziarsi in una gran varietà di globuli rossi nell'arco del ciclo vitale. In futuro, gli scienziati sperano di manipolare queste cellule staminali adulte affinché, invece di produrre soltanto globuli rossi, possano dare origine a cellule cerebrali, epatiche, cardiache e nervose. Nonostante tutto, è probabile che le cellule staminali embrionali rappresentino, nel frattempo, una prospettiva più immediata per nuovi trattamenti e cure.

Molti studiosi pensano che, una volta moltiplicate e capaci di differenziarsi in tutte le cellule e in tutti i tessuti dell'organismo, le cellule staminali embrionali potrebbero essere utili nella cura di alcune malattie. Tuttavia, per poterle ricavare, gli embrioni non devono avere più di cinque giorni. Per evitare le barriere etiche e politiche in fatto di cellule staminali embrionali, gli scienziati stanno cercando fonti alternative. Una fonte di cellule staminali potrebbe essere il midollo osseo di un adulto. Le cellule staminali del midollo osseo degli adulti producono normalmente globuli rossi e cellule del midollo osseo. Fino a poco tempo fa,

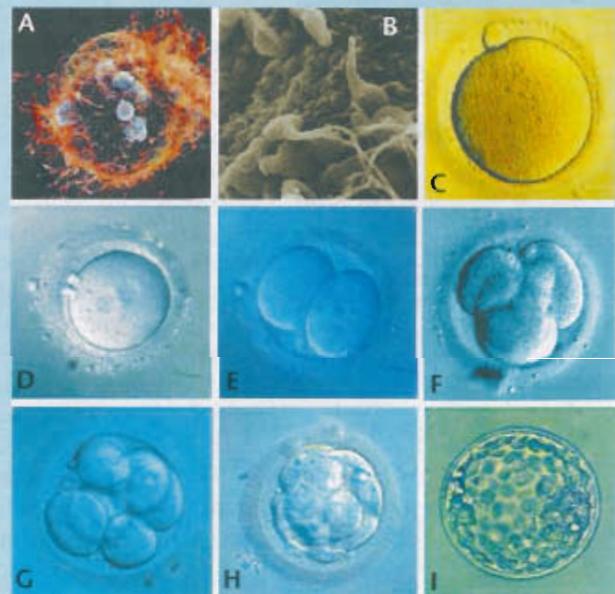


Fig. 21.63 – Fecondazione e fasi iniziali di sviluppo dello zigote nell'uomo: (A, B) spermatozoi sulla superficie della cellula uovo; (C) nucleo spermatico al momento della fecondazione della cellula uovo; (D) zigote; (E-G) embrione allo stadio di due, quattro e otto cellule; (H) morula; (I) blastociste.

gli scienziati pensavano che fosse impossibile che le cellule del midollo osseo potessero "tornare indietro nel tempo", potendo quindi riprogrammarsi per dare origine a tipi di cellule completamente differenti come quelle cerebrali, nervose, intestinali o epiteliali. Tuttavia, alcuni medici statunitensi hanno identificato, di recente, cellule staminali provenienti dal midollo osseo di un adulto, in grado di svilupparsi in un altro tipo di cellula. Il prelievo di cellule staminali adulte da un individuo consenziente non solo sarebbe eticamente accettabile dalla maggior parte delle persone e dei governi, ma migliorerebbe anche la vita di molti pazienti. Nel caso, ad esempio, di una malattia che sta distruggendo le cellule del cervello, le cellule staminali potrebbero essere estratte dal midollo osseo del paziente, ed essere successivamente manipolate in laboratorio affinché diventino cellule cerebrali e possano essere trapiantate nel cervello, evitando così il rigetto dovuto al trapianto. Se tutto ciò dovesse funzionare, si tratterebbe di una prospettiva fantastica. I primi risultati sembrano promettenti, ma gli scienziati non conoscono l'esatta versatilità delle cellule staminali del midollo osseo. In ogni caso, visti i risultati, gli studiosi sono molto ottimisti. Finalmente, vari tipi di cellule staminali potrebbero essere la miglior cura per innumere-

voli malattie e per questo la maggior parte degli scienziati sceglierebbe di continuare la ricerca su entrambi i tipi di cellula. L'ultima fonte possibile di cellule staminali è il sangue, normalmente eliminato durante il parto, proveniente dal cordone ombelicale. Le imprese si offrono già da ora per raccogliere il sangue della placenta e conservarlo, a pagamento, nell'eventualità in cui il bambino si ammali. Queste imprese sostengono che le cellule staminali così raccolte potranno essere utilizzate per curare problemi sanguigni, come la leucemia e alcuni disturbi genetici e immunitari. In futuro, il sangue del cordone ombelicale potrà rappresentare una fonte di cellule staminali importantissima per curare le lesioni vascolari o cerebrali, il diabete, le disfunzioni nervose e la distrofia muscolare. La particolarità della raccolta di queste cellule staminali è quella di poterle prelevare senza toccare né la madre né il bambino. Sono inoltre compatibili con il neonato nel caso in cui sviluppi una certa malattia o abbia bisogno di cellule staminali. Inoltre, queste imprese ritengono che il sangue del cordone ombelicale possa anche essere utile come fonte di cellule staminali per i familiari (fratelli, sorelle, genitori e nonni).

21.9 Biotecnologie genetiche applicate alla produzione di animali transgenici e alla clonazione

L'ingegneria genetica e le biotecnologie sono state applicate anche agli animali allo scopo di trasferire geni eterologhi nelle cellule uovo fecondate o nelle cellule embrionali per ottenere così individui transgenici.



Fig. 21.64 – Geep, chimera interspecifica ottenuta combinando embrioni di capra e pecora (foto: G.B. Anderson).

Negli anni settanta del secolo scorso R.L. Brinster produsse il primo topo di laboratorio modificato geneticamente, combinando insieme due embrioni di ceppi diversi e riuscendo ad ottenere un singolo embrione che sviluppandosi in un adulto chimerico esibiva le caratteristiche di entrambi i ceppi. Una chimera è un organismo formato da cellule derivate da due differenti individui. Il primo organismo chimerico interspecifico venne prodotto qualche anno più tardi tra pecora e capra, portando ad ottenere un individuo detto *geep* (*goat-sheep*) che esprimeva a livello del mantello chiazze caratteristiche dell'una o dell'altra specie (Fig. 21.64). Un organismo di questo tipo riunisce insieme il patrimonio genetico delle due specie di origine. Sostanzialmente diverso è, invece, il concetto di organismo transgenico: in questo caso il patrimonio genetico di una specie viene arricchito di uno o pochi geni provenienti dalla stessa specie oppure da una specie diversa, anche molto distante in termini evolutivi.

La definizione di animale transgenico si è evoluta seguendo il cambiamento delle tecniche di trasferimento genico. In linea generale, il termine fa riferimento ad un animale in cui è stata indotta una specifica modificazione del suo genoma. Nel 1997 John A. Beardmore con "transgenici" ha definito le cellule o gli organismi contenenti sequenze di DNA esogeno nel loro patrimonio genetico, trasferite utilizzando tecniche di ingegneria genetica ivi incluse quelle di trasferimento e di silenziamento di geni.

Un qualsiasi gene clonato in un vettore adatto può integrarsi in uno o più dei cromosomi e aggiungersi (addizione genica) o sostituirsi (sostituzione genica) ad un gene esistente così da trasmettersi stabilmente di generazione in generazione (Fig. 21.65). Quando il gene clonato è acquisito in un sito casuale di un cromosoma si parla di ricombinazione eterologa ed il processo implica una addizione genica. È questo il caso degli animali transgenici per geni esogeni isolati da una specie diversa da quella trasformata in grado pertanto di esprimere una nuova caratteristica (*gain of function*).

Quando, invece, il gene clonato è integrato in un sito specifico di un cromosoma al posto del gene normale si parla di ricombinazione omologa ed il processo comporta una sostituzione genica. In questo caso gli animali sono transgenici per geni mutanti provenienti dalla stessa specie e risultano quindi incapaci di esprimere una caratteristica tipica (*loss of function*). In linea di principio, i guadagni di funzione sono perseguiti soprattutto negli animali da allevamento al fine di migliorare le produzioni zootecniche, mentre le perdite di funzione sono utili negli animali da laboratorio per studiare particolari patologie mediche. Negli eucarioti più complessi, con genomi molto grandi, il trasferimento di geni clonati nelle cellule tende a produrre una addizione genica anziché una sostituzione genica. A titolo di esempio, quando si trasforma una cellula murina con un gene mutante, i processi di ricombinazione omologa si verificano solo nello 0,1% dei casi.

Riguardo alle tecniche di trasformazione, la microiniezione di DNA esogeno nel nucleo di cellule uovo fecondate di topo fu il primo successo nei mammiferi, ottenuto nel 1980 ad opera di J.W. Gordon e F.H. Ruddle. Due anni più tardi vennero prodotti topi giganti attraverso il trasferimento del gene di ratto codificante l'ormone della crescita combinato con il promotore del gene di topo per la metallotioneina (Fig. 21.66). Da allora la tecnica è stata applicata con successo in altri animali, come ad esempio ratti, suini, ovini, conigli, uccelli e pesci. In seguito vennero messe a punto altre due tecniche di transgenesi, quella descritta nel 1986 da A. Gossler e collaboratori, che fa ricorso alla trasfezione di cellule staminali, ed un'altra ancora proposta nel 1996 da R. Jaenisch basata sull'utilizzazione di vettori retrovirali.

L'ottenimento di **mammiferi transgenici**, corredati di caratteri nuovi che non avrebbero mai potuto acquisire con le tecniche naturali, può essere raggiunto trasferendo speciali vettori plasmidici in cellule uovo fecondate oppure in embrioni costituiti da poche cellule. I metodi attualmente utilizzabili per il trasferimento genico negli animali prevedono: i) l'integrazione di geni in embrioni ad uno stadio molto precoce per mezzo di retrovirus; ii) la microiniezione di DNA esogeno nel nucleo spermatico di una cellula uovo appena fecondata; iii) il trasferimento di nuclei geneticamente modificati in cellule uovo private del materiale nucleare; iv) l'incorporazione nell'embrione, ad uno stadio di sviluppo molto precoce, di cellule staminali geneticamente modificate; v) il trasferimento di geni mediato da spermatozoi.

L'ottenimento di animali transgenici mediante retrovirus, difettivi ai fini della loro replicazione, prevede l'impiego di questi come vettori per trasportare ed integrare geni esogeni in embrioni in divisione infettati ad uno stadio molto precoce, solitamente allo stadio di otto cellule. Tale metodo, messo a punto nei topi di laboratorio, non ha ancora trovato applicazione per la produzione di altri tipi di animali transgenici poiché a volte possono riscontrarsi inconvenienti dovuti a contaminazioni retrovirali conseguenti alla integrazione nel DNA cromosomico della cellula infettata di copie di DNA formate dal retrovirus stesso. I vettori retrovirali trovano applicazione soprattutto nella terapia genica nell'uomo quando il rapporto rischi/benefici è a favore di questi ultimi.

Il metodo basato sulla microiniezione di DNA consente di inserire il gene esogeno direttamente nel nucleo spermatico ingrandito (pronucleo) di una cellula uovo appena fecondata (Fig. 21.67). In questo caso sono necessarie femmine donatrici superovulate che dopo essersi accoppiate debbono essere sacrificate al fine di prelevarne le cellule uovo fecondate. Il gene può quindi essere integrato nel genoma dello zigote che, opportunamente trapiantato in una femmina ricevente, potrà svilupparsi fino alla nascita di uno o più animali transgenici. Una parte della progenie ottenuta dalle cellule uovo impiantate presenterà il gene esogeno in tutte le proprie cellule. Poiché l'integrazione del transgene avviene solitamente in singola copia, determinando una condizione emizigotica, sarà necessario incrociare gli animali transgenici tra loro allo scopo di selezionare nella discendenza quelli che presentano il transgene su entrambi i cromo-

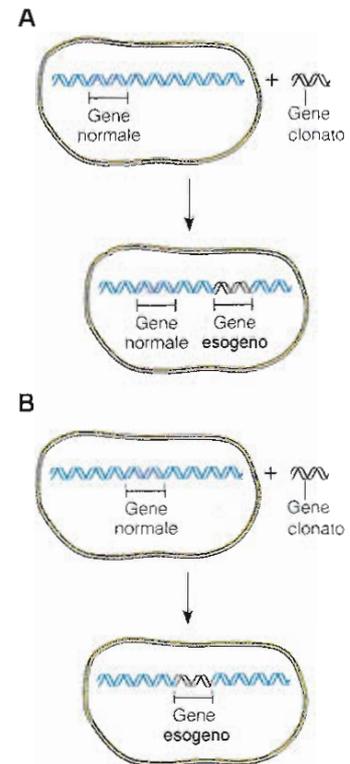


Fig. 21.65 – Integrazione di un gene esogeno in un cromosoma per: (A) ricombinazione eterologa (addizione genica) e (B) ricombinazione omologa (sostituzione genica). Modificato da: R. J. Brooker (2000).



Fig. 21.66 – Topo normale di 29 g insieme col fratello transgenico per l'ormone della crescita di 44 g di peso (foto: R.L. Brinster).

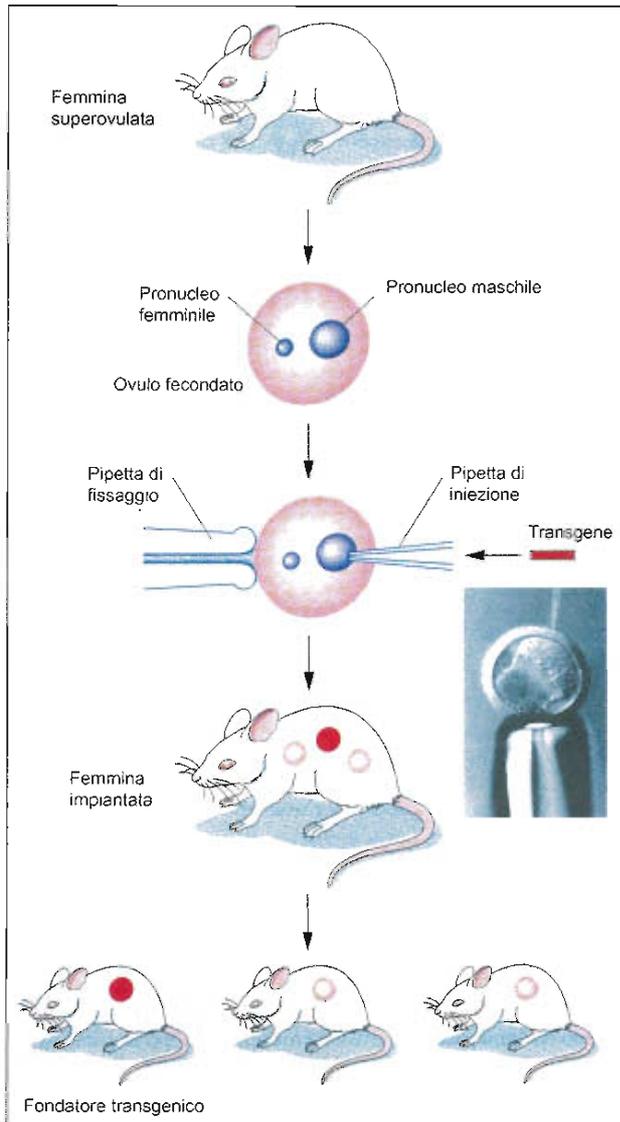


Fig. 21.67 – Schema per la produzione di animali transgenici. Modificato da: B.R. Glick e J.J. Pasternak (1998).

somi omologhi. Tali animali sono in grado di trasmettere il transgene a tutte le cellule della linea germinale.

Il metodo di trasferimento di nuclei geneticamente modificati in cellule uovo private del proprio nucleo prevede una successione di fasi. Inizialmente, l'ovocita di un animale è privato del suo nucleo e, parallelamente, cellule epiteliali provenienti dallo stesso animale vengono messe in coltura e speciali vettori plasmidici sono iniettati nel loro nucleo. Il nucleo di queste cellule viene inserito nella zona pellucida, corrispondente all'involucro esterno dell'ovulo, a contatto con l'ovocita, e la fusione avviene grazie ad un impulso elettrico: il prodotto di fusione così ottenuto è coltivato *in vitro* e poi trasferito mediante *embryo transfer* in una femmina ricevente. Gli animali che nasceranno saranno cloni dell'animale a cui appartenevano le cellule epiteliali utilizzate, ma presenteranno anche il transgene.

La tecnica basata sul trapianto nucleare è sostanzialmente quella applicata nel 1997 dal gruppo di Ian Wilmut del *Roslin Institute* di Edimburgo (Scozia) per la clonazione della famosa pecora *Dolly*. In questo caso specifico vennero impiegati nuclei in fase di quiescenza (G_0) di cellule epiteliali di ghiandola mammaria in coltura per la fusione con cellule uovo provenienti da un'altra pecora di razza diversa e preventivamente private del nucleo (Fig. 21.68). Dopo la fusione, la cellula somatica rinucleata fu allevata *in vitro* fino allo stadio embrionale, quindi venne impiantata nella madre adottiva. Tale esperimento ha dimostrato, per la prima volta, la possibilità di ottenere individui completi partendo da cellule somatiche in coltura, vale a dire la totipotenza del nucleo di una cellula di individuo adulto differenziata, aprendo pertanto nuove prospettive per produrre animali geneticamente modificati e per la loro clonazione. L'ottenimento di cloni transgenici prevede il trasferimento dei geni esogeni nelle cellule somatiche in coltura anziché nelle cellule uovo fecondate o nelle cellule embrionali. I nuclei prelevati dalle cellule donatrici geneticamente modificate possono essere inseriti nelle cellule riceventi enucleate in modo che il gene

esogeno possa trasmettersi alla discendenza ed esprimersi in ogni suo componente.

Il metodo di incorporazione nell'embrione di cellule staminali è quello che attualmente suscita maggiore interesse. Le cellule di un embrione allo stadio di blastocisti che possono proliferare in coltura, conservando l'attitudine a differenziarsi in tutti gli altri tipi di cellule, comprese quelle della linea germinale, possono essere reintrodotte per microiniezione in un altro embrione allo stesso stadio. Dato che in coltura le cellule staminali possono essere modificate geneticamente senza alterarne la totipotenza, è possibile integrare un transgene funzionale in un sito specifico nell'ambito del loro genoma e rigenerare animali transgenici impiantando la blastocisti selezionata nella madre adottiva. I vantaggi di questo metodo sono enormi poiché basandosi sugli eventi di ricombinazione omologa esso rende possibile l'integrazione di un dato gene in qualunque punto desiderato del genoma, la distruzione mirata di un gene (*knock out* genico) o la sua sostituzione con un altro gene o con il suo corrispondente modificato (terapia genica) per curare una malattia. Bisogna tuttavia constatare che l'animale transgenico ottenuto dalla blastocisti è in realtà un mosaico per quanto riguarda il

gene introdotto o sostituito, nel senso che solo una parte delle cellule staminali sono state inizialmente modificate. Poiché le cellule prodotte attraverso successive divisioni a partire da quelle modificate saranno distribuite nei vari tessuti e organi dell'animale adulto, non tutti gli animali transgenici di prima generazione esprimeranno il transgene nelle cellule germinali e saranno in grado di trasmetterlo alla discendenza. Si devono quindi identificare gli animali adatti (fondatori transgenici) per ottenere la seconda generazione di animali transgenici, composta verosimilmente da una metà di animali eterozigoti per il transgene. Incrociando tra loro due eterozigoti potranno essere individuati animali transgenici allo stato omozigote per il carattere introdotto o modificato all'interno della terza generazione, così come rappresentato in **Fig. 21.69**.

Infine, il metodo di trasformazione mediato da liquido seminale è reso possibile dalla capacità degli spermatozoi di assorbire e veicolare DNA esogeno, caratteristica peraltro nota da più di un ventennio. In questi casi è necessario che il transgene venga mescolato agli spermatozoi prima del loro impiego per la fecondazione *in vitro* delle cellule uovo. Tale metodo, in passato largamente sperimentato nel topo, è attualmente impiegato per ottenere suini geneticamente modificati, aventi tessuti e organi più compatibili con l'uomo, da utilizzare negli xenotrapianti.

La microiniezione pronucleare è la tecnica utilizzata da più tempo per la produzione di animali transgenici. Nonostante la sua bassa efficienza è tuttora molto diffusa in quanto applicabile a tutte le specie. Gli oociti vengono prelevati direttamente dalle ovaie e messi in coltura per 24 ore a 37°C con l'aggiunta di ormoni prodotti dalle ghiandole sessuali. La fecondazione avviene *in vitro*: si aggiungono gli spermatozoi e per circa 24 ore si mantengono in coltura insieme agli oociti. La microiniezione avviene grazie all'utilizzo di un microscopio: il DNA viene iniettato direttamente nel pronucleo maschile. Dopo la microiniezione gli zigoti vengono di nuovo coltivati *in vitro* fino allo stadio di blastocisti e quindi vengono trapiantati in una femmina ricevente.

Nel 1988, vedono la luce ad Edimburgo, presso il *Roslin Institute*, le prime pecore transgeniche in grado di produrre un enzima umano, l'antitripsina di tipo $\alpha 1$, utilizzato nella cura dell'enfisema, o il fattore IX, associato quando carente ad una forma di emofilia. Tali pecore, che accumulano queste sostanze nel latte, sono state ottenute combinando parti di geni diversi e sono ritenute utilizzabili per la produzione di farmaci. In **Fig. 21.70** è riportato il costrutto ingegnerizzato impiegato per la pecora transgenica *Tracy*: è stata combinata la regione codificante del gene codificante la antitripsina di tipo $\alpha 1$ con il promotore della β -lattoglobulina al fine di ottenere la sintesi della proteina di interesse solo nel latte. Questo è possibile perché il promotore della β -lattoglobulina permette la produzione del messaggero corrispondente alla regione codificante del gene per la α -antitripsina solo nella ghiandola mammaria. La successiva traduzione di tale messaggero comporta la presenza della proteina solo nel latte e in nessun altro organo o secreto dell'animale (**Fig. 21.71**).

Tra i geni espressi nelle ghiandole mammarie il cui prodotto proteico viene secreto nel latte per effetto di un promotore cosiddetto galatto-specifico, oltre alla lattoglobulina è possibile citare quelli che presiedono alla sintesi della caseina e della proteina acida del siero. Per ottenere l'espressione di un gene umano nel latte di un animale da allevamento, il promotore e le sequenze regolative di questi geni galatto-specifici devono essere associati in un vettore di clonaggio con le regioni codificanti dei geni di interes-

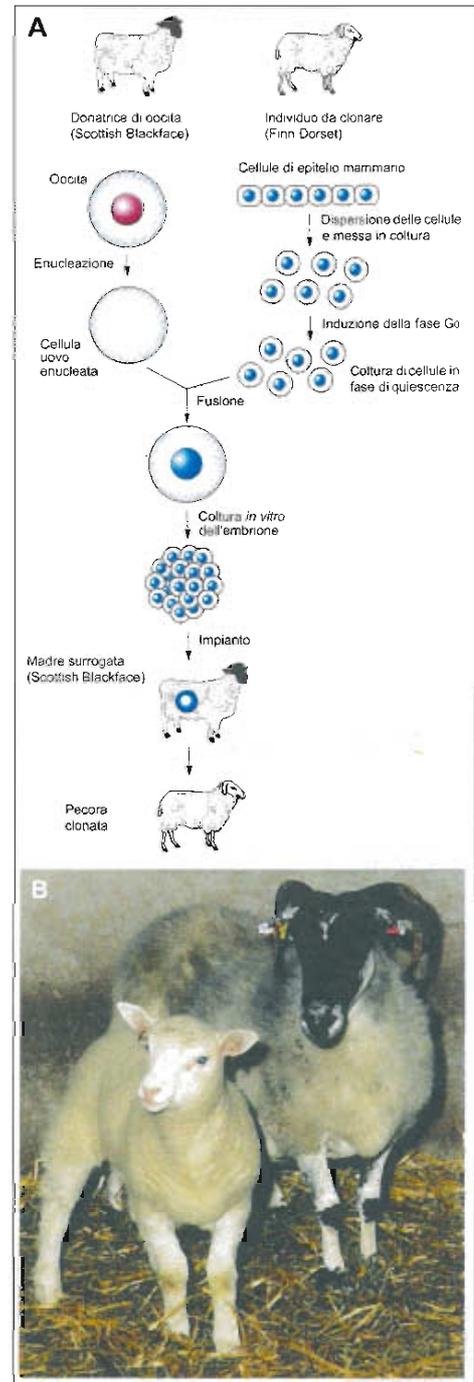


Fig. 21.68 – Schema per la clonazione animale (A), con particolare riferimento alla pecora *Dolly* (B). Modificato da: B.R. Glick e J.J. Pasternak (1998).

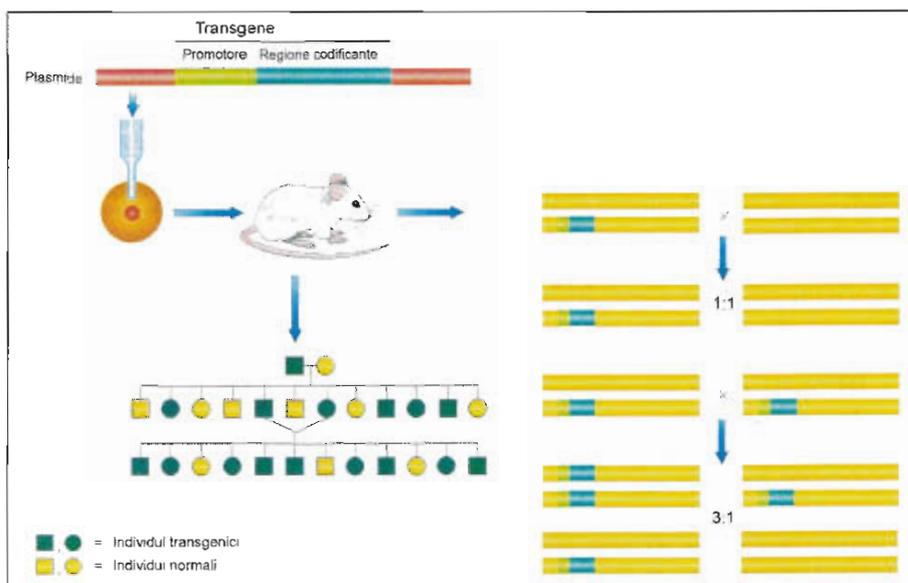


Fig. 21.69 – Identificazione di fondatori transgenici e selezione di individui omozigoti per il gene esogeno.

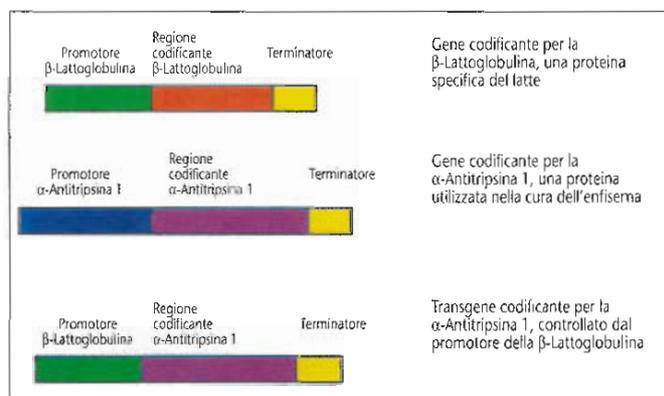


Fig. 21.70 – Elementi di un costrutto transgenico formato assemblando il promotore della β -lattoglobulina con la regione codificante del gene per l'antitripsina di tipo $\alpha 1$.



Fig. 21.71 – La pecora Tracy insieme ai suoi due agnellini.

se. Solo in questo modo la proteina codificata da un gene esogeno verrà espressa all'interno della ghiandola mammaria e secreta nel latte: il latte animale potrà essere agevolmente raccolto al fine di isolare la proteina umana. La purificazione di una proteina dal latte è considerato un processo relativamente semplice poiché il latte contiene un numero ridotto di proteine diverse (Tab. 21.13). Bisogna, infine, considerare che il latte dei mammiferi rappresenta un mezzo molto comodo per recuperare e purificare proteine che altrimenti sarebbero difficili da ottenere senza sacrificare l'animale.

Rispetto alla produzione di proteine nei batteri, un vantaggio notevole è connesso al fatto che certe proteine sono prodotte correttamente e tendono a funzionare più efficacemente quando espresse nei mammiferi. Ciò può essere dovuto a modificazioni

Tab. 21.13 – Composizione in proteine del latte di vacca e di capra (espressa in grammi/litro).

Proteine (g/l)	Vacca	Capra
Caseina		
Caseina α_1	10,0	12,0
Caseina α_2	3,4	3,8
Caseina κ	3,9	4,6
Caseina β	10,0	16,0
Principali proteine del siero		
Lattalbumina α	1,0	0,8
Lattalbumina β	3,0	2,8
Altre proteine		
Sieralbumina	0,4	Sconosciuto
Lisozima	Tracce	Sconosciuto
Lattoferrina	0,1	Sconosciuto
Immunoglobuline	0,7	Sconosciuto

Proteina	Animale	Impiego
Lattoferrina	Vacca	Usata come integratore di ferro negli alimenti per l'infanzia
Attivatore tissutale del plasminogeno (TPA, <i>tissue plasminogen activator</i>)	Capra	Usata come integratore di ferro negli alimenti per l'infanzia
Antitripsina α_1	Pecora	Trattamento dell'enfisema polmonare
Fattore IX	Pecora	Trattamento dell'emofilia
Fattore di crescita insulino-simile I (IGF-I, <i>insulin-like growth factor I</i>)	Vacca	Trattamento del diabete

Tab. 21.14 – Proteine prodotte nel latte di animali da allevamento.

post-traduzionali che hanno luogo nei mammiferi ma non nei batteri (ad esempio, il legame di gruppi saccaridici). Inoltre, alcune proteine di eucarioti possono venire degradate rapidamente o essere ripiegate in modo inappropriato nei procarioti. Diverse sono le proteine umane di interesse farmacologico che si è riusciti a produrre nei bovini, negli ovini e nei caprini (Tab. 21.14).

Le principali applicazioni degli animali transgenici nei settori della farmacologia, medicina e chirurgia e zootecnia sono riassunte in Tab. 21.15.

Settore	Finalità	Specie animali
Farmacologia	Produzione e secrezione di biofarmaci nel latte*	Pecore, capre, bovini, suini, topi
Medicina e chirurgia	Modelli sperimentali per lo studio, il trattamento e la prevenzione delle più gravi malattie dell'uomo	Topi, ratti
	Donatori di tessuti e organi per xenotrapianti	Suini
Zootecnica	Selezione e allevamento di animali resistenti alle malattie infettive e neoplastiche	Bovini, suini, polli, pesci
	Miglioramento quali-quantitativo delle produzioni di alimenti di origine animale (carne, latte, uova)	Bovini, suini, polli, pesci

*Biofarmaci per l'uomo già in produzione da parte di animali transgenici:
 α_1 -antitripsina umana per la terapia dell'enfisema
 Proteina C umana per la terapia della trombosi
 Fattori VIII e X di coagulazione del sangue umano per la terapia dell'emofilia
 Lattoferrina umana per il trasporto sierico del ferro e l'attività antibatterica
 Attivatore tissutale del plasminogeno umano per la dissoluzione di trombi di fibrina
 Emoglobina umana come sostituto del plasma umano nelle trasfusioni

Tab. 21.15 – Principali applicazioni degli animali transgenici e biofarmaci per l'uomo.

L'impatto della tecnologia transgenica è aumentato notevolmente negli ultimi 10-15 anni e ciò si evince dai numerosissimi esempi di modelli di animali transgenici creati per sviluppare specifiche ricerche in campo biomedico e farmaceutico, oltre che zootecnico. Gli animali più utilizzati appartengono alle specie da laboratorio (circa il 95%), mentre il restante 5% è rappresentato da animali da allevamento. La maggior parte degli animali transgenici presentano il genoma modificato in seguito al trasferimento o al silenziamento (*knock-out*) di un determinato gene. Nel loro complesso, questi animali hanno permesso un notevole avanzamento delle conoscenze di base in biologia.

Gli animali transgenici consentono potenzialmente l'ottenimento di proteine in modo migliore rispetto ai sistemi alternativi (batteri ricombinanti): la proteina codificata dal gene esogeno può essere secreta nei fluidi corporei, come latte e sangue, è di raccolta agevole e può essere prodotta in grandi quantità. In questi casi, l'interesse delle biotecnologie farmaceutiche è orientato verso la creazione di animali transgenici quali vacche, pecore e capre, e in misura minore anche conigli e maiali, modificati usando geni umani sotto il controllo di promotori esprimibili nella ghiandola mam-

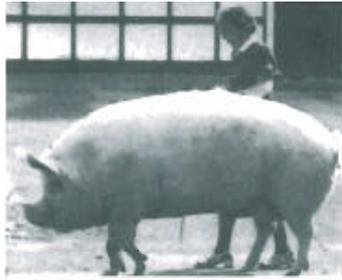


Fig. 21.72 – Maiale transgenico per l'ormone della crescita umano, denominato *Beltsville pig*, dal nome della stazione sperimentale del Maryland (USA) dove è stato ottenuto. Fonte: Pursel V.G. et al. (1989) *Science*, 254: 1281-1288.

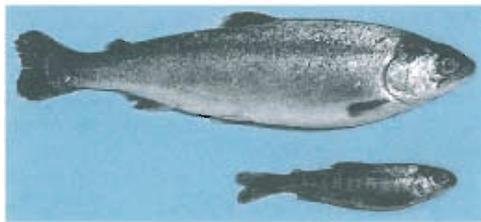


Fig. 21.73 – Esempio di salmone transgenico per l'ormone della crescita a confronto con un individuo normale.

maria, capaci di secernere le proteine unicamente nel latte. Negli ultimi anni si è sviluppata così una nuova industria, quella che utilizza gli animali transgenici come “bioreattori” allo scopo di produrre molecole con proprietà farmaceutiche o alimenti con attività terapeutiche.

La tecnica di microiniezione di DNA in cellule della linea germinale è quella maggiormente impiegata per gli animali da allevamento. Attraverso questa tecnica è possibile migliorare le caratteristiche produttive e qualitative nonché la resistenza a patologie o la tolleranza all'ambiente degli animali, ma anche produrre animali in grado di sintetizzare nel latte proteine ricombinanti di interesse nutraceutico o farmaceutico.

Il primo animale di interesse zootecnico ad essere stato clonato è il suino. Era il 1985. Da allora la transgenesi negli animali da allevamento è stata studiata con l'intento principale di utilizzarla per incrementare la produttività e le caratteristiche di qualità: i progetti di ricerca in questi campi sono stati finalizzati ad ottenere un maggiore e più rapido accrescimento corporeo degli animali da allevamento, con una aumentata massa muscolare e un ridotto deposito di grasso. A tale scopo sono stati prodotti maiali e pecore transgeniche, introducendo i geni *GH* (*growth hormone*) codificante l'ormone della crescita e *IGF-1* (*insuline growth factor*) codificante un fattore di crescita insulino-simile. In alcuni modelli si è spesso realizzata una espressione abnorme dei transgeni che ha portato gli animali a sviluppare anomalie anatomiche o fisiologiche, non sopravvivendo oltre l'anno di età (Fig. 21.72). Il trasferimento del gene per l'ormone della crescita ha invece consentito notevoli successi in alcune specie di pesci, portando all'ottenimento di salmoni transgenici con accresciute dimensioni corporee (Fig. 21.73). Il peso dei pesci transgenici risulta, in media,

11 volte superiore a quello dei controlli non transgenici. Questi risultati sono stati raggiunti ponendo il gene codificante per l'ormone della crescita sotto il controllo del promotore della metallothioneina ed introducendo il costrutto plasmidico in uova di salmone per iniezione.

Recentemente sono stati prodotti maiali transgenici, detti *Enviro-pig*, in grado di sintetizzare l'enzima fitasi quasi esclusivamente nelle ghiandole salivari poiché il gene corrispondente è sotto il controllo di un promotore con elevata specificità di espressione. Tale enzima secreto nella saliva agisce a livello dello stomaco allo stesso modo della fitasi addizionata nei mangimi: è stato verificato che i maiali transgenici producono fitasi in quantità sufficiente a digerire la totalità dei fitati contenuti nei cereali dei mangimi. Di conseguenza, il fosforo normalmente presente nelle deiezioni è considerevolmente ridotto, in misura compresa tra il 55% e il 75%, a seconda dell'età dei soggetti. Ciò comporta una drastica riduzione delle potenzialità di inquinamento ambientale provocato dall'allevamento dei suini.

Tra gli animali domestici, oltre che nei suini, soggetti transgenici sono stati ottenuti negli ovini, nei caprini e nei polli per migliorare la qualità del latte, della lana o delle uova. Ad esempio, uno degli obiettivi in ovini e caprini è quello di ottenere latte con meno lattosio, disaccaride che può creare intolleranza, o più ricco di proteine utili alla caseificazione. Negli avicoli, invece, un obiettivo è quello di promuovere o di aumentare la sintesi di particolari proteine nelle uova. Ad esempio, presso l'Università di Guelph (Canada) sono stati prodotti polli transgenici in grado di esprimere una maggiore quantità di lisozima nell'albume delle uova. Tale enzima, normalmente sintetizzato nell'albume, è considerato un efficace antimicrobico in quanto degrada i polisaccaridi contenuti nella capsula di rivestimento di molti batteri: per questa ragione, il lisozima è comunemente isolato dalle uova e usato come antibiotico naturale per preservare gli alimenti. Un secondo obiettivo perseguito usando polli transgenici è quello di implementare la variabilità di tipi di lisozima modificando la composizione amminoacidica della proteina per ottenere un più ampio spettro di azione contro i batteri.

Nel 1990 in Olanda è stato ottenuto il primo toro transgenico, *Herman* (Fig. 21.74). L'anno successivo sono state ottenute vacche transgeniche in grado di secernere la lattoferrina nel loro latte: in questo caso l'obiettivo era quello di usare tale sostanza come integratore di ferro negli alimenti per l'infanzia e per il trattamento della setticemia.

Un settore sul quale le applicazioni biotecnologiche potrebbero fornire un contributo molto importante è quello connesso ad un aumento della resistenza a malattie. Si ritiene che questo settore potrà avere un forte impatto sulla sicurezza alimentare e sulla salute pubblica. La resistenza alla BSE è sicuramente un aspetto di primaria rilevanza: nei topi è stato dimostrato che soggetti nei quali il gene *PrP*, codificante la proteina prionica responsabile delle encefalopatie trasmissibili in diverse specie di animali, è stato inattivato sono resistenti alla BSE. Inoltre, sono state prodotte pecore transgeniche con il prione inattivato e la loro resistenza alla "scrapie" (encefalopatia ovina) è in corso di valutazione. Le epidemie più preoccupanti che hanno recentemente colpito il genere umano – AIDS, influenza aviaria (tipo H5N1), SARS, ecc. – sono dovute a virus trasmessi da specie animali. Creare animali resistenti a patologie ed, in particolare, a infezioni virali potrebbe diminuire sensibilmente il rischio per l'uomo di contrarre malattie epidemiche.

Esperimenti pilota di transgenesi sono in corso nei suini per inibire, ad esempio, la produzione di aminopeptidasi N, una proteina che costituisce il recettore cellulare primario del coronavirus responsabile della gastroenterite acuta. Ricerche sulla transgenesi sono in atto anche sui caprini per generare animali in grado di produrre e secernere nel loro latte proteine del parassita responsabile della malaria, da utilizzare per la vaccinazione. In particolare, capre geneticamente modificate che secernono nel latte la proteina MSP-1 (*Plasmodium falciparum merozoite specific protein*), l'agente della malaria che si trova localizzata sulla superficie del plasmodio, sono in fase di valutazione: se verrà dimostrato che questa proteina è in grado di proteggere gli animali da esperimento (ad esempio, scimmie) dalla malaria, potrà essere avviata una fase di sperimentazione sull'uomo. Considerando che ogni anno oltre 500 milioni di persone contraggono la malaria e di queste circa tre milioni muoiono, lo sviluppo di un vaccino efficace rimane l'obiettivo prioritario.

21.9.1 Potenziali applicazioni delle biotecnologie genetiche animali e considerazioni conclusive

Da millenni l'uomo ha reso possibili scambi massicci di patrimonio genetico tra specie diverse: fra cavalla e asino (mulo), fra asina e cavallo (bardotto), fra cinghiale e maiale, fra cavallo e zebra, fra vacca e bisonte, fra leone e leopardo, creando animali con genoma ibrido. Questi incroci comportano il rimescolamento di migliaia di geni di origine diversa. La trasformazione comporta, invece, una modificazione mirata del patrimonio genetico di un organismo, specificatamente per uno o pochi geni. La creazione di animali con genomi ibridi non ha destato scandali di natura etica e non ha creato rischi per l'ambiente o per l'uomo, così come la produzione di animali con transgeni non può innescare squilibri per gli agro-ecosistemi dal momento che i soggetti vengono allevati in ambienti protetti, sia che si tratti di animali da allevamento che di animali da laboratorio.

Allo stato attuale delle conoscenze, le possibili applicazioni degli animali transgenici in campo zootecnico e biomedico sono molteplici. In particolare, la transgenesi consente potenzialmente di: i) introdurre geni di resistenza a patogeni negli animali da allevamento; ii) migliorare le caratteristiche qualitative dei prodotti zootecnici, principalmente carne, latte e lana; iii) produrre proteine di interesse farmaceutico e biotecnologico; iv) ottenere organi per xenotrapianti con minori rischi



Fig. 21.74 – Il toro transgenico *Herman* e la sua progenie (*Gene Farming*, Olanda).

connessi alle reazioni di rigetto; v) creare animali modello da laboratorio per lo studio di diverse patologie umane o per la ricerca biologica.

Le applicazioni mirate al miglioramento delle produzioni zootecniche hanno cercato innanzitutto di migliorare la qualità della carne. Molti studi sono stati condotti, ad esempio, sul gene che controlla la sintesi dell'ormone somatotropo, sapendo che la sovraespressione di questo gene aumenta la velocità dello sviluppo muscolare. Allo stesso modo si è cercato di migliorare la qualità del latte, variando l'espressione delle proteine del latte. Molte di queste applicazioni hanno lo scopo di rendere il latte bovino più simile a quello umano e di eliminare le proteine che causano allergie o di risolvere il problema dell'intolleranza al lattosio. Infine, si è anche tentato di migliorare la quantità e soprattutto la qualità delle produzioni di lana, aumentando la cheratina, una proteina che entra nella composizione dei peli.

Tab. 21.16 – Produzione di proteine ricombinanti di interesse farmaceutico nel latte di animali transgenici.

Proteina	Specie
α -1-Antitripsina	Topo, Pecora
Emoglobina umana	Topo, Maiale
Proteina C	Topo, Maiale
Fattore VIII	Topo, Pecora
Fattore IX	Topo, Pecora
Urochinasi	Topo
t-PA	Topo, Coniglio, Capra
Eritropoietina	Topo, Vacca
SOD	Coniglio
Lattoferrina umana	Topo, Vacca
CFTCR	Topo
IL-2 umana	Coniglio

L'applicazione degli animali transgenici che più è stata studiata è sicuramente connessa all'impiego di questi animali come biofabbriche per la produzione di proteine di interesse farmaceutico. Sono già molti gli esempi di proteine prodotte in questo modo, alcune delle quali sono già entrate nelle fasi cliniche che porteranno al loro utilizzo nell'uomo, come ad esempio i fattori della coagulazione del sangue (Tab. 21.16). Le prospettive nel settore biomedico sono molto promettenti: l'interesse è rivolto alla produzione di vacche da latte transgeniche capaci di esprimere anticorpi umani attivi nei confronti di malattie molto gravi come, ad esempio, il carbonchio o il vaiolo, di tossine letali come il botulino o di malattie connesse a deficienze del sistema immunitario.

Un esempio di produzione di una proteina di interesse biotecnologico da parte di un animale transgenico è quello della capra che sintetizza, grazie all'inserimento di un gene isolato da un ragno, una fibra molto resistente e per tale motivo denominata "bioacciaio". In questo animale, come in tutti gli animali transgenici utilizzati come biofabbriche, la proteina di interesse viene prodotta nel latte grazie all'utilizzo di promotori specifici che permettono l'espressione del transgene a livello della ghiandola mammaria.

La transgenesi può, in alcuni casi, rappresentare l'unica via possibile per dotare alcune specie di resistenze a malattie metaboliche, infettive e parassitarie. Un esempio applicativo in questo campo è rappresentato dalla produzione di bovini transgenici resistenti alla tripanosomiasi. La tripanosomiasi, nota anche come malattia del sonno, è causata da un protozoo parassita trasmesso dalla mosca tse-tse. Il tripanosoma e la mosca tse-tse riescono a rendere inabitabile, per la maggior parte delle razze bovine da latte e da carne, oltre 10 milioni di chilometri quadrati di territorio, la zona più ricca di acqua e, quindi, più fertile del continente africano. La difficoltà di allestire un vaccino è dovuta al fatto che i tripanosomi, in grado di svilupparsi nel sangue, sono rivestiti da un denso strato di materiale, detto mantello, con proprietà antigeniche, capace di indurre una risposta anticorpale, estremamente variabile e talmente rapida che il tripanosoma può sfuggire ripetutamente agli anticorpi specifici prodotti contro il precedente mantello antigenico. Tale evento può ripetersi per decine di volte nello stesso animale, rendendo così molto difficile produrre un vaccino in grado di contenere tutte le variabili antigeniche possibili nel tripanosoma. L'approccio al momento seguito è quello di rendere i bovini resistenti alla tripanosomiasi mediante la produzione di animali transgenici. È noto, infatti, da molto tempo che alcune razze bovine sono in grado di sopravvivere e di riprodursi in aree infestate dalle mosche tse-tse e dai tripanosomi, senza l'ausilio di farmaci tripanocidi. Questa caratteristica di resistenza naturale, nota comunemente con il termine di "tripanotolleranza", è associata quasi esclusivamente a ridotte popolazioni bovine, localizzate nell'Africa Occidentale, quali la *N'Dama* caratterizzata dall'assenza di gibbosità e dalla presenza di lunghe corna (Fig. 21.75).



Fig. 21.75 – Razza bovina africana suscettibile alla tripanosomiasi (A) e razza *N'Dama* resistente (B).

Strettamente connessa alla transgenesi è la clonazione. In campo animale la clonazione può essere utilizzata come tecnica di riproduzione per moltiplicare animali geneticamente superiori, molto produttivi (riproduttori di razze da allevamento) o aventi caratteristiche particolari (per esempio, razze in via di estinzione). Gli animali ottenuti rappresentano dei gemelli monozigoti dell'animale donatore della cellula. L'industria zootecnica potrebbe beneficiare moltissimo dalla clonazione di animali geneticamente superiori, così come i programmi di miglioramento genetico poiché la clonazione consentirebbe di moltiplicare i riproduttori maschi miglioratori da utilizzare per la produzione di seme. Nel 1999, Galli e collaboratori hanno ottenuto il toro *Galileo* (Fig. 21.76).

I ricercatori hanno messo a punto metodiche per la produzione potenziale di molteplici copie di un singolo embrione. Tali metodiche rappresentano una via per ottenere un gran numero di animali con capacità produttive identiche tra loro e superiori alla media. Il metodo di clonazione diretto e di maggiore rilevanza da un punto di vista commerciale è senza dubbio quello ottenuto mediante trasferimento nucleare. L'utilizzazione di tale metodo fu ipotizzata dal tedesco Hans Spemann già nel 1938 e la tecnica per la sua realizzazione venne messa a punto sugli anfibi da Robert Briggs e T.J. King nel 1952. Tuttavia, solo molti anni dopo il danese Steen Willadsen riuscirà ad applicare con successo nei mammiferi la clonazione usando il metodo del trasferimento nucleare: egli clonò una pecora nel 1984 e un bovino nel 1986. A distanza di un ventennio la clonazione mediante trasferimento nucleare da cellule embrionali è utilizzata in modo quasi routinario negli ovini e nei bovini. Le potenzialità sono enormi: un embrione bovino allo stadio di morula consente mediamente di produrre fino a 30 nuovi embrioni i quali possono essere trasferiti in bovine riceventi ed i risultanti vitelli allevati e valutati per le loro capacità produttive. Inoltre, gli embrioni non trasferiti possono essere congelati, conservati ed eventualmente utilizzati per ulteriori clonazioni. Alcuni ricercatori stanno studiando la capacità che un embrione congelato-scongelo ha di essere clonato e se gli embrioni clonati di seconda, terza e successive generazioni sono in grado di produrre animali vitali.

Per quanto riguarda le applicazioni biomediche, l'aspetto più importante della clonazione animale è quello di poter ottenere le cellule embrionali staminali da embrioni sviluppati per clonazione con cellule dei pazienti. Le cellule staminali hanno la capacità di differenziarsi in tutti i tipi di cellule dell'organismo e la ricerca sta facendo rapidi progressi per mettere a punto delle procedure che indirizzino il differenziamento verso il tipo cellulare desiderato. Le potenzialità applicative sono veramente notevoli e i risultati di queste ricerche potranno rivoluzionare la terapia di molte malattie dell'uomo come, ad esempio, il diabete.

In prospettiva, uno degli obiettivi più affascinanti rimane comunque quello di produrre e clonare animali transgenici per il trapianto di organi e tessuti nell'uomo. La ragione principale dell'attenzione che gli **xenotrapianti** stanno ricevendo dipende dal fatto che essi rappresentano una possibile soluzione alternativa alla carenza di organi umani per i trapianti. L'insufficiente reperibilità di organi e tessuti, unitamente alle prospettive ancora troppo lontane di avere disponibili metodiche alternative hanno indotto a focalizzare l'attenzione negli ultimi anni sugli xenotrapianti. Gli xenotrapianti possono essere definiti come "ogni procedura che comporti l'uso di cellule vive, tessuti e organi provenienti da una specie animale e trapiantati o impiantati in un essere umano, o usati in perfusione attraverso i vasi sanguigni", ora estesi anche a "fluidi, cellule, tessuti e organi umani che abbiano avuto un contatto ex vivo con cellule, tessuti o organi non umani vivi". Alcune proteine prodotte nel sangue, dette "di complemento", appena individuano una sostanza estranea si attaccano alla sua superficie per segnalarlo al sistema immunitario che si attiva producendo anticorpi specifici. Creare un animale i cui organi interni abbiano in superficie delle proteine il



Fig. 21.76 – Toro *Galileo*, primo clone al mondo di un toro adulto provato (sottoposto ad una prova di valutazione dei riproduttori) – CIZ Research and Genetics.



Fig. 21.77 – Figliata di suini transgenici.



Fig. 21.78 – Topo transgenico brevettato.

più possibile simili a quelle umane potrebbe consentire di ridurre o superare i problemi connessi alle reazioni di rigetto. Dei quattro tipi di rigetto – iperacuto, vascolare acuto, cellulare acuto, cronico – solo il primo è per il momento avviato alla soluzione. Infatti, per quanto riguarda la forma più grave di rigetto, essa comporta l'attivazione degli antigeni di istocompatibilità, conducendo alla necrosi del tessuto o dell'organo entro breve tempo dall'innesto. La realizzazione di suini modificati geneticamente (Fig. 21.77) in modo da indurre una risposta immunitaria più ridotta nell'uomo inteso come organismo ricevente, è stato l'elemento che ha radicalmente cambiato le prospettive sugli xenotrapianti, facendoli intravedere come una biotecnologia concretamente applicabile nel contesto clinico. Nel 1995 sono stati tentati i primi esperimenti con pazienti gravissimi in attesa di trapianto, che sono stati assistiti con fegato di maiali transgenici *ex vivo*, cioè con organi non trapiantati all'interno del corpo ma collegati tramite un macchinario all'esterno. In anni più recenti, la sperimentazione è stata condotta anche per comprendere le reali potenzialità di trapianti di cuore usando maiali transgenici.

Attualmente la sperimentazione sugli esseri umani riguarda quasi esclusivamente l'innesto di cellule, soprattutto di tipo neuronali fetali di suini, per la cura del morbo di Parkinson (disordine del sistema nervoso con tremori e rigidità muscolare) e della corea di Huntington (contrazione involontaria dei muscoli), e per la perfusione attraverso il fegato cosiddetto bioartificiale, in cui sono utilizzati epatociti di suini, di pazienti in attesa di trapianto di fegato.

Certamente l'applicazione più utile degli animali transgenici e già ampiamente usata in specie da laboratorio è quella connessa alla produzione di animali modello per lo studio di malattie umane. I topi sono il primo esempio di animale brevettato in cui sono stati modificati alcuni geni specifici per provocare l'insorgenza del cancro al fine di studiare questa patologia (Fig. 21.78). L'impiego di questi animali come modelli per lo studio di malattie umane è possibile perché oltre il 90% dei nostri geni sono omologhi a quelli del topo. Le potenzialità della transgenesi nella ricerca in campo biomedico sono immense e non facilmente prevedibili.

Sommario

Nella società moderna si avverte un crescente interesse verso le tematiche riguardanti la sicurezza degli alimenti di origine animale e la sostenibilità dei sistemi di produzione animale. La risposta ai quesiti che tali tematiche sollevano possono essere fornite ricorrendo a strumenti di analisi fondati sulle recenti acquisizioni di genomica e proteomica. L'insieme delle tecnologie messe a punto per l'analisi delle sequenze genomiche e del polimorfismo molecolare può fornire anche un valido contributo al miglioramento genetico dei caratteri quali-quantitativi così come alla salvaguardia delle razze autoctone, in particolare, e della biodiversità a livello di specie, più in generale.

Analisi del genoma animale e selezione assistita da marcatori molecolari

La selezione genetica, finalizzata al raggiungimento di una uniformità fenotipica elevata e idonea a massimizzare le produzioni, e la conservazione della variabilità gene-

tica nel suo complesso, benché rappresentino argomenti di ricerca differenziati in termini di finalità, sono accomunati dal fatto che possono usufruire entrambi dell'enorme contributo connesso all'impiego dei marcatori molecolari. L'analisi del genoma mediante marcatori molecolari è in grado di rilevare la diversità dovuta a mutazioni di regioni di DNA omologhe in individui diversi appartenenti alla stessa specie o a specie diverse. Le differenze tra individui a livello di sequenza nucleotidica del DNA costituiscono un insieme di marcatori genetici con alto potere discriminante e rappresentano un sistema di analisi genomica di grande precisione.

La disponibilità di marcatori molecolari co-dominanti e facilmente rilevabili, come ad esempio microsattelliti (SSR, *simple sequence repeat*) e SNP (*single nucleotide polymorphism*), consente di accelerare i tempi richiesti per la selezione genetica e di aumentare le possibilità di successo dei programmi di miglioramento genetico, ricorrendo alla cosiddetta selezione assistita da marcatori (MAS, *marker-assisted selection*). La disponibilità di marcatori molecolari utili per la selezione assistita può teoricamente apportare cambiamenti di rilievo sui metodi seguiti per selezionare razze superiori che combinano il maggior numero di alleli marcatori e geni candidati selezionati e quindi di alleli favorevoli ai loci che controllano i caratteri oggetto di miglioramento genetico. La posizione nella mappa dei loci per i caratteri quali-quantitativi e la variazione allelica ai loci marcatori associati sono due informazioni indispensabili per costituire razze superiori in termini produttivi ed identificabili a livello molecolare.

Nelle specie animali, caratterizzate tipicamente da riproduzione incrociata, l'uso di tali strumenti molecolari per il raggiungimento di un progresso genetico attraverso la selezione assistita, sembra essere più difficile rispetto a quanto avviene nelle specie vegetali. Tuttavia, l'identificazione di loci per caratteri quantitativi (QTL, *quantitative trait loci*) e di loci relativi a geni candidati (CG, *candidate genes*) preposti al controllo di caratteri importanti per le principali produzioni zootecniche (carne, latte, uova, ecc.) può essere considerevolmente accelerata ricorrendo a strategie di mappaggio basate sulla stima del disequilibrio di associazione (LD, *linkage disequilibrium*).

In termini generali, nelle popolazioni di specie a riproduzione incrociata tale disequilibrio è osservato soprattutto per loci strettamente associati. Nel settore zootecnico, l'approccio basato sul LD è attualmente quello più promettente per l'identificazione di marcatori molecolari associati a geni qualitativi e soprattutto quantitativi poiché consente un'elevata accuratezza della mappatura genica. I caratteri quantitativi mostrano una variabilità fenotipica continua ed hanno una eredità poligenica dal momento che sono controllati da più geni. Le posizioni occupate da questi geni sui cromosomi sono chiamate loci per i caratteri quantitativi ed ognuno di questi loci è principalmente associato alla produttività e alle caratteristiche di qualità. L'approccio basato sui CG prevede, invece, la valutazione specifica di alcuni marcatori molecolari riconducibili a specifici geni che si ritengono potenzialmente coinvolti nell'espressione del carattere quantitativo di interesse.

L'acquisizione di tali informazioni molecolari richiede un grande sforzo finanziario e logistico iniziale. I vantaggi di ordine tecnico-economico rispetto ai metodi tradizionali non sono stati, comunque, ancora del tutto quantificati. La conoscenza dell'eredità e della ereditabilità dei caratteri quantitativi oggetto di selezione appare determinante per comprendere le reali potenzialità degli schemi di selezione assistita da marcatori del DNA.

Attualmente l'unica certezza è forse quella che riguarda l'uso degli strumenti di analisi genomica basati sulla rilevazione di marcatori molecolari per attestare la qualità delle produzioni zootecniche e garantire la tracciabilità di singoli genotipi e/o di razze selezionate. D'altro canto, la possibilità di misurare il polimorfismo genomico a livello di popolazioni naturali e sperimentali attraverso l'uso dei marcatori molecolari ha aperto interessanti prospettive anche per il monitoraggio della biodiversità a livello

di specie e per la salvaguardia delle razze locali, soprattutto nell'ottica di garantire la specificità delle produzioni zootecniche.

Le nuove sfide dei metodi di valutazione genetica quantitativa riguardano senza dubbio la possibilità di integrare le informazioni fornite dalla genetica molecolare con quelle sino ad ora disponibili nel campo della genetica quantitativa. L'identificazione di QTL, la validazione di geni candidati e più in generale la MAS rappresentano solo alcune delle tantissime sinergie che potranno essere create tra genetisti quantitativi e molecolari. Ad esempio, un sistema integrato di informazioni provenienti dai marcatori molecolari usati per aumentare l'accuratezza delle valutazioni genetiche dei riproduttori in aggiunta alle informazioni fenotipiche rilevate sulle progenie promette di avere ricadute di elevato valore applicativo. Un'ulteriore integrazione tra genetica molecolare e quantitativa può essere individuata nella *marker-assisted introgression* ossia nella possibilità di introgressione di uno specifico gene. Altre, possibili applicazioni riguardano la *marker-assisted conservation*, per migliorare l'efficacia dei tradizionali schemi di conservazione e valorizzazione di risorse genetiche animali a limitata diffusione e la tracciabilità genetica-molecolare proposta per garantire una tecnica affidabile di identificazione degli animali di interesse zootecnico e dei loro prodotti alimentari.

In conclusione, l'evoluzione dei metodi di valutazione genetica nel campo animale, e non solo, sarà sempre più influenzata dallo sviluppo e dalla ricerca di nuove tecniche statistiche o dal recupero ed adattamento di tecniche biometriche già conosciute in altri ambiti scientifici, associate a nuove conoscenze nell'ambito della bioinformatica, della genomica e della conoscenza sempre più approfondita dei meccanismi molecolari legati al controllo dell'espressione genica (trascrittomica e proteomica).

Sicurezza alimentare

La sensibilità dei consumatori nei confronti della sicurezza alimentare è notevolmente aumentata negli ultimi tempi, soprattutto in seguito alle nuove tendenze agrarie (impiego di OGM) e alle nuove emergenze sanitarie (come, ad esempio, la BSE). Nel settore zootecnico, in particolare, si sono verificati spiacevoli eventi quali le epidemie di influenza aviaria e di afta epizootica, che hanno destato forti preoccupazioni nell'opinione pubblica. Questi eventi hanno minato la fiducia di molti consumatori, inducendoli a ridurre il consumo o addirittura ad interrompere l'acquisto dei consueti prodotti alimentari di origine animale. A questo si aggiunge il disorientamento creato da troppi e spesso contrastanti messaggi che in tema di prodotti alimentari giungono ai consumatori dalle varie fonti di informazione. D'altro canto anche gli agricoltori si trovano ormai inseriti in un sistema commerciale sempre più globale dove risulta difficile, senza particolari accorgimenti o adeguamenti tecnici, valorizzare le produzioni locali, legate al territorio, e dotate di specificità e tipicità.

Negli ultimi tempi i consumatori hanno acquisito una maggiore consapevolezza riguardo alla qualità dei prodotti alimentari, richiedendo garanzie sull'autenticità dei componenti e sulla loro origine. In passato, l'autenticazione dei cibi comprendeva il rilevamento delle proteine specie-specifiche, con saggi che impiegavano una varietà di metodi immunologici ed elettroforetici, ma che nascondevano delle insidie. Essendo i prodotti il risultato di un processo che prevedeva anche trattamenti col calore, la composizione proteica complessiva poteva risultare alterata a causa di eventi di denaturazione. Inoltre, la maggior parte dei metodi commerciali era orientata verso l'uso e l'analisi di proteine del plasma, che è una frazione facilmente contaminabile e che può portare a risultati scarsamente interpretabili. Ora l'attenzione si è concentrata verso saggi basati sul DNA come fonte di informazione. In effetti, il DNA ha numerosi vantaggi rispetto

alle proteine: i) è più termostabile di molte proteine; ii) è presente nella maggioranza delle cellule degli organismi; iii) può potenzialmente fornire più informazioni delle proteine. Inoltre, la tecnologia di analisi del DNA è più rapida e adatta ad essere automatizzata, semplificando così notevolmente le procedure di autenticazione.

Un numero sempre maggiore di imprese del comparto agro-alimentare si è dotato di un sistema di rintracciabilità interno, o comunque riferito alla parte di filiera di competenza, ma si pone con sempre più urgenza l'esigenza di poter documentare l'intera catena agro-alimentare da monte a valle, dal produttore al consumatore, dal conferimento, alla lavorazione e/o trasformazione fino alla vendita. L'Unione Europea, con l'approvazione del Regolamento CE n. 178 del 28.01.2002, ha reso obbligatoria a partire dal 1° gennaio 2005 la rintracciabilità agro-alimentare, definendola come la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione animale o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione. Le imprese, con le loro associazioni, organizzazioni, consorzi, ecc. scelgono la rintracciabilità non solo per ottemperare a norme obbligatorie, ma soprattutto come strategia di sviluppo per vari obiettivi: i) una risposta all'inquietudine del mercato e dei consumatori; ii) uno strumento di gestione interna del rischio, di coordinamento di filiera (rapporto clienti/fornitori), di vantaggio competitivo; iii) un requisito di conformità ai fini della certificazione di qualità.

Con il termine di tracciabilità si intende il processo informativo che segue il prodotto da monte a valle della filiera produttiva, mentre per rintracciabilità si intende il processo inverso che permette di risalire da valle a monte le informazioni distribuite lungo la filiera. I benefici per i consumatori si possono sinteticamente ricondurre alla prevenzione delle frodi, all'aumento delle garanzie sulla identificazione di determinati ingredienti presenti nei vari prodotti alimentari, alla possibilità di scelta tra alimenti prodotti in zone e con modalità diverse. La tracciabilità deve essere riferita ad ogni singola porzione di prodotto. Risulta pertanto di estrema utilità, specie per i prodotti animali le cui parti giungono spesso al consumatore separatamente l'una dall'altra, la messa a punto di un sistema di tracciabilità genetica basato su marcatori molecolari, che possa offrire in qualsiasi momento la possibilità di accertare l'origine delle carni, senza i margini di errore evidenziati dai tradizionali sistemi di etichettatura.

Lo sviluppo di marcatori molecolari PCR-derivati per l'analisi del polimorfismo genomico (marcatori SSR) e genico (marcatori SNP) ha reso i sistemi diagnostici per l'identificazione genetica degli animali di semplice applicazione, sostenibili economicamente, affidabili e adatti all'automazione. La tracciabilità genetica rappresenta quindi uno strumento potente ed affidabile per controllare e validare i sistemi di identificazione tradizionali: essa si basa direttamente sul prodotto alimentare e non sull'etichetta del prodotto alimentare, consentendo così di tracciare i tagli di carne fino al singolo animale di origine e di verificare la corrispondenza con i dati dichiarati nella sua etichettatura. Si prospetta quindi la possibilità di un'etichettatura basata sulla tracciabilità genetica a supporto di quella convenzionale che può certamente contribuire a salvaguardare il consumatore e a tutelare il produttore e il trasformatore da possibili errori, frodi o alterazioni di varia natura.

Biotechologie genetiche: animali transgenici e clonazione

Le tecniche di ingegneria genetica e di coltura in vitro sono state applicate anche agli animali allo scopo di trasferire geni eterologhi nelle cellule uovo fecondate o nelle cellule embrionali per ottenere così individui transgenici, oppure di clonare animali da laboratorio e da allevamento.

L'ottenimento di mammiferi transgenici, corredati di caratteri nuovi che non avrebbero mai potuto acquisire per via sessuale, può essere raggiunto trasferendo speciali vettori plasmidici in cellule uovo fecondate oppure in embrioni costituiti da poche cellule. I metodi attualmente utilizzabili per il trasferimento genico negli animali prevedono: i) l'integrazione di geni in embrioni ad uno stadio molto precoce per mezzo di retrovirus; ii) la microiniezione di DNA esogeno nel nucleo spermatico di una cellula uovo appena fecondata; iii) il trasferimento di nuclei geneticamente modificati in cellule uovo private del materiale nucleare; iv) l'incorporazione nell'embrione, ad uno stadio di sviluppo molto precoce, di cellule staminali geneticamente modificate; v) il trasferimento di geni mediato da spermatozoi.

Il metodo più utilizzato è quello basato sulla microiniezione di DNA: esso consente di inserire il gene esogeno direttamente nel nucleo spermatico ingrandito (pronucleo) di una cellula uovo appena fecondata. In questo caso sono necessarie femmine donatrici superovulate che dopo essersi accoppiate debbono essere sacrificate al fine di prelevarne le cellule uovo fecondate. Il gene può quindi essere integrato nel genoma dello zigote che, opportunamente trapiantato in una femmina ricevente, potrà svilupparsi fino alla nascita di uno o più animali transgenici. Una parte della progenie ottenuta dalle cellule uovo impiantate presenterà il gene esogeno in tutte le proprie cellule. Poiché l'integrazione del transgene avviene solitamente in singola copia, determinando una condizione emizigotica, sarà necessario incrociare gli animali transgenici tra loro allo scopo di selezionare nella discendenza quelli che presentano il transgene su entrambi i cromosomi omologhi. Tali animali sono in grado di trasmettere il transgene a tutte le cellule della linea germinale.

La tecnica basata sul trapianto nucleare è sostanzialmente quella applicata nel 1997 dal gruppo di Ian Wilmut del *Roslin Institute* di Edimburgo (Scozia) per la clonazione della famosa pecora *Dolly*. In questo caso specifico vennero impiegati nuclei in fase di quiescenza di cellule epiteliali di ghiandola mammaria in coltura per la fusione con cellule uovo provenienti da un'altra pecora di razza diversa e preventivamente private del nucleo. Dopo la fusione, la cellula somatica rinucleata fu allevata *in vitro* fino allo stadio embrionale, quindi venne impiantata nella madre adottiva. Tale esperimento ha dimostrato, per la prima volta, la possibilità di ottenere individui completi partendo da cellule somatiche in coltura, e la totipotenza del nucleo di una cellula di individuo adulto differenziata, aprendo pertanto nuove prospettive per la produzione di animali geneticamente modificati e per la loro clonazione. L'ottenimento di cloni transgenici prevede il trasferimento dei geni esogeni nelle cellule somatiche in coltura anziché nelle cellule uovo fecondate o nelle cellule embrionali. I nuclei prelevati dalle cellule donatrici geneticamente modificate possono essere inseriti nelle cellule riceventi enucleate in modo che il gene esogeno possa trasmettersi alla discendenza ed esprimersi in ogni suo componente.

Tra gli animali domestici, oltre che nelle pecore, soggetti transgenici sono stati ottenuti nei maiali, nelle capre e nei polli. Gli animali transgenici consentono potenzialmente l'ottenimento di proteine in modo migliore rispetto ai sistemi alternativi (batteri ricombinanti): la proteina codificata dal gene esogeno può essere secreta nei fluidi corporei, come latte e sangue, è di raccolta agevole e può essere prodotta in grandi quantità. In questi casi, l'interesse delle biotecnologie farmaceutiche è orientato verso la creazione di animali transgenici quali vacche, pecore e capre, e in misura minore anche conigli e maiali, modificati usando geni umani sotto il controllo di promotori esprimibili nella ghiandola mammaria, capaci di secernere le proteine unicamente nel latte. Negli ultimi anni si è sviluppata così una nuova industria, quella che utilizza gli animali transgenici come "bioreattori" allo scopo di produrre molecole con proprietà farmaceutiche o alimenti con attività terapeutiche.

Allo stato attuale delle conoscenze, le possibili applicazioni degli animali transgenici in campo zootecnico e biomedico sono molteplici. In particolare, la transgenesi consente potenzialmente di: i) introdurre geni di resistenza a patogeni negli animali da allevamento; ii) migliorare le caratteristiche qualitative dei prodotti zootecnici, principalmente carne, latte e lana; iii) produrre proteine di interesse farmaceutico e biotecnologico; iv) ottenere organi per xenotrapianti con minori rischi connessi alle reazioni di rigetto; v) creare animali modello da laboratorio per lo studio di diverse patologie umane o per la ricerca biologica.

Un settore sul quale le applicazioni biotecnologiche potrebbero fornire un contributo molto importante è quello connesso ad un aumento della resistenza a malattie negli animali in produzione zootecnica. Si ritiene che questo settore potrà avere un forte impatto sulla sicurezza alimentare e sulla salute pubblica. La resistenza alla BSE è sicuramente un aspetto di primaria rilevanza: nei topi è stato dimostrato che soggetti nei quali il gene *PrP*, codificante la proteina prionica responsabile delle encefalopatie trasmissibili in diverse specie di animali, è stato inattivato sono resistenti alla BSE. Le epidemie più preoccupanti che hanno recentemente colpito il genere umano – AIDS, influenza aviaria (tipo H5N1), SARS, ecc. – sono dovute a virus trasmessi da specie animali. Creare animali resistenti a patologie ed, in particolare, a infezioni virali potrebbe diminuire sensibilmente il rischio per l'uomo di contrarre malattie epidemiche.

Bibliografia di riferimento e approfondimento

- Anderson L. (2001). Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 2: 130-138.
- Anderson S., M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, I.C. Eperon, F. Sanger, I.G. Young (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *J. Molecular Biology*, 156: 683-717.
- Arthur P.F., M. Makarechian, M.A. Price (1998). Incidence of dystocia and perinatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. *Canadian Veterinary Journal*, 29: 163-167.
- Arthur P.F., M. Makarechian, M.A. Price, R.T. Berg (1989). Heterosis, maternal and direct effects in double-muscled and normal cattle: I. Reproduction and growth traits. *J. Animal Science*, 67: 902-910.
- Bertoni G., Aimone Marsan P. (2004). La transgenesi nelle produzioni animali. In: *Biotechnologie: i vantaggi per la salute e l'ambiente*. Ed. 21mo Secolo, pp. 75-94.
- Bidanel J.P., Rothschild M. (2002). Current status of quantitative trait locus mapping in pigs. *PigNews and Information*, 23: 39N-53N.
- Buchanan F.C., T.D. Thue, P. Yu, D.C. Winkelman-Sim (2005). Single nucleotide polymorphisms in the corticotrophin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin genes associated with growth and carcass yield in beef cattle. *Animal Genetics*, 36: 127-131.
- Cappuccio I., C. Marchitelli, A. Serracchioli, A. Nardone, A. Valentini (1998). A G-T transversion induces a stop codon at the *mh* locus in hypertrophic Marchigiana beef subjects. *Animal Genetics*, 29 (Suppl. 1): 51.
- Casas E., S. D. Shackelford, J. W. Keele, R. T. Stone, S. M. Kappes, M. Koohmaraie (2000). Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregation alternate forms of myostatin. *J. Animal Science*, 78: 560-569.
- Casas E. (2002). Identification of quantitative trait loci in beef cattle. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 10 (1): 54-61.
- Casas E., S.N. White, D.G. Riley, T.P. Smith, R. A. Breneman, T.A. Olson, D.D. Johnson, S.W. Coleman, G.L. Bennett, C.C. Jr Chase (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J. Animal Science*, 83: 9-13.
- Casas S., S.J. Smith, Y.W. Zheng et al. (1998). Identification of a gene encoding an acyl

- CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13018-13023.
- Cassandro M., Targhetta C., De Marchi M., Dalvit C., Barcaccia G., Bittante G. (2005). DNA fingerprinting characterization of Italian poultry species. *Proc. of Plant and Animal Genome XIII Conference*. January 15-19, 2005. San Diego, CA (USA), p. 210.
- Ceconello, O. (2003). Messa a punto di un metodo di tracciabilità genetica di razze di polli autoctoni veneti. Tesi di Laurea, Università degli Studi di Padova, Facoltà di Scienze Agrarie.
- Davoli R., Fontanesi L., Cagnazzo M., Scotti E., Buttazzoni L., Yerle M., Russo V. (2003). Identification of SNPs, mapping and analysis of allele frequencies in two candidate genes for meat production traits: the porcine myosin heavy chain 2B (MyH4) and the skeletal muscle myosin regulatory light chain 2 (HumMLC2b). *Animal Genetics*, 34: 221-225.
- Davoli R., Fontanesi L., Zambonelli P., Bigi D., Gellin J., Yerle M., Mile J., Braglia S., 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: 1-18.
- De Beni N. (2002). Applicazioni di tecniche di biologia molecolare per l'identificazione di specie di carni negli alimenti. Tesi di Laurea, Università degli Studi di Padova, Facoltà di Scienze MM. FF. NN.
- Dekkers J.C.M., Hospital F. (2002). The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 3: 22-32.
- Di Stasio L., Sartore S., Albera A. (2001). Lack of association of GH1 and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piemontese cattle. *Animal Genetics*, 33: 61-64.
- Dunn A.J., Berridge C.W. (1990). Physiological and behavioural response to corticotrophin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Research Reviews*, 15: 71-100.
- Geesink G.H., Koohmaraie M. (1999). Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *J. Animal Science*, 77: 2685-2692.
- Glick B.R., Pasternak J.J. (1998). Gli animali transgenici. In: *Biotechnologia molecolare. Principi e applicazioni del DNA ricombinante*. Zanichelli Editore. Bologna. pp. 433-457.
- Gordon J.W., Ruddle F.H. (1981). Integration and stable germ line transformation of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 214: 1244-1246.
- Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., Kemler R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 9065-9069.
- Grisart B., W. Coppieters, F. Famin, Karim L., Ford C., Berzi P., Cambisano N., Nni M., Reid S., Simon P., 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 Research*, 12: 222-231.
- Grobet L., D. Poncelet, J.L. Royo, B. Brouwers, D. Pirottin, C. Michaux, F. Mènissier, M. Zanotti, S. Dunner, M. Georges (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mammal Genome*, 9: 210-213.
- Grobet L., L.J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Bouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Menissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset, M. Georges (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17: 4-5.
- Haegeman A., J.L. Williams, A. Law, A. Van Zeveren, L.J. Peelman (2003). Mapping and SNP analysis of bovine candidate genes for meat and carcass quality. *Animal Genetics*, 34: 349-353.
- Houdebine L.M. (1997). *Transgenic animals: generation and use*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Houdebine L.M. (2002). Transgenesis to improve animal production. *Livestock Production Science*, 74: 255-268.
- Jaenich R. (1996). Germ line integration and mendelian transmission of the exogenous Maloney leukaemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 1260-1264.
- Kambadur R., M. Sharma, T.P.L. Smith, J.J. Bass (1997). Mutations in myostatin (GDF-8) in double-muscling Belgian blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 7: 910-915.
- Karim L., W. Coppieters, L. Grobet, A. Valentini, M. Georges (2000). Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex

- oligonucleotide ligation assay. *Animal Genetics*, 31: 396-399.
- Khatkar M.S., P.C. Thomson, I. Tammien, H.W. Raadsma (2004). Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetics Selection Evolution*, 36 (2): 163-190.
- Koohmaraie M. (1992). The role of Ca³⁺-dependent proteases (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74: 239-245.
- Koohmaraie M. (1994). Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*, 36: 93-104.
- Koohmaraie M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Science*, 43: S193-S201.
- Krakauer D.C., Pagel M., Southwood T.R.E., Zanotto M.A. (1996). Phylogenesis of prion protein. *Nature*, 380: 675.
- Lee S.J., A.C. McPherron (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9306-9311.
- Mannen H., M. Morimoto, K. Oyama, F. Mukai, S. Tsuji (2003). Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle. *J. Animal Science*, 81: 68-73.
- Marsh D.J., G. Hollopeter, D. Huszar, R. Laufer, K.A. Yagaloff, S.L. Fisher, P. Burn, R.D. Palmiter (1999). Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nature Genetics*, 21: 119-122.
- Marchitelli C., A. Crisà, M. L. Checa, M. E. Mirando, S. Dunner, V. Armarger, D. Delourme, H. Leveziel, N. Razaq, J. Williams, A. Valentini (2005). Polymorphisms in genes affecting meat quality in European beef breeds. In: *Proc. of the 16th ASPA Congress, Torino, Italy, June 28-30, 2005*. Vol. 4, Suppl. 2, pp. 34-36.
- McCormick A., H. Brady, L.E. Theil, M. Karin (1990). Regulations of the pituitary-specific homeobox gene GHF1 by cell autonomous and environmental cues. *Nature*, 345: 829-832.
- McPherron A.C., S. J. Lee (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12457-12461.
- Menissier F. (1982). General survey of the effect of double muscling on cattle performance. In: *Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production* (Ed. J.W.B King e F. Menissier), Martinus Nijhoff Publishers, The Hague. pp. 23-53.
- Miranda M.E., S. Dunner, Y. Amigues Y. et al. (2000). SNP screening at the myostatin gene level in European cattle breeds. *Proc. of the 27th Intl. Conference on Animal Genetics, Minneapolis, USA*.
- Monastersky, G.M., J.M. Robl (1995). *Strategies in transgenic animal science*. American Society for Microbiology Press. Washington, D.C. (USA).
- Morris C.A., N.G. Cullen, S.M. Hickey, A. M. Crawford, D.L. Hyndman, C.D.K. Bottema, W.S. Pitchford (2001). Progress in DNA marker studies of beef carcass composition and meat quality in New Zealand and Australia. In: *Proc. Assoc. Advancement Anim. Breed. Genet. Queenstown, NZ*. Vol. 14, pp. 17-22.
- Page B.T., E. Casas, M.P. Heaton, N.G. Cullen, D.L. Hyndman, C.A. Morris, A.M. Crawford, T.L. Wheeler, M. Koohmaraie, J.W. Keele, T.P.L. Smith (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J. Animal Science*, 80: 3077-3085.
- Pinkert C.A. (2002). *Transgenic animal technology: A laboratory handbook*. Academic Press, San Diego (USA).
- Pritchard L.E., A.V. Turnbull, A. White (2002). Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J. Endocrinology*, 172: 411-421.
- Rios R., I. Karneiro, V.M. Arce, J. Devesi (2002). Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American J. Cell Physiology*, 282: C993-C999.
- Russo V., Fontanesi L. (2001). Il miglioramento genetico animale: potenzialità dei metodi tradizionali e prospettive della genetica molecolare. *Zootecnia e Nutrizione Animale*, 27: 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. *Animal Genetics*, 33: 123-131.

- Russo V., Fontanesi L., Davoli R. (2002). La genetica molecolare in zootecnica. *BioLab Incontri*, 9-13.
- Shaning K.A., R.T. Berg (1985). Growth patterns of muscle, fat and bone, and carcass composition of double muscled and normal cattle. *Canadian J. Animal Science*, 65: 279-293.
- Sharpe P.M., N.B. Haynes, P.J. Buttery (1986). Glucocorticoid status in growth. In: *Control and manipulation of animal growth* (Ed. P.J. Buttery, N.B. Haynes e D.B. Lindsay), Butterworths, London, UK. pp. 207-222.
- Smith T.P.L., E. Casas, C.E. Rexroad III, S.M. Kappes, J.W. Keele (2000). Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J. Animal Science*, 78: 2589-2594.
- Soattin M., G. Barcaccia, M. Cassandro, C. Targhetta, C. Dalvit, G. Bittante (2005). Chicken DNA fingerprinting with M-AFLP and S-SAP markers designed on satellite genomic regions. *Atti del XLIX Convegno Società Italiana di Genetica Agraria*, Potenza, 12-15 Settembre 2005, O.P. 2.05.
- Sudre K., C. Leroux, I. Cassar-Malek, J.-F. Hocquette, P. Martin (2005). A collection of bovine cDNA probes for gene expression profiling in muscle. *Molecular Cellular Probes*, 19: 61-70.
- Tallacchini M., Terragni F. (2004). *Le biotecnologie: aspetti etici, sociali e ambientali*. Bruno Mondadori, pp. 197.
- Taylor W.E., S. Bhasin, J. Artaza, F. Byhower, M. Azam, D.H. Jr Willar, F.C. Jr Cull, N. Gonzalez-Cadavid (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *American J. Physiology Endocrinology Metabolomics*, 280: E221-E228.
- Thaller G., C. Kühn, A. Winter, G. Ewald, O. Bellmann, J. Wegner, H. Zühlke, R. Fries (2003). DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*, 34: 354-357.
- Thomas M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass, R. Kambadur (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biological Chemistry*, 275: 40235-40245.
- Verini Supplizi, A., Silvestrelli, M. (2001). *Biotecnologie genetiche avanzate e medicina veterinaria*. In: *Genetica e biotecnologie genetiche avanzate* (A cura di: A. Grella e F. Veronesi). IRRSAE Umbria e Università degli Studi di Perugia, pp. 105-117.
- Vignal A., Milan D., San Cristobal M., Eggen A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34: 275-305.
- Winter A., W. Krämer, F. A.O. Werner, S. Kollers, S. Kata, G. Durstewitz, J. Buitkamp, J.E. Womack, G. Thaller, R. Fries (2002). Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at quantitative trait locus for milk fat content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 9300-9305.