

Università degli Studi di Sassari
SEDE AMMINISTRATIVA

Università degli Studi di Messina
SEDE CONSORZIATA

Dottorato di Ricerca in
“PRODUZIONE E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE”
(XXI CICLO)

**“Analisi di due geni (*KIT* e *MC1R*) che
influenzano il colore del mantello nel suino e
potenziali applicazioni per la tracciabilità di
razza dei prodotti di suino Nero Siciliano”**

Docente guida:
Chiar.^{mo} Prof. A. ZUMBO

Coordinatore:
Chiar.^{mo} Prof. A. M. COSSEDDU

Correlatore:
Chiar.^{mo} Prof. V. CHIOFALO

Tesi di Dottorato:
Dott. Enrico D'ALESSANDRO

Anno Accademico 2007-08

INDICE

INTRODUZIONE	pag 1
1. Il suino Nero Siciliano	pag 1
1.1 Origini	pag 1
1.2 Caratteri morfologici	pag 2
1.3 Area di allevamento e consistenza	pag 4
1.4 Sistema di allevamento	pag 5
1.5 Prodotti carnei freschi e trasformati	pag 6
1.6 Il latte e le sue caratteristiche	pag 8
2. Sistemi ed importanza della tracciabilità dei prodotti di origine animale	pag 9
3. Miglioramento genetico nella specie suina	pag 11
4. Applicazione della genetica molecolare nella specie suina	pag 15
4.1 Il genoma suino	pag 15
4.2 Quantitative Trait Loci - (QTL)	pag 19
4.3 Introgressione assistita da marcatori (Marker Assisted Introgression: MAI)	pag 21
4.4 La selezione assistita da marcatori (Marker Assisted Selection: MAS) e sua integrazione nei piani di selezione tradizionali	pag 22
5. Applicazione della genetica molecolare alla Tracciabilità dei prodotti di origine animale	pag 25
6. Genetica e biochimica del colore del mantello: alcuni elementi	pag 29
7. Principali loci responsabili del colore del mantello	pag 33
7.1 locus <i>Agouti</i> (A)	pag 33
7.2 loci Brown (B), Albinism (C) e Dilution (D)	pag 33
7.3 locus <i>Extension</i> (E)	pag 34
7.4 locus <i>White</i> (I)	pag 35
8. Applicazione della Genetica molecolare allo studio del colore del mantello	pag 37
8.1 Il gene <i>MC1R</i> nella specie suina	pag 40
8.2 Il gene <i>KIT</i> nella specie suina	pag 42
9. OBIETTIVI	pag 44

Enrico D'Alessandro

Titolo della tesi: Analisi di due geni (*KIT* e *MC1R*) che influenzano il colore del mantello nel suino e potenziali applicazioni per la tracciabilità di razza dei prodotti di suino Nero Siciliano

Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università di Sassari

10. MATERIALI E METODI	pag 46
10.1 Animali	pag 46
10.2 Prelievo del materiale biologico	pag 46
10.3 Estrazione DNA da sangue	pag 46
10.4 Estrazione DNA da bulbi piliferi	pag 47
10.5 Analisi PCR dei geni MC1R e KIT	pag 48
10.6 Analisi gene MC1R	pag 48
10.7 Analisi dei polimorfismi del gene MC1R	pag 48
10.8 Sequenziamento	pag 50
11 Analisi del gene KIT	pag 51
11.1 Analisi in silico e disegno di primers	pag 51
11.2 Analisi della Splice Site Mutation (SSM)	pag 51
11.3 Analisi della duplicazione	pag 52
11.4 Analisi dell'indel nell'introne 18	pag 52
12. Sequenziamento del gene KIT e identificazione di mutazioni	pag 53
13. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag 57
13.1 Analisi di mutazioni nel gene MC1R	pag 57
13.2 Analisi di mutazioni nel gene KIT	pag 62
13.3 Sequenziamento del gene KIT e identificazione di nuove mutazioni	pag 67
14. Possibilità di utilizzo di marcatori nei geni MC1R e KIT per la tracciabilità di razza dei prodotti di Nero Siciliano: eventuali implicazioni	pag 72
15. CONCLUSIONI	pag 74
16. BIBLIOGRAFIA	pag 76

Il suino Nero Siciliano

1.1 Origini

Il suino nero Siciliano è stato espressione, soprattutto in passato, di eterogeneità etnico-genetica con palese polimorfismo, più o meno accentuato in relazione ad aree e indirizzi di allevamento e, ovviamente, al tipo di produzione programmata.

Così nelle aree interne e/o più o meno impervie, meno sensibili ai condizionamenti esterni, gli animali hanno conservato, generalmente, i caratteri dell'antico suino, piuttosto vicino al cinghiale. Le varianti di solito individuate in linea di massima, secondo Pino, erano da riferire alla Casertana (Pelatella) e di seguito alla Cinta Senese, alla Parmigiana tra le italiane; alla Large Black, alla Large White, alla Berkshire tra le inglesi, alla Chester White e alla Poland China tra le americane (Pino N. 1947).

La Casertana figura tra le più antiche introduzioni in Sicilia, anche se discontinue per motivi spesso più commerciali che zootecnici, e questo riguarda anche i cosiddetti Napoletani, in genere pugliesi (Pino N. l.c.) ed è la razza che avrebbe lasciato i maggiori segni nel suino nero Siciliano, riscontrabili (Chiofalo L. 2000) nel suino nero di Calascibetta e in quelli di altre aree siciliane; e così pure il Marchi (1897) che riferisce di influenza della Napoletana e per Cassella (1921) che parla per la Sicilia della razza suina di Calascibetta (provincia Di Enna).

Quest'ultimo aggiunge che il maiale siciliano, come quello del Nord-Africa, origina forse dal Napoletano e che in Sicilia ha subito un considerevole cambiamento per la scarsità dei pascoli e in certe zone anche dei boschi.

La presenza in Sicilia del suino nero, rustico, quasi selvatico, che da sempre ha trovato pascolo e vita in mezzo ai boschi, a giudicare dai

resti fossili e dai riferimenti di scrittori dell'antichità, è accertata nel periodo greco e cartaginese (VII-VI secolo a.C.).

Questo tipo di allevamento tradizionale, con la sua connotazione di primitività, lo troviamo per tutto il Medio Evo e, tranne qualche fluttuazione negativa durante la dominazione araba per i noti motivi religiosi, ai nostri giorni con presenze sparse in tutta la Sicilia e specialmente sui monti Nebrodi (Chiofalo e Liotta, 2003).

In Sicilia sono state annotate e descritte dal Chicoli (1870) numerose razze-popolazioni suine e tutte derivanti dalla napoletana e con "pelame nero d'ordinario": Razza di *S. Agata di Militello* diffusa in tutta la provincia di Messina e nella costa di Catania e Siracusa; Razza di *Castelbuono* originaria dall'incrocio con quella del capo di Buonasperanza; Razza *Trapanese*, sparsa in tutta la provincia di Trapani, Agrigento e Caltanissetta e più rustica delle precedenti; Razza *Patornese*, diffusa nel versante nord dell'Etna molto vicina al Sus scrofa L.; Razza *Cesarotana* diffusa nel territorio del comune di Cesarò (ME) e la Razza di *Troina* (EN).

Oggi parecchie di queste razze sono scomparse, altre si sono modificate andando a costituire una sola razza popolazione suina con caratteristiche ben definite, il suino Nero Siciliano.

1.2 Caratteri morfologici

Lo studio dell'esteriore conformazione, oltre a definire le dimensioni e le proporzioni diametriche degli animali viene utilizzato anche per stimarne l'attitudine e quindi il valore economico. Un requisito importante, nel descrivere la morfologia di un animale è l'oggettività e questa può essere ottenuta soltanto tramite il rilevamento di misure. Gli studi biometrici tradizionali condotti sulle razze/popolazioni, spesso tenute allo stato brado e quindi di difficile avvicinamento, danno un'idea

di quanto il rilevare misure sugli animali sia un'attività impegnativa e con risultati variabili.

Per superare alcune di queste difficoltà, numerose sono state le innovazioni sperimentate, tra cui l'analisi d'immagine, nella specifico la sezione di Zootecnica e Nutrizione Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Messina ha avviato uno studio che ha avuto come obiettivo quello di valutare l'applicabilità del sistema di analisi di immagine computerizzata nella valutazione morfologica delle razze zootecniche siciliane tra cui il suino Nero.

Il suino Nero Siciliano presenta la cute di colore nero ardesia, su cui si impiantano robuste setole nere che sul tratto cervicale, garrese, dorso, lombi raggiungono la lunghezza di 10 cm circa, assumendo la forma di una criniera, tanto da richiamare l'aspetto del cinghiale. Alcuni soggetti possono avere la faccia parzialmente o totalmente bianca (suino facciolo).

I maschi raggiungono un'altezza al garrese di 60-65 cm. La testa è allungata con profilo fronto-nasale tendenzialmente diritto, a volte con segni di celoidismo; grugno appuntito e robusto; orecchie mediamente sviluppate dirette obliquamente in alto con punte portate in avanti.

Presenza, non sempre, di tettole alla mandibola, collo di medio sviluppo, tronco non eccessivamente lungo, depresso ai lati, addome leggermente avallato, linea dorso-lombare convessa, groppa inclinata, arti relativamente lunghi e poveri di muscoli, unghie forti da gran camminatore, coda a spirale (Chiofalo e Liotta, 2003). Il numero dei capezzoli nel maschio e delle mammelle nella femmina non deve essere inferiore a 10.



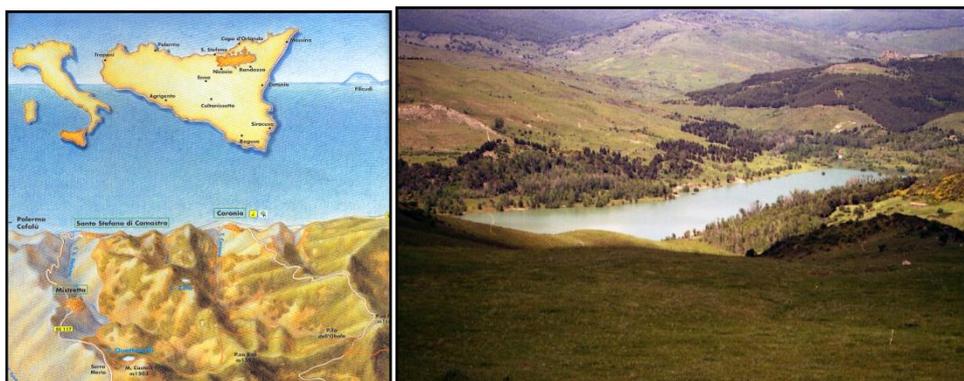
Suini “Nero Siciliano”

1.3 Area di allevamento e consistenza

La scomparsa graduale dei boschi, che anticamente coprivano buona parte delle montagne siciliane, attualmente brulle, rocciose e spesso ricche di incolti produttivi, ha influito notevolmente sull'allevamento dei suini pascolanti, i quali si sono ritirati man mano al centro dell'isola, laddove ancora qualche bosco di quercia, di cerro o di faggio può fornire difesa e disponibilità alimentari.

Il suino Nero Siciliano è presente soprattutto nella Sicilia orientale, in provincia di Messina, sui monti Nebrodi, tanto da essere indicato generalmente come suino nero dei Nebrodi, rappresentandone, fra l'altro, l'ecotipo più importante per omogeneità e consistenza (Chiofalo, 2007).

Nel territorio del Parco dei Nebrodi ritroviamo una significativa consistenza di suini Nero Siciliano, distribuiti in 111 allevamenti (di cui 34 iscritti al Registro Anagrafico), con circa 800 scrofe (ANAS, 2008)



Parco dei Nebrodi – areale di allevamento del suino Nero Siciliano

1.4 Sistema di allevamento

Il sistema di allevamento del suino Nero Siciliano è prevalentemente *plein air*, alimentato con orzo germinato e favino o con mangime schiacciato o pellettato del commercio razionato in ragione del 3% del peso vivo. Questo sistema di allevamento permette ai suini di utilizzare anche la vegetazione spontanea del sottobosco (principalmente ghiande) molto variabile in relazione al periodo dell'anno.

Nel sistema di allevamento *plein air* i ricoveri per la maternità sono concepiti per ospitare una sola scrofa con la nidiata, hanno una forma di tronco di cono rovesciato e sono costruite in materiale diverso a seconda se di tipo tradizionale o industriale, comunque con pavimento in terra.

Per quanto riguarda invece i suini in accrescimento e all'ingrasso è possibile effettuare un unico sistema di gestione se si lavora con gruppi omogenei di animali, altrimenti è necessario suddividere l'area in lotti in base alla categoria di suini.

Il ciclo accrescimento-ingrasso inizia con suini appena svezzati (circa 60d) con un peso vivo medio di circa 15 kg e si prolunga per circa 4/5 mesi per ottenere soggetti da destinare al consumo diretto (da macelleria) con un peso di circa 60/70kg. Soltanto per i soggetti da destinare alla trasformazione, l'allevamento si protrae per altri 3/4 mesi per ottenere soggetti dal peso di circa 110 kg.

Ogni tipo di recinto è comunque munito di una zona ombreggiata (naturalmente o artificialmente), abbeveratoi, mangiatoie e di una buca con acqua che permetta agli animali di potersi bagnare per una corretta termoregolazione (Liotta, 2006).

1.5 Prodotti carnei freschi e trasformati

E' il caso di ricordare pure che le qualità nutritive delle carni del suino nero Siciliano sono state trovate sempre eccellenti, tanto dal punto di vista salutistico che organolettico, quasi edonistiche, e gli aspetti voluttuari spesso sono testimonianza di genuinità e quindi di qualità nel senso di rispondenza bio-nutritiva (Chiofalo, 2007).

Per quanto riguarda la composizione chimica della carne (Zumbo *et. al.* 2003) è stato accertato un contenuto in proteine significamene più elevato (22,79%) nei soggetti allevati in "plein-air" rispetto a quelli tenuti allo stato brado (20,33%) mentre nessuna differenza in relazione alla tipologia di allevamento è stata osservata sul tenore in ceneri (1,05%) e in lipidi intramuscolari pari a 3,10%

Significativi i risultati riguardanti le peculiarità qualitative-organolettiche dei prodotti (carne-lardo, ecc.) e i giudizi sensoriali affidati ai vari panel-test (prove di degustazione) effettuati da

consumatori di diversa estrazione, che non hanno evidenziato differenze fra le due diverse tipologie di produzione (plein air vs brado).

La frazione lipidica delle carni, analizzata con gas-cromatografia ultraveloce (Mondello *et. al.*, 2003), ha visto come componente più importante l'acido oleico (C18:1) pari al 43.8 - 45.7%, seguito dall'acido palmitico (C16:10) 21.7 – 23.9% e dall'acido stearico (C18:0) 11.4 – 13.7%. E' stata anche accertata la presenza di notevoli quantità di acido linoleico (C18:2) 8.46 – 9.98%.

Per quanto concerne i trasformati, le caratteristiche sensoriali del salame S. Angelo, preparato con carni del suino Nero Siciliano, hanno evidenziato un rapporto carne/grasso, tenerezza, colore della carne, grana e struttura della fetta: ideali. Flavour aromatico, colore del grasso soddisfacente, succosità buona (Liotta *et. al.* 2003). La composizione chimica dei salami preparati con carni di suino Nero Siciliano è risultata ricca in proteine (21,92%) e particolarmente magra, con un tenore in grasso pari a 18,58% peraltro di notevole valore nutrizionale dal punto di vista acidico con un rapporto tra acidi grassi insaturi e saturi pari a 1,40, e con indici di qualità di 0,55 per l'indice Aterogenico e 1,33 per quello Trombogenico (Chiofalo *et al.*, 2003).

La composizione chimica del prosciutto del suino Nero Siciliano (Chiofalo *et. al.* 2005) per grassi (7,07%) e proteine (30,80%) è risultata simile a quella del prosciutto di Parma. Acidi grassi più rappresentati: palmitico (22,55%), stearico (11,08%), oleico (35,49%) e linoleico (16,75%), come si riscontra pure nel prosciutto iberico, anche se con piccole differenze, e in quello di Parma. Rispetto a questo la classe dei saturi (SFA) è risultata più bassa (35,49%), vicina quella dei monoinsaturi (43,78%) e superiore quella dei polinsaturi (20,72%), a testimonianza delle migliori caratteristiche nutritive del prodotto siciliano. Come conseguenza l'indice di insaturità (1,81) si è allineato

con quello del prosciutto iberico ed è apparso superiore a quello del prosciutto di Parma.

Gli indici di qualità, aterogenico (0,42) e trombogenico (0,98), correlati con fatti patologici, sono risultati inferiori nei prosciutti dei suini neri rispetto a quelli bianchi.

A proposito di questi sono stati realizzati prosciutti, tipo Nebrodok, da considerare una sorta di Pata Negra nostrano, e così pure per quanto riguarda il lardo con tipologie di grande interesse, rese più attuali sotto il profilo dietetico da una attenta lettura della composizione acidica. Per non parlare di altre specialità tipiche in itinere quali Mandolino di Sicilia®, Capocollo e Lonza (Todaro *et al.*, 2004).

1.6 Il latte e le sue caratteristiche

La produzione quanti-qualitativa di latte è alla base per la determinazione dei fabbisogni nutritivi della scrofa in lattazione, inoltre il latte costituisce l'alimento principale per i suinetti, quindi la conoscenza della sua composizione può fornire indicazioni valide per la formulazione di mangimi prestarter, in modo particolare per le razze/popolazioni suine autoctone come il Nero Siciliano.

In quest'ottica studi condotti su scrofe Nero Siciliano in lattazione (Liotta *et al.*, 2007), previa mungitura completa di più mammelle e somministrazione di ossitocina, hanno permesso di definire le caratteristiche chimiche del latte di scrofa (pH: 7.07; Grasso: 6,34%; Proteine: 4,72%; Lattosio: 5,09%; Energia: 4525 kJkg⁻¹)

2. Sistemi ed importanza della tracciabilità dei prodotti di origine animale

Nel settore delle produzioni animali per tracciabilità si intende la capacità di mantenere il controllo dell'origine dei prodotti e dell'identità degli animali lungo i diversi passaggi della filiera, dall'allevatore al dettaglio.

La necessità di mettere a punto sistemi efficaci ed economici per tracciare i prodotti di origine animale ha assunto un'importanza sempre maggiore da quando la globalizzazione del commercio e l'industrializzazione dei processi produttivi hanno reso impossibile il controllo diretto della produzione alimentare da parte dei consumatori.

Inoltre, in Europa, la fiducia nella sicurezza degli alimenti di origine animale è notevolmente diminuita a seguito delle recenti emergenze BSE e diossina.

La tracciabilità, oltre a fornire un sistema di controllo per l'igiene e la sicurezza degli alimenti, permette di garantire il consumatore da possibili frodi, salvaguardare categorie a rischio (come ad esempio persone che soffrono di allergie o di intolleranza a particolari alimenti o additivi) e tutelare scelte alimentari individuali per motivi religiosi o salutistici.

Inoltre, la possibilità di verificare con sistemi oggettivi, l'origine di prodotti animali accresce il valore della certificazione di qualità, come ad esempio i prodotti IGP e DOP, favorendo lo sviluppo di aree ad economia marginale attraverso la valorizzazione di prodotti tipici e di nicchia e fornendo incentivi alla conservazione di razze locali mantenendo la biodiversità.

Uno dei primi sistemi di tracciabilità fu quello messo a punto per l'identificazione e la registrazione dei bovini, per far fronte alla difficile situazione venutasi a creare a seguito della crisi BSE, e per la quale il Parlamento Europeo ha emanato il Regolamento CE 1760/2000 riguardante il sistema d'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carne, al fine di identificare la carcassa, il quarto, i tagli di carne, il singolo animale oppure il gruppo di animali.

L'identificazione e la registrazione dei bovini, si applica utilizzando marche auricolari e passaporti che accompagnano l'animale; risulta pertanto evidente, che le informazioni fornite dal sistema di identificazione ed etichettatura siano basate sul controllo della documentazione cartacea e/o elettronica.

I flussi informativi, però possono essere soggetti a modifiche e sofisticazioni o semplicemente ad errori, pertanto, si è reso necessario trovare strumenti idonei ad affiancare i sistemi, già in uso, nei processi di tracciabilità e di rintracciabilità dei prodotti di origine animale.

Lo strumento più idoneo, e che meglio si adatta a queste tipologie mercato, è rappresentato dall'analisi del DNA.

3. Miglioramento genetico nella specie suina

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

La selezione ufficiale ha avuto inizio negli anni '30. Le razze interessate erano la Large White e alcune razze locali.

Per ogni razza e per ogni provincia interessata furono costituiti i cosiddetti "nuclei di selezione", nei quali, i singoli animali

erano registrati su schede e sottoposti a valutazione morfologica per il miglioramento della conformazione e, quando possibile, al controllo ponderale per misurare la velocità di crescita. Sulle scrofe venivano rilevati e registrati numerosi caratteri materni, come età al primo parto, intervallo tra i parti, numero nati e svezzati per parto.

Per i verri non si attuava alcun controllo, ma c'era l'aspirazione ad attuare un controllo di progenie sul modello di quanto avveniva in Danimarca (Buiatti, 1979).

L'organizzazione unitaria della selezione dei suini a livello nazionale risale agli anni '60 del secolo scorso. In quegli anni, infatti, nasce l'Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS), come associazione di secondo grado delle Associazioni provinciali ed interprovinciali di allevatori, e viene costituito il Libro genealogico della specie suina.

Il caposaldo del programma nazionale di selezione fu l'introduzione della valutazione genetica dei verri presso i centri genetici appositamente costruiti. La valutazione dei verri iniziò con il metodo del *progeny test* sull'esempio del Libro genealogico danese che lo aveva messo a punto e lo praticava con successo da oltre cinquant'anni.

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

Inoltre per venire incontro alle esigenze dell'industria di trasformazione, che lamentava uno scadimento della qualità della carne

(Russo, 1988), si introdusse il test col gas alotano per identificare ed eliminare i soggetti affetti dalla malattia ereditaria *Porcine stress syndrome*, che sono predisposti alla produzione di carni PSE.

Un dei più importanti obiettivi di selezione è infatti l'eliminazione dell'allele recessivo del locus Alotano responsabile del difetto PSE (*Pale, Soft, Exudative*) della carne, oltre che della sindrome da stress del suino (*Porcine Stress Syndrome, PSS*). La carne che presenta questo difetto è caratterizzata da masse muscolari di colore bianchiccio, flaccide, che lasciano trasudare dalla superficie di taglio notevoli quantità di liquido sieroso.

Le conseguenze economiche sono molto rilevanti perché il difetto altera le più importanti caratteristiche qualitative della carne, quali il colore, la consistenza e il potere di ritenzione idrica ed interessa le masse muscolari che costituiscono i tagli più pregiati, come la lombata ed il prosciutto.

Le caratteristiche anormali conferite dalla PSE rendono la carne meno attraente per il consumatore e meno idonea alla trasformazione in salumi tipici di alto pregio, quali sono i prosciutti crudi di Parma e di S. Daniele. Infatti lo scarso potere di ritenzione idrica di queste carni provoca un aumento dei cali di stagionatura e della frequenza dei difetti di fabbricazione (Russo e Nanni Costa, 1995).

Inoltre la mortalità per PSS soprattutto durante il trasporto provoca notevoli perdite dal punto di vista economico. Il test fenotipico dell'Alotano, che consiste nel far inalare questo anestetico ai suini, utilizzato in Italia fino 1996, si era rivelato utile per ridurre la frequenza dell'allele recessivo nelle razze sottoposte a selezione perché consentiva di distinguere ed eliminare dalla riproduzione i soggetti omozigoti recessivi **nn**, ma non ne permetteva l'eliminazione, perché non riusciva a distinguere gli omozigoti normali **NN** dagli eterozigoti portatori **Nn** (Russo et al., 1996).

Ciò è stato reso possibile con l'utilizzo della genetica molecolare che ha individuato in una mutazione nel gene *Calcium Release Channel (CRC)*, detto anche *Ryanodine Receptor 1 (RYR1)*, localizzato sul cromosoma 6, la causa del difetto (Fujii et al., 1991).

Per ogni verro vengono elaborati gli indici genetici per caratteri rilevati e un indice di selezione aggregato.

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

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

In Italia viene attuato anche uno schema di selezione per il suino da consumo fresco. Lo schema attualmente interessa soltanto la razza Pietrain. Gli obiettivi di selezione sono l'aumento dei tagli magri, il miglioramento della velocità di crescita e l'eliminazione del gene per la sensibilità all'Alotano.

4 Applicazione della genetica molecolare nella specie suina

4.1 Il genoma suino

La genomica applicata al suino trova le sue basi a partire dall'inizio del 1900 con i primi studi effettuati per identificare il numero dei cromosomi del cariotipo della specie (Wødsedalek, 1913). Solo successivamente con l'introduzione delle moderne tecniche citogenetiche è stato possibile stabilire il corretto numero di cromosomi per *Sus scrofa domestica* ($2n = 38$) (Gimenez-Martin *et al.*, 1962; McConnell *et al.*, 1963; Stone, 1963). Nel 1988 venne proposta una nomenclatura standardizzata, basata sul bandeggio G e R del cariotipo suino (Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig, 1988), la quale costituisce lo standard attualmente seguito.

Decine di aberrazioni cromosomiche, aberrazioni numeriche e strutturali (traslocazioni e duplicazioni/delezioni), sono state segnalate in letteratura, la maggior parte delle quali con effetti deleteri, in

particolare sulle caratteristiche riproduttive di verri e scrofe (Chowdhary, 1998; Gustavsson, 1990).

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

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

Il numero di marcatori individuati sulla mappa genica del suino è via via sempre più cresciuto grazie anche al pieno utilizzo della genetica molecolare.

Nel 1985 il numero di geni mappati nel genoma suino era di 35 (Lalley e McKusick, 1985), nel 1989 era di 40 (Lalley *et al.*, 1989) e nel 1992 era di 84 (Echard *et al.*, 1992). Nel 1993 il numero di marcatori assegnati a cromosomi mediante analisi di linkage o mappaggio fisico e a gruppi di linkage non identificati su singoli cromosomi era di 172 (Andersson *et al.*, 1994). Successivamente, grazie allo sforzo di diversi gruppi di ricerca europei e americani e grazie al lavoro del consorzio PiGMaP (che ha riunito un gran numero di laboratori in diversi paesi, fra i quali anche l'Italia è stata rappresentata con il contributo dell'Università di Bologna) sono state pubblicate diverse mappe genetiche (di prima e seconda generazione) con una densità sempre più elevata di marcatori (Ellegren *et al.*, 1994; Rohrer *et al.*, 1994;

Archibald *et al.*, 1995; Marklund *et al.*, 1996; Rohrer *et al.*, 1996; Mikawa *et al.*, 1999).

L'utilizzo delle tecniche di ibridazione *in situ* di sonde sul cariotipo suino (Chowdhary, 1998) e la costruzione di pannelli di ibridi di cellule somatiche suino/roditore (es. Yerle *et al.*, 1996; Zijlstra *et al.*, 1996) ha permesso di agganciare ed orientare le mappe genetiche ai singoli cromosomi e ha permesso la costruzione della mappa citogenetica (Yerle *et al.*, 1995; 1997).

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

Lo sviluppo di strumenti di mappaggio innovativi ad alta risoluzione, quali i *radiation hybrid panel (RH-panel)* che accoppiano le potenzialità dei pannelli di ibridi di cellule somatiche con la maggiore risoluzione dovuta alla frammentazione del DNA causata da diverse dosi di radiazione, rappresentano l'evoluzione successiva delle mappe genetiche e permettono un'alta risoluzione di mappaggio senza la necessità di identificare polimorfismi come nel caso delle mappe genetiche.

Per quanto riguarda il suino, la comunità scientifica ha sviluppato inizialmente due *RH-panel*, il 7000 rad INRA/University of Minnesota radiation hybrid panel (IMpRH; Yerle *et al.*, 1998) e il Pig T43 whole genome panel (Archibald & Goodfellow, non pubblicato, disponibile presso Research Genetics).

Grazie a questi due RH-panel sono già state costruite le prime *radiation hybrid map (RH map)* per la specie suina (Hawken *et al.*, 1999; Rattink *et al.*, 2001; Rink *et al.*, 2002).

Un terzo pannello (SSRH, 5000 rad), sviluppato in Giappone ha permesso di ottenere una prima mappa RH a media risoluzione (Hamasima *et al.*, 2003).

Un quarto pannello, il IMNpRH2 (Yerle et al., 2002), sviluppato grazie ad una collaborazione tra l'INRA, l'University of Minnesota e l'University of Nevada, è stato costruito utilizzando una dose di radiazioni maggiore (12000 rad) in modo da frammentare di più il genoma suino e quindi permettere una maggiore risoluzione di mappaggio.

Per poter passare direttamente dalle mappe genetiche o dalle *RH map* alla dimensione fisica effettiva del DNA per consentire il sequenziamento di regioni delimitate da due marcatori e per costruire contig, nella maggior parte delle principali specie di interesse zootecnico sono stati sviluppati altri strumenti quali le librerie di larghi inserti (librerie YAC, BAC, PAC o P1), alcune delle quali sono disponibili anche commercialmente.

Per la specie suina sono state costruite inizialmente diverse librerie YAC (Leeb et al., 1995; Alexander et al., 1997; Rogel-Gaillard et al., 1997) e successivamente gli sforzi sono stati rivolti verso la costruzione di librerie BAC (Rogel-Gaillard et al., 1999; Anderson et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Fahrenkrug et al., 2001) che presentano minori problemi di chimerismo e riarrangiamento rispetto alle librerie YAC e una maggiore facilità di isolamento del DNA clonato.

Grazie all'identificazione e al mappaggio di geni a funzione nota è emerso che per gruppi di geni vi è una conservazione di sintenia nei cromosomi tra diverse specie (O'Brien et al., 1999) da cui nasce il concetto di mappaggio comparativo che ha come obiettivo il trasferimento e il confronto delle informazioni relative alla posizione di geni tra le varie specie, con particolare riferimento al confronto tra uomo/topo e gli animali di interesse zootecnico (Gellin et al., 2000).

Per quanto riguarda i primi confronti tra il genoma umano e il genoma suino, grazie alle informazioni di mappaggio comparativo, è stato possibile identificare un minor numero di riarrangiamenti tra il

genoma umano e quello suino che tra il genoma umano e quello di topo (Johansson *et al.*, 1995; Wakefield e Graves, 1996).

Un metodo alternativo di mappaggio comparativo, detto Zoo-FISH o *chromosome painting* (Chowdhary *et al.*, 1998), che prevede l'ibridazione di cromosomi di una specie al cariotipo di un'altra specie, ha permesso, anche in assenza di informazioni sul mappaggio di geni, di stabilire regioni cromosomiche in cui vi è conservazione di sintenia.

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

Come primo passaggio nel sequenziamento del genoma del suino, sull'esempio di quanto è stato fatto per l'uomo (Adams *et al.*, 1995), sono state e si stanno caratterizzando le regioni trascritte grazie al sequenziamento di *expressed sequence tags* (EST). Le EST sono brevi sequenze di cDNA e rappresentano l'attività trascrizionale dei diversi tessuti e quindi i geni, spesso a funzione non nota, che pur costituendo una minima percentuale del DNA di un genoma rappresentano la parte più importante.

Nel suino sono state costruite alcune librerie a cDNA tessuto specifiche tra le quali si possono ricordare alcune da intestino (Wintero *et al.*, 1996; Dvorak *et al.*, 2005), da vari tessuti riproduttivi femminili (Tosser-Klopp *et al.*, 1997; Fahrenkrug *et al.*, 2002; Caetano *et al.*, 2003), cervello (Nobis *et al.*, 2003), da tessuti collegati alla risposta immunitaria (Rink *et al.*, 2002) o specifiche dello stadio embrionale (Smith *et al.*, 2001; Fahrenkrug *et al.*, 2002) dalle quali sono state isolate una buona parte delle EST disponibili in banca dati per questa specie.

4.2 Quantitative Trait Loci - (QTL)

Insieme allo sviluppo dei marcatori del DNA e alla costruzione delle mappe genetiche sono stati sviluppati anche disegni sperimentali e

metodi statistici efficienti per determinare associazioni tra marcatori e QTL (Soller, 1991).

In particolare nel suino le strategie utilizzate per il mappaggio e l'identificazione di QTL possono essere raggruppate nel *genome scanning* e nell'approccio del gene candidato. Il *genome scanning*, effettuato in genere con marcatori microsatelliti, distribuiti in modo da coprire tutto il genoma o solo alcuni cromosomi e tipizzati in popolazioni artificiali (back-cross e incroci a tre generazioni), è stato utilizzato in molti esperimenti.

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

L'informazione dei marcatori genetici è in grado di fornire benefici all'attività di miglioramento genetico anche quando i marcatori non evidenziano associazioni significative con QTL a effetto sufficientemente ampio sui caratteri quantitativi di interesse (Villanueva et al., 2005). In tali casi, l'informazione sui marcatori genetici può essere utilizzata per incrementare l'accuratezza nella stima dei rapporti di parentela additiva utilizzati nell'ambito delle procedure BLUP Animal Model.

La matrice dei rapporti di parentela additiva, utilizzata in tali procedure, viene comunemente determinata utilizzando esclusivamente le informazioni genealogiche disponibili e contiene le proporzioni attese di alleli identici per origine in comune tra individui diversi. L'utilizzazione dell'informazione genomica consente la stima delle proporzioni esatte in modo più preciso.

In uno studio di simulazione, Villanueva et al. (2005) evidenziano che l'entità dei benefici, conseguenti all'utilizzazione dei marcatori genetici per la stima della matrice dei rapporti di parentela additiva,

dipende dalla dimensione del genoma (maggiore per genomi di dimensione contenuta) e dal numero di marcatori considerati (maggiore per numeri elevati di marcatori). L'utilizzazione di marcatori distribuiti secondo intervalli di mappa pari a 10 cM lungo il genoma garantisce il raggiungimento dei massimi benefici in termini di risposta alla selezione.

L'impiego di routine dell'informazione genomica per la stima dei rapporti di parentela additiva nelle procedure BLUP è tuttavia condizionato a una riduzione dei costi delle tecnologie di analisi dei marcatori.

L'applicazione della genetica molecolare e l'integrazione delle informazioni che derivano dallo studio del genoma suino con i sistemi di selezione tradizionali potranno nel breve medio periodo portare ad alcune innovazioni nel settore con vantaggi sul piano dell'efficienza della selezione. Alcuni aspetti e possibilità dell'applicazione e dell'integrazione delle informazioni molecolari per il miglioramento genetico nel suino sono di seguito illustrate nelle linee generali.

4.3 Introggressione assistita da marcatori (*Marker Assisted Introgression: MAI*).

Il principio generale di un programma di introggressione consiste nell'introdurre nel genoma di una razza o linea, complessivamente considerata migliore, un gene o una regione cromosomica associata a un QTL, presente in un'altra razza o linea che è considerata inferiore dal punto di vista produttivo e commerciale.

Lo scopo dell'introggressione è quello di fissare l'allele favorevole nella popolazione complessivamente migliore, introducendo in essa il meno possibile della restante parte del genoma della razza inferiore. Lo schema di un programma di introggressione prevede: l'incrocio tra animali della razza inferiore (donatrice) con animali di quella migliore (ricevente); gli animali F1, eterozigoti per l'allele favorevole sono

reincrociati con animali della razza ricevente; dalla generazione F2 vengono selezionati gli animali eterozigoti che verranno reincrociati con animali della popolazione ricevente e questo schema si ripete fino a quando la proporzione teorica del genoma della razza donatrice può essere considerato trascurabile (fase di reincrocio). Alla fine della fase di reincrocio si effettuano accoppiamenti tra soggetti eterozigoti per ottenere individui omozigoti per l'allele favorevole in modo da poterlo fissare nella popolazione (fase di fissazione).

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

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

L'uso dei marcatori per la selezione diretta è particolarmente utile quando l'identificazione fenotipica dell'allele oggetto di introggressione presenta qualche difficoltà o è troppo onerosa, come nei casi in cui l'allele è recessivo, si esprime in un solo sesso o si manifesta tardi nella vita dell'animale.

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

L'individuazione di associazione tra marcatori e QTL permette di frazionare un carattere quantitativo a variazione continua in un certo numero di *loci* mendeliani a variazione discontinua, chiaramente identificabili, e di attuare una selezione assistita da marcatori. Infatti, se un allele di un *locus* ad effetto quantitativo e un marcatore sono geneticamente associati, saranno trasmessi dai genitori ai figli in modo congiunto.

Di conseguenza, utilizzando gli alleli dei marcatori per il carattere in selezione si potranno scegliere gli animali portatori delle varianti più

favorevoli. Da ciò la selezione può trarre vantaggio, integrando gli attuali metodi matematico-statistici di valutazione genetica dei riproduttori con le informazioni sui geni maggiori o su marcatori associati a QTL.

La selezione assistita da marcatori può influire favorevolmente su tutti i fattori che determinano il progresso genetico (accuratezza della selezione, intensità della selezione e intervallo di generazione) e può aumentare l'efficacia di quella attuata esclusivamente sulla base delle *performance*, soprattutto per caratteristiche che si esprimono in un solo sesso, come ad esempio la produzione del latte e il numero di nati per parto, o difficilmente misurabili sugli animali vivi, come le caratteristiche della carcassa e della carne. Inoltre, essa, potendo essere indirizzata verso specifici geni, consente di superare più facilmente i problemi posti dalle correlazioni sfavorevoli tra i caratteri obiettivi della selezione.

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

a) *test diretti*: utilizzano marcatori che identificano direttamente la mutazione funzionale. I test di questo tipo sono pochi perché richiedono la previa identificazione del gene e della mutazione responsabile della variazione. Tuttavia, essi caratterizzano in modo certo i singoli animali senza bisogno di altre informazioni sulla popolazione di origine e sulla famiglia, perché marcatori e QTL sono in completo *linkage disequilibrium*.

b) *test di associazione con marcatori in linkage disequilibrium*: utilizzano un polimorfismo molto vicino alla mutazione funzionale e in *linkage disequilibrium* con questa. Si presuppone che il *linkage disequilibrium* sia molto forte e che ci sia una associazione generale tra marcatore e QTL nella popolazione. Questo tipo di associazione si può trovare più facilmente e più frequentemente, ma essa non è mai completa e diminuisce nel corso del tempo a causa della

ricombinazione. Perciò l'efficacia del test deve essere confermata in ciascuna popolazione e nelle varie generazioni. Un esempio è costituito dal test per il gene *ESR* nel suino.

c) *test di associazione con marcatori in equilibrio da linkage*: utilizzano marcatori delle regioni cromosomiche in cui si trova il QTL. In questo caso l'associazione esiste, ma varia entro famiglie. Perciò il test richiede la determinazione della fase di *linkage* in tutte le famiglie. Queste associazioni sono relativamente facili da trovare, ma il *linkage disequilibrium* diminuisce col tempo anche entro famiglie e per questo sono difficili da utilizzare nella MAS. Molti test per i QTL identificati mediante *genome scanning* hanno queste caratteristiche.

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

5. Applicazione della genetica molecolare alla Tracciabilità dei prodotti di origine animale

La tracciabilità rappresenta un fondamentale aspetto per tutelare e garantire la sicurezza degli alimenti, tutelando il consumatore ma anche il produttore, da possibili frodi. Di particolare importanza è la messa a punto di sistemi di tracciabilità per i prodotti tipici di alta qualità, in quanto si mettono a disposizione gli strumenti per difendere e valorizzare queste produzioni.

La genetica molecolare permette di effettuare abbastanza facilmente, almeno in linea teorica una tracciabilità individuale degli animali per mezzo di marcatori del DNA altamente polimorfi come i micro satelliti e molto diffusi nel genoma come gli SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*).

I principi generali su cui si basa la tracciabilità individuale possono essere ricondotti ai principi dell'analisi di parentela. Per l'identificazione degli animali attualmente i marcatori per i quali vi sono le prime applicazioni sono i micro satelliti.

Per questo tipo di analisi, una serie di microsatelliti (di solito 9-12 microsatelliti) è amplificata in multiplex utilizzando il DNA estratto dagli animali.

Il numero di alleli per questi micro satelliti e il livello di eterozigotità permette di calcolare la probabilità (probabilità di uguaglianza, *probability of identity*: P_i) che due animali (non gemelli identici) scelti a caso nella popolazione possano presentare lo stesso genotipo per tutti i marcatori microsatelliti che costituiscono un particolare set o pannello utilizzato per l'analisi.

Più marcatori sono utilizzati e maggiore è l'eterozigotità di questi marcatori nella popolazione oggetto di studio, minore è la probabilità che due animali presi a caso presentino lo stesso profilo per i loci analizzati.

Utilizzando questi concetti, è possibile ritenere che, se diversi campioni biologici prelevati in momenti differenti su un gruppo di animali, ad esempio in allevamento sugli animali vivi e al supermercato dopo la seziona tura dei vari tagli, presentano lo stesso identico profilo per il pannello di marcatori microsatelliti utilizzando nelle analisi, questi campioni appartengono allo stesso animale che può così essere identificato in modo praticamente sicuro.

Questa procedura, basata sull'analisi di microsatelliti è stata per la prima volta utilizzata commercialmente per la tracciabilità della carne bovina in Irlanda, e viene comunemente proposta da alcune società che offrono servizi commerciali di tracciabilità della carne bovina basata sull'analisi del DNA.

Tuttavia, I marcatori del DNA che sono utilizzati per l'identificazione degli animali e la diagnosi di parentela sono, come già detto, principalmente i microsatelliti. Questi marcatori, sebbene presentino in generale un elevata eterozigotità e possano essere tipizzati velocizzando l'identificazione degli alleli mediante sequenziatori

automatici, presentano come già accennato alcune caratteristiche che non permettono di ottenere una elevata affidabilità (a causa dell'alto tasso di mutazioni di questi marcatori) e una completa automazione dell'intero processo, con costi di analisi dell'ordine di 20-40 euro per campione.

Questi costi risultano proibitivi se applicati su larga scala, come, ad esempio, in un sistema di tracciabilità che preveda l'analisi di tutti gli animali allevati e macellati in un particolare territorio o sistema.

Per questi motivi, per l'identificazione degli animali da applicare ad un sistema di tracciabilità, ci si sta orientando sull'impiego degli SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), che hanno caratteristiche che possono essere sfruttate per una completa automazione dell'analisi del DNA che punta ad ottenere, oltre che le stesse potenzialità discriminatorie dei microsatelliti, una notevole riduzione dei costi di analisi.

La tracciabilità individuata basata sull'analisi del DNA, sviluppata soprattutto per la cerna bovina, può essere utilizzata per controllare i sistemi di tracciabilità effettuata su supporti cartacei oppure affiancarli o sostituirli se si riusciranno a ridurre i costi attuali.

La tracciabilità di razza si pone come esigenza quando è necessario garantire produzioni che si ottengono solo con animali di una particolare razza (prodotti "monorazza") e per i quali, per motivi di costi o logistici o tecnici, non è conveniente o non si può attuare una tracciabilità individuale.

L'assegnazione di un soggetto ad una razza utilizzando metodi molecolari può essere effettuata essenzialmente attraverso due strategie: 1) ***l'approccio probabilistico*** e 2) ***l'approccio deterministico***. Il primo prevede la creazione, per ciascuna razza tipizzata con marcatori altamente polimorfi, come i microsatelliti e gli

AFLP, di un database con informazione sugli alleli presenti e sulla loro frequenza.

L'individuo da assegnare viene analizzato con i marcatori sopra indicati l'attribuzione viene effettuata in maniera probabilistica, partendo o dalle frequenze alleliche di ciascuna razza o dalle distanze genetiche tra le razze. L'approccio deterministico prevede la ricerca di marcatori molecolari specifici di una razza e/o di geni con specifiche varianti alleliche fissate in diverse razze.

La tipizzazione di questi marcatori permetterebbe l'assegnazione di un animale direttamente ad una razza di appartenenza senza la necessità di operare alcun calcolo probabilistico.

Nel caso dei prodotti lattiero-caseari "monorazza", dei salumi e di altri prodotti carnei, ottenuti con latte e carne proveniente da diversi animali non è possibile l'utilizzo dell'approccio probabilistico nell'assegnazione o nel controllo della razza di origine del prodotto.

Questo perché dall'analisi dei microsatelliti, ad esempio, si otterrebbero tracciati con molti alleli per ciascun marcatore e l'altezza dei vari picchi viene influenzata dal contenuto di cellule somatiche dei diversi soggetti e non è in relazione all'effettiva frequenza allelica dei soggetti che determinano quella particolare produzione.

Per questo tipo di prodotti, risulta efficace un approccio deterministico che, analizzando uno o pochi marcatori geni per i quali alcuni alleli sono fissati o specifici delle diverse razze, permette, con una semplice analisi, di attribuire o almeno escludere l'eventuale appartenenza di un gruppo di soggetti (ad esempio, tutti gli animali che contribuiscono alla produzione di un formaggio oppure un salume) ad una particolare razza.

6. Genetica e biochimica del colore del mantello: alcuni elementi

Dal punto di vista biochimico e fisiologico, la pigmentazione nei mammiferi si basa sullo sviluppo, quindi la presenza o l'assenza di pigmenti, le melanine, nei peli e nella pelle.

Le melanine sono pigmenti di vario peso molecolare che si formano dall'ossidazione enzimatica dell'aminoacido tirosina e da cui derivano due tipi di pigmenti: eumelanine (pigmenti neri/marroni) e feomelanine (pigmenti giallo/rossi).

La pigmentazione è essenzialmente determinata dalla distribuzione dei due pigmenti che producono, rispettivamente, una colorazione nera/marrone e giallo/rossa. Le vie metaboliche che portano alla sintesi di questi due tipi di melanine sono per buona parte conosciute.

L'enzima chiave in questo processo è la tirosinasi, che catalizza i primi due passaggi metabolici che partono dall'idrossilazione della tirosina a diidrossifenilalanina (DOPA) e la successiva ossidazione di questo metabolita a dOPA chinone.

Le eumelanine derivano poi dai metaboliti del DOPAcromo mentre le feomelanine sono prodotte dai metaboliti del 5-S-cisteinilDOPA. (Fig. 1)

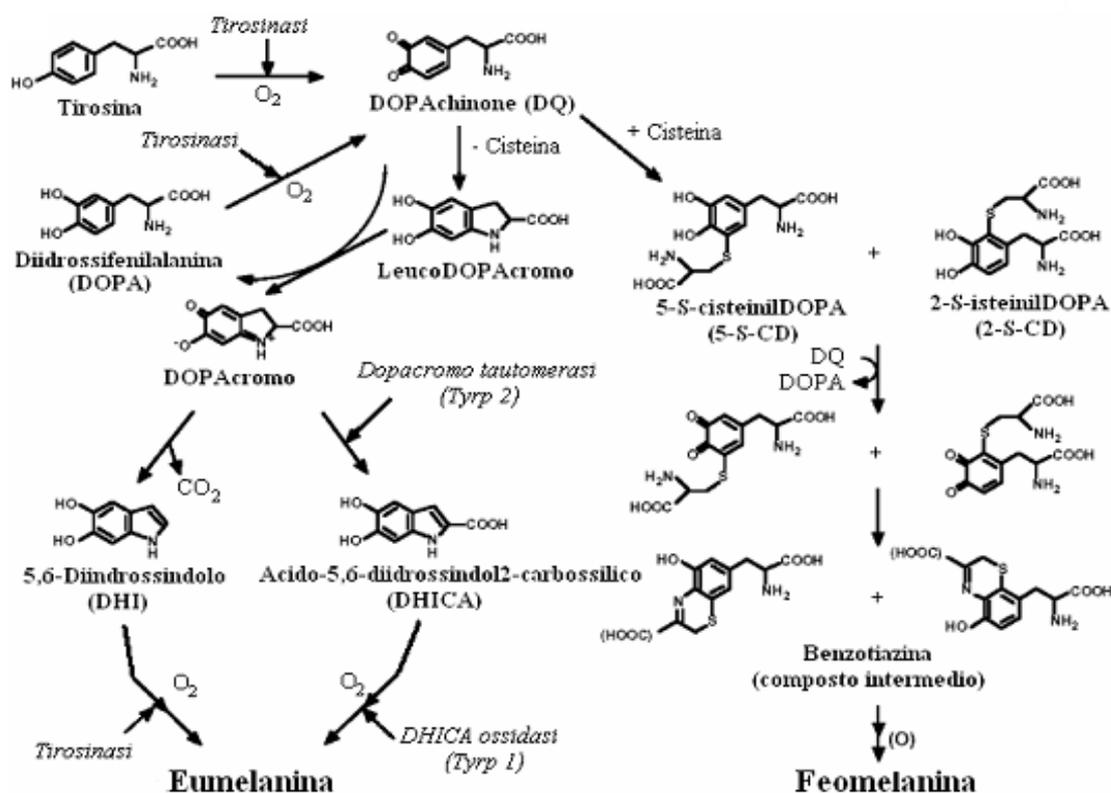
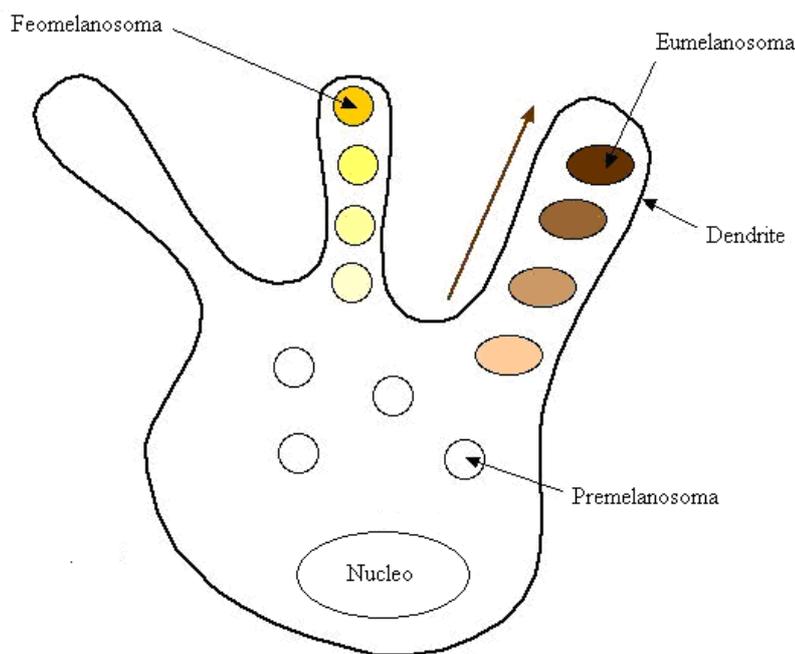


Figura 1: Chimismo della formazione della molecola di Eumelanina e Feomelanina.

Le melanine sono sintetizzate e accumulate nei melanosomi che sono particolari organelli del citoplasma di cellule specializzate, i melanociti, che risiedono fra il derma e l'epiderma. I melanosomi trasferiti successivamente nei peli durante la loro crescita tramite un processo di esocitosi. Durante lo sviluppo embrionale i melanociti, partendo dalla cresta neurale, migrano nelle diverse parti del corpo conferendo alle aree in cui sono presenti la pigmentazione.

Nelle aree in cui mancano i melanociti si formano macchie bianche che conferiscono la caratteristica pezzatura di alcune razze. Inoltre, in alcune parti del corpo la pigmentazione può essere modificata a seconda della più o meno ridotta attività dei melanociti.



I primi studi sulla genetica del colore del mantello, effettuati all'inizio del 1900, sono appena successivi alla riscoperta delle leggi di Mendel (Barrington e Pearson, 1906).

A queste ricerche seguirono altri studi che stabilirono analogie di colorazione tra i diversi mammiferi e da allora questi schemi sono stati utilizzati per descrivere il colore del mantello nelle varie specie (Wright, 1917; Searle, 1968).

I principali *loci*, identificati mediante diversi incroci e analisi della segregazione dei vari colori sono:

Agouti (A),
Extension (E),

<i>Albino</i>	(C),
<i>Brown</i>	(B),
<i>Dilution</i>	(D),
<i>Roan</i>	(R),
<i>Silver e Spotted</i>	(S).

Ognuno dei suddetti loci possiede una propria serie allelica a volte non ben chiara (Searle, 1968; Olson, 1999).

La relativa proporzione dei due tipi di melanina è controllata dai loci *Extension* (*E*) e *Agouti* (*A*) che manifestano effetti epistatici. In diversi mammiferi, alleli dominanti al locus *E* producono un colore del mantello nero mentre alleli recessivi danno luogo ad una colorazione rosso/giallastra.

Alleli al locus *A* determinano il colore nero recessivo solo quando al locus *E* è presente l'allele selvatico ma non l'allele dominante recessivo.

Altri loci determinano l'estensione della pigmentazione e l'intensità della pigmentazione. Fra questi, il locus *W* (*White Spotting*), che secondo alcuni studi è riferibile al locus (*S*) (*Spotted*), agisce sull'estensione della pezzatura. Il locus *Roan* (*R*) determina l'omonimo colore, il locus *Dilute* (*D*) agisce diluendo la pigmentazione, il locus *Silver* (*S*) determina la perdita dei melanociti follicolari con conseguente ingrigimento del mantello, il locus *Brown* (*B*) determina il colore marrone, ecc.

Un elenco più completo dei loci che influenzano il colore del mantello nei mammiferi si può trovare in Searle (1968)

Un metodo di classificazione delle razze bovine, suine e cunicole, si basa sulla colorazione del mantello e sulla distribuzione della colorazione. Infatti i caratteri morfologici in queste specie sono considerati caratteristiche etnografiche, ovvero tipiche di ogni razza di appartenenza degli animali.

7. Principali loci responsabili del colore del mantello

7.1 - locus *Agouti* (A):

Diversi sono stati gli studi effettuati negli anni da diversi autori (Berge, 1961; Searle, 1968; Lauvergne e Canope, 1979) sulla caratterizzazione genetica del locus *Agouti*.

Essi sostenevano che diverse razze domestiche portavano l'allele recessivo *non-aguti* (*a*), sebbene, l'allele selvatico (*A*) può essere presente in alcune razze rosse. Per esempio, il colore chiaro della pancia nei suini secondo lo schema *agouti* (Lush, 1921) compariva nella popolazione F₂ incrociando Berkshire x Duroc.

Un'altra eccezione dell'allele selvatico (*wild-type*), compariva nei suinetti F₁ di razza Mangalitza, quando i suini di questa razza venivano incrociati con altri suini domestici (Kosswing and Ossent, 1931; Costantinescu, 1933; Teodoreanu, 1935). Per questa ragione, Kosswing and Ossent (1931) ritenevano che l'allele *A* poteva essere responsabile della comparsa della strisciatura bianca che presentavano i giovani suinetti.

Questa ipotesi non fu accettata da Costantinescu, (1933); Teodoreanu, (1935) e da Hetzer (1945a), che ritenevano che la strisciatura bianca dei giovani suinetti, una caratteristica costante della razza Mangalitza, era determinata da geni con differenti loci.

I contributi recenti concernenti l'incrocio tra suini selvatici e razze domestiche (Thielscher, 1986; Johansson et. al., 1992) non hanno ancora fatto chiarezza tra le differenti ipotesi.

7.2 - loci Brown (B), Albinism (C) e Dilution (D)

Il fenotipo albino è sconosciuto nella specie suina, ma Searle (1968) pensava che il colore bianco sporco della razza Mangalitza era dovuto alla presenza di alleli situati al locus **C**, omologo con gli estremi del locus dilution c^e in altri mammiferi.

Ma mentre, Searle (1968) e da McPhee et. al., (1931) descrivevano il locus *dilution* (*D*) come frutto di una parziale diluizione di pigmenti neri misti a pigmenti bianchi, Berge (1961) attribuiva questo fenomeno all'allele a^s del locus Agouti.

Le analisi dell'incrocio tra Pietrain x Minnesota condotte da Rempel e Marshall (1990), ipotizzavano che un alta frequenza del gene *Dilution* era portata dalla razza Pietrain, ma essi non arrivarono a nessuna conclusione circa il locus.

7.3 - locus *Exstension* (*E*)

Dopo gli studi di Hetzer (1945), tre alleli vennero identificati al locus **E**: **E** per il nero uniforme, **E^P**, per il nero chiazzato ed **e** per il rosso.

Le diverse combinazioni alleliche di **E** ed **e** furono mostrate nell'incrocio di diverse razze: Hampshire, Cornwall, Duroc, Bavarian e Minnesota (Kronacher, 1924; Bushnell, 1943; Rempel e Marshall, 1990).

Le combinazioni alleliche tra **E** ed **E^P** potevano anche essere dedotte dall'incrocio fra Large Black x Berkshire (Carr-Saunders, 1922), Berkshire x Cornwall (Kosswig e Ossent, 1931), da incroci riguardanti anche altre razze come Meishan, Large White e Pietrain (Legault, 1997) e da confronti fra Landrace x Large Black e Landrace x Poland China (o Berkshire) (Hetzer, 1945 b,c,d).

Hetzer confermava anche l'ordine di dominanza degli alleli **E/E^P/e**.

Questo poteva anche essere valido per Berkshire e Poland China con gli alleli dominanti $E^P E^P$.

Lo stesso genotipo è stato trovato anche nella razza Pietrain (Lauvergne e Ollivier, 1966; Milojevic, 1966; Rempel e Marshall, 1990; Legault, 1997).

Quindi si giunse alla conclusione che l'origine del colore tipico della razza Pietrain è quello della Berkshire, che è stato il colore dominante delle razze chiazzate.

Recenti osservazioni fatte su incroci tra Pietrain x Minnesota a Pietrain x Duroc (Rempel e Marshall, 1990; Legault, 1997) davano in F_1 animali "dalmata" invece che "domino".

Tuttavia, la dominanza completa di E^P/e sembra essere dubbia. Per il colore "arancione" che è intermedio, tra il rosso del Duroc e il bianco del Pietrain potrebbe essere associato con gli animali eterozigoti dell' F_1 ($E^P e$) e potrebbe essere in relazione con il gene *Dilution* del Pietrain.

Incroci tra le razze cinesi e la razza Duroc davano in larga proporzione animali di colore nero uniforme (circa 90%), tranne quando era presente una cinghiatura bianca o questa segregava nel partner.

7.4 - Locus *White (I)*

Il "bianco" è sicuramente il colore più diffuso nelle diverse razze suine, e non sorprende che l'incrocio tra razze bianche e razze colorate è stato il più studiato.

Già nel 1906 Spillman aveva stabilito la dominanza del colore bianco nell'incrocio tra la razza Tamworth x Yorkshire.

Wright, 1918 affermava che erano due i geni dominanti responsabili della colorazione bianca, mentre Wentworth e Lush (1923) avanzavano l'ipotesi di un solo gene dominante. Questo era confermato anche da (Hetzler, 1945 b,c,d) che aveva chiamato il gene *I* (*inibizione del colore*).

Altri risultati dimostrarono l'indipendenza tra i loci del colore *I* ed *E* (Hetzer, 1945 b,c,d), ipotesi che fu confermata anche da altri studi più recenti (Lauvergne e Ollivier, 1966; Milošić, 1966; Rempel e Marshall, 1990; Legault, 1997).

Le razze bianche, come, la Yorkshire, Large White e Landrace, sono generalmente omozigoti dominanti per l'allele *I*, allele, che inibisce la produzione di pigmenti sia neri che gialli.

Le razze colorate, come la Berkshire, Poland-China, Duroc, Pietrain, Large Black e le razze colorate cinesi sono omozigoti recessive *ii*. Hetzer, (1948) dall'incrocio tra Landrace e Hampshire, evidenziò la presenza di un terzo allele *I^d*, che dava una colorazione grigio-roano ai suini.

L'allele *I^d* potrebbe essere recessivo e potrebbe avere lo stesso effetto inibitorio nella formazione di pigmenti coloranti come l'allele *I* quando è presente l'allele *E^P*, e potrebbe dare un fenotipo grigio-roano (mix di peli neri e bianchi) quando è presente l'allele *E*.

Un quarto allele *i^m*, recessivo, Berge, (1961), fu considerato responsabile della colorazione bianca nella razza Mangalitza, già esistente al locus *I* dominante, per cui, *I^d/i^m*.

Due diverse ipotesi furono formulate per la presenza occasionale di pezzature nere osservate nella popolazione F₁ dall'incrocio fra razze bianche (Large White, Landrace) e suini selvatici europei o razze nere cinesi.

Secondo Joansson, (1992), queste erano date da due alleli recessivi al locus *I*, e rispettivamente *I^P* e *i* che segregavano basse frequenze nelle razze bianche europee, mentre secondo Legault, (1997), il fenomeno era dovuto ad una penetranza incompleta dell'allele dominante per il bianco nello stato di eterozigosi.

8. Applicazione della Genetica molecolare allo studio del colore del mantello

Grazie alle conoscenze che derivano dall'embriologia, dalla biochimica e dalla genetica molecolare è stato possibile identificare e caratterizzare i principali geni che influenzano il colore del mantellonei mammiferi. Questi geni sulla base delle loro funzioni possono essere classificati come segue:

1) Geni coinvolti nella regolazione della melanogenesi: il locus *Extension* (**E**) che codifica per *melanocortin receptor 1* (*MC1R*); il locus *Agouti* (**A**) che codifica per una proteina di circa 130 aminoacidi (*agouti signaling protein, ASIP*) che agisce come antagonista dell' α -melanocyte-stimulating-hormone (α -MSH) sul recettore *MC1R*.

2) Geni che influenzano lo sviluppo dei melanociti e alla loro migrazione durante l'embriogenesi: il locus *White-Spotting* (**W**), identificato a livello molecolare come il gene *KIT*; il locus *Roan* (**R**) che codifica per *mast cell growth factor* (MGF) che si lega al gene *KIT*

3) Geni che codificano per gli enzimi della biosintesi delle melanine: il locus *Albino* (**C**) che codifica per l'enzima tirosinasi (*TYR*); il locus *Brown* che codifica per l'enzima *tyrosinase-related protein 1* (*TYRP1*); il locus *Slaty* che codifica per l'enzima *tyrosinase-related protein 2* (*TYRP2*).

4) Geni che influenzano la morfologia dei melanociti: ad esempio il locus *Diluite* (**D**) che codifica per una miosina di tipo V (*MYO5A*).

5) Geni che influenzano la struttura e la funzione dei melanosomi: il locus *Silver* (*PMEL17*) e il locus *pink eyed dilution* (**p**) che codificano per proteina transmembrana dei melanosomi.

Il locus *Exstension* è stato inizialmente caratterizzato a livello molecolare nel topo. Questo locus codifica per *melanocortin receptor 1 (MC1R)* indicato anche come *melanocyte stimulating hormone receptor* (Robbins et. al., 1993) che è una proteina transmembrana della famiglia dei *G-protein-coupled receptors*.

Oltre che nel topo, anche nell'uomo (Valverde et. al., 1995), nel cavallo (Marklund et. al., 1996), nella pecora (Våge et. al., 1999), nel pollo (Takeuchi et. al., 1997), nel suino (Kijas et. al., 1998) diverse mutazioni nel gene *MC1R* sono state associate a differenti colori del mantello.

Il locus *W (white spotting)* è caratterizzato nel topo da mutazioni nel gene c-kit receptor (*KIT*); (Chabot et. al., 1988). Nel suino mutazioni del gene *KIT* causano il colore del mantello bianco e cinghiato (Marklund et. al., 1998). (Tab. 1)

Tabella 1. Geni responsabili del colore del mantello nella specie suine

Locus	Allele	
A	A A^b A a^s	agouti pancia bianca agouti lista facciale non agouti seppia
C	C C^e	normale bianco sporco
D	D d^s d^p	normale seppia dilution recessivo
E	E^d E E^p E e^h	nero dominante nero-macchie nere macchie nere rosso faccia bianca
He	He He	faccia bianca normale
I	I i^d i^p I i^m	inibizione del colore roano pezzature nere colorato bianco sporco
Be	Be^w Be be^b	cinghiatura colore uniforme colore e faccia bianca

R	R	normale
	r	occhi rossi

8.1 Il gene *MC1R* nella specie suina

Nella specie suina il gene *MC1R* è stato mappato sul cromosoma 6.

Anche in questa specie il gene è costituito da un unico esone con la parte codificante di circa 950bp. Da studi effettuati al locus *Extension* è stato possibile identificare cinque diversi alleli quali gli alleli E^+ , E^D nelle varianti (E^{D1} ed E^{D2}), E^P , ed e . (Kijas et. al., 1998; Kijas et. al., 2001).

L'allele E^+ , definito anche come “wild type”, produce la colorazione “selvatica” tipica del cinghiale europeo e nello studio di questo gene verrà considerato come il termine di paragone degli altri alleli.

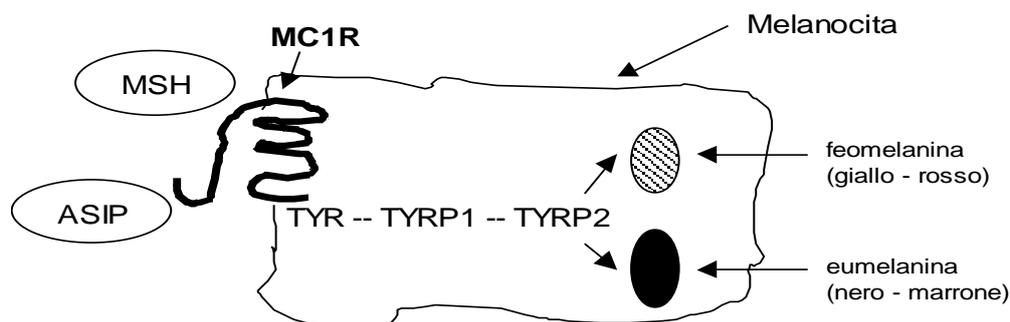
L'allele E^D è responsabile della colorazione nera dominante degli animali è presenta ulteriori due varianti alleliche: E^{D1} ed E^{D2} . In particolare l'allele E^{D1} è stato trovato nelle razze Meishan e Large Black e differisce dall'allele E^+ per due mutazioni che cambiano rispettivamente due aminoacidi in posizione 92 ed in posizione 99 (Val>Met e Leu>Pro), e per due mutazioni sinonime. L'allele E^{D2} invece differisce dall'allele “wild type” soltanto per una singola mutazione in posizione 121 (Asp>Asn). Questo allele è stato identificato nella razza Hampshire.

Il terzo allele, ovvero l'allele e , conferisce al suino una colorazione feomelanica (rossa) del mantello. Le mutazioni presenti in

questo allele sono due, entrambe modificano l'aminoacido codificato e si trovano in posizione 161 e 240 del gene *MC1R* (Ala>Val e Ala>Thr).

La prima delle due mutazioni non sembra avere un effetto diretto sul fenotipo, mentre la seconda mutazione altera la struttura del sesto dominio transmembrana del gene *MC1R*, impedendone cos' l'attività di recettore con effetto a cascata sul colore del mantello.

Infine l'allele *E^P* conferisce agli animali un mantello di tipo pezzato, quindi non uniforme come le precedenti frequenze alleliche. Questo allele è determinato da un inserzione di 2 bp (nt 67 ins CC) che determina uno slittamento del frame di lettura del codone 23. questa mutazione è stata rilevata nelle razze Pietrain e Large White.



8.2 Il gene *KIT* nella specie suina

Il gene *KIT* è stato mappato sul cromosoma numero 8 suino, e risulta formato 21 esoni, e gioca un ruolo di fondamentale importanza nella migrazione e nella sopravvivenza dei melonociti verso le creste neurali delle cellule.

Nella specie suina sono stati già identificati sette diversi alleli al locus *KIT* (Johansson et al., 1992; Johansson Moller et al., 1996; Marklund et al., 1998; Giuffra et al., 2002).

L'allele "*wild type*" *i*, è l'allele recessivo che permette una piena espressione della colorazione del mantello. L'allele *I^P*, determina un fenotipo con pezzature più o meno estese di colore bianco, mentre l'allele *I^{Be}* è il responsabile della caratteristica "cinghiatura" tipica di alcune razze. Infine sono stati identificati gli alleli definiti anche "Dominant White Alleles" responsabili della colorazione bianca uniforme del mantello nei suini, questi alleli sono stati denominati rispettivamente *I¹*, *I²*, *I³* ed *I⁴* (Johansson Moller et al., 1996; Giuffra et al., 2002; Pielberg et al., 2002, 2003).

Come già detto prima l'allele *i* permette una piena espressione del fenotipo dell'animale ed in questo studio verrà preso in considerazione come allele di riferimento. L'allele *i* assieme agli alleli *I^{Be}* e *I⁴*, possiede

un'unica copia del gene KIT, contrariamente a quanto accade negli alleli I (riconducibili agli alleli i1 i2 i3) e all'allele I^P .

Per quanto riguarda l'allele I^1 , gli studi hanno evidenziato, oltre alla duplicazione del gene, anche una mutazione puntiforme (G>A) della prima base nucleotidica a livello dell'introne 17. Tale mutazione pare essere la responsabile della distruzione della tyrosinase kinase signalling del gene KIT.

Per quanto riguarda gli altri due "Dominant White Alleles", ovvero gli alleli I^2 e I^3 , possiedono una triplicazione del gene, mentre la mutazione splice in questi casi si riscontra rispettivamente in una ed in due delle copie del gene. (Pielberg et al., 2002).

L'allele I^{Be} , associato alla caratteristica pezzatura bianca che ricopre completamente le spalle e le zampe anteriori, probabilmente è dovuto ad una mutazione nella regione regolativa in quanto non sono state identificate le mutazioni sopra descritte. Inoltre anche alcuni suini di colore bianco hanno mostrato la presenza di una sola copia del gene KIT e non hanno mostrato la splice mutation, in questo caso l'allele in questione è stato denominato I^{Be*} , anche se non si è del tutto sicuri che si tratti dello stesso allele I^{Be} .

Infine l'allele I^L possiede un'unica copia del gene KIT, ma la splice mutation risulterebbe allo stato omozigote, generando così un allele letale.

9. OBIETTIVI

La tracciabilità rappresenta un fondamentale aspetto per garantire la qualità e la sicurezza degli alimenti. In particolare nella specie suina, la tracciabilità di razza dei prodotti carnei si pone come esigenza al fine di garantire produzioni ottenute solo con animali di una particolare razza e per il fatto che su questi prodotti non è sempre possibile, per vari aspetti, effettuare una tracciabilità individuale degli animali.

I sistemi fino ad oggi utilizzati per la tracciabilità individuale dei soggetti, riguardano principalmente l'utilizzo di marchi auricolari con rispettivo numero di identificazione, i documenti di accompagnamento dell'animale, così come la lettura informatizzata di questi documenti attraverso codici a barre.

Tali metodi, seppure in diversi casi efficaci, possono essere abbastanza facilmente disattesi per il fatto che questi dispositivi o documenti hanno solo un collegamento indiretto con l'animale in quanto apposti o attribuiti all'animale stesso secondo diverse procedure e tempistiche.

L'analisi del DNA permette di stabilire un collegamento diretto tra prodotto e animale. Collegamento impossibile da falsificare perchè il

DNA è presente in tutte le cellule animali ed è unico per ciascun animale (a parte i gemelli monozigotici).

Questo fatto permette facilmente di mettere in evidenza eventuali incongruenze tra prodotto e animale tramite una semplice analisi del DNA. Tuttavia per mettere a punto protocolli di autenticazione dei prodotti animali e, nel caso specifico, di prodotti animali monorazza, è necessario studiare i geni e le mutazioni che potrebbero permettere di differenziare le diverse razze e quindi i loro prodotti. In seguito, sulla base dei dati relativi a queste indagini, si potrà passare alla messa a punto vera e propria di protocolli di autenticazione e tracciabilità di razza basati sull'analisi del DNA.

Gli obiettivi della presente tesi sono stati quelli di:

- 1) Caratterizzare il Suino Nero Siciliano per alcune mutazioni già identificate nella specie suina per i geni *MC1R* e *KIT*.
- 2) Valutare la possibilità di utilizzare queste mutazioni per la tracciabilità di razza dei prodotti di Suino Nero Siciliano ed eventualmente distinguerli dai prodotti che derivano da altre razze o da suini commerciali;
- 3) Identificare nuove mutazioni nel gene *KIT* e valutarne l'eventuale associazione con la presenza di macchie bianche in alcuni suini della razza in oggetto o in popolazioni locali simili;
- 4) Caratterizzare il gene *KIT* in una popolazione locale di suini siciliani a mantello grigio, attualmente in corso di studio per verificarne le possibilità di un suo impiego nelle produzioni locali, e verificare l'eventuale associazione tra mutazioni in questo gene e il colore del mantello.

Questa tesi si colloca nell'ambito di uno studio più ampio volto alla caratterizzazione genetica del suino Nero Siciliano avente come obiettivo la possibilità di applicare marcatori del DNA per il miglioramento e la valorizzazione delle sue produzioni.

10. MATERIALI E METODI

10.1 Animali

Lo studio è stato effettuato su 176 suini, appartenenti alla razza "Nero Siciliano", tutti iscritti al Registro Anagrafico e campionati da 17 aziende diverse ricadenti nell'areale del Parco dei Nebrodi. Gli animali erano quindi identificati tramite la marca auricolare

Durante l'attività di campo, in alcune aziende sempre ricadenti nel territorio del Parco dei Nebrodi sono stati campionati anche dei suini che presentavano delle caratteristiche morfologiche simili ai suini di razza Nero Siciliano, ma manifestavano una colorazione del mantello di colore grigio. In tutto sono stati campionati 17 suini che rappresentano quasi l'intera popolazione reperibile che presentava questa particolare caratteristica.

Altri suini delle razze Large White Italiana (n. 49), Landrace Italiana (n. 44), Duroc Italiana (n. 30), Landrace Belga (n. 31), Pietrain (n. 26) e Hampshire (n. 18) sono stati campionati e analizzati per mutazioni al gene *KIT*.

10.2 Prelievo del materiale biologico

Su ciascun soggetto è stato eseguito un prelievo di sangue utilizzando provette vacutainer con EDTA, e un campione di setole con bulbo.

10.3 Estrazione DNA da sangue

A 1 ml di sangue di suino sono stati aggiunti 75 µl di acque sterile bidistillata per la risospensione. Successivamente sono stati fatti alcuni lavaggi con 1,5 ml TE, (TE= 10mM di Tris, 1mM di EDTA a pH 8) ciascuno seguito da una centrifugazione di 6 minuti a 12000 rpm a temperatura ambiente.

In ciascun passaggio è stato eliminato il surnatante e il pellet ottenuto dopo l'ultima centrifugazione è stato risospeso in acqua con l'aggiunta di 2 µl di proteinasi K.

Il tutto è stato incubato a 56 °C in bagnomaria per oltre un ora. Per inattivare l'enzima, dopo una vortexata, i campioni sono portati a ebollizione per circa 15 minuti e centrifugati per 3 minuti a 12000 rpm. Il surnatante così ottenuto è pronto per essere utilizzato per l'analisi PCR.

Una volta valutate la quantità e la qualità del DNA estratto, questo è stato utilizzato per l'analisi PCR.

10.4 Estrazione DNA da bulbi piliferi

Dalle setole e dal sangue dei 176 suini di razza Nero Siciliano e dalle setole dei 12 suini con mantello grigio è stato estratto il DNA.

Per quanto riguarda l'estrazione da setole: da ciascun suino sono state utilizzate alcune radici di peli tagliati a circa 5 mm, messi in eppendorf da 1,5 ml e aggiunti 100 µl di tampone di estrazione con proteinasi K.

Il tampone di estrazione conteneva 1 µl della soluzione di stock di proteinasi K (concentrata 20 mg/ml) e 99 µl tampone (10mM Tris HCl a pH 8,3)

Dopo l'aggiunta del tampone di estrazione, i campioni vengono incubati per circa 40-60 minuti ad una temperatura di 60 °C.

Per inattivare la proteinasi K è stata quindi effettuata un incubazione in acqua a 95-100 °C per 15 min. A questo punto i campioni venivano centrifugati a 12000 rpm (1 min.); dopodiché il surnatante veniva trasferito in eppendorf, e 5 µl sono stati utilizzati per l'analisi PCR.

10.5 Analisi PCR dei geni *MC1R* e *KIT*

L'analisi PCR è stata effettuata mediante un termociclatore (MJ-PTC 100-Research, Watertown, MA, USA), con volume finale di reazione di 20 µl (circa 10-100 ng), 1 U DNA EuroTaq polymerase (euro Clone Ltd., Paington, Devon. UK), 1X PCR Buffer, 2,5 mM dNTP's, 10 pmol di ciascun primer e MgCl₂ 2,5 mM.

Il profilo di amplificazione del termociclatore è stato il seguente: 5 min. a 95 °C, 30 sec a 95 °C per 35 cicli, 30 sec ad una specifica temperatura di annealing a seconda del tipo di primer utilizzati (tab. 2 e 3), 30 sec a 72 °C; 10 min a 72 °C. Eventuali adattamenti a questo profilo di amplificazione sono riportati nelle tabelle 2 e 3

10.6 Analisi gene *MC1R*

Una volta isolato il DNA, questo è stato utilizzato per amplificare mediante PCR tre parti del gene *MC1R* (il gene è costituito da un unico esone), una di 170 bp, una di 196 bp e una di 154 bp.

Queste regioni contengono i siti polimorfici che, nel loro insieme, permettono di distinguere gli alleli E^+ , E^{D1} , E^{D2} , E^P ed e a questo locus (Kijas et. al., 1998; Russo et al 2004).

10.7 Analisi dei polimorfismi del gene MC1R

L'analisi PCR-RFLP è stata effettuata sui prodotti amplificati delle altre due parti del gene (rispettivamente di 196 e 154 bp) ottenute utilizzando i primer già descritti (tab 2).

Il frammento di 196 bp è stato digerito con l'enzima di restrizione *BspHI* che permette di analizzare la mutazione al codone 124. Il frammento di 154 bp è stato digerito con gli enzimi *MvnI* e *HhaI* che permettono di identificare le due mutazioni nel codone 243.

Per le digestioni sono stati utilizzati 10,8 μ l di DNA amplificato utilizzando 2 unità di enzima di restrizione.

La quantità di enzima non deve superare 1/10 del volume finale della reazione della digestione perché il glicerolo contenuto nella soluzione come conservante potrebbe inibire l'attività dell'enzima se è presente in quantità troppo elevata.

I frammenti di restrizione dei campioni di DNA amplificati e digeriti sono stati analizzati su gel di poliacrilamide al 10% in TBE 1X (pH 8,0).

Per la semina si utilizzavano 20 μ l di prodotto digerito addizionati con 5 μ l di *loading buffer* (0,25% blu di bromofenolo, 40% (W/v) saccarosio in acqua).

Il *loading buffer* ha due funzioni:

- a) aumenta la densità della soluzione, favorendo la discesa del DNA nel pozzetto e impedendo che diffonda nel tempone;
- b) colora il campione, semplificando il processo di semina.

Per la migrazione elettroforetica, veniva applicato un voltaggio di 130 mV per circa 1 ora. I gel venivano in seguito colorati in una

soluzione di etidio bromuro (0,5 µg/ml) in TBE 1X per circa 30'; questo colorante si intercala tra le basi del DNA rendendolo fluorescente alla luce ultravioletta e quindi visibile.

Il TBE 5X (pH 5,8) viene preparato miscelando Tris 0,44 M, EDTA 10 mM e acido borico 0,44 M, in acqua bidistillata.

Il *marker* usato (*marker VIII Boehringer Mannheim*) è costituito da 17 frammenti di DNA di lunghezza compresa tra 19 e 1114 bp (19, 26, 34, 37, 110, 124, 147, 190, 320, 404, 489, 501, 692, 900, 1114 bp)

La prima regione (170 paia di basi, bp) permette di distinguere l'allele *E^P* (costituito da un'inserzione di 2 bp che determina uno slittamento del *frame* di lettura del codone 23) dagli altri alleli. I prodotti amplificati per questa parte del gene sono stati analizzati utilizzando un sequenziatore a capillare ABI3100 Avant (Applied Biosystem).

Tabella 2: Analisi PCR del gene *MC1R*

Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	T. Annealin g (°C)	Prod. PCR (bp)	MgCl ₂
CACCTCTGGGAGCCAT GA	GTCTGGTTGGTCTG GTTG	57	170	2,0
GCGGGTACTGTACGTC CACAT	CCCAGCAGAGGAAG AC	60	154	2,5
GCGGGTACTGTACGTC CACAT	CCCAGCAGAGGAAG AC	60	154	2,5
CTGCACTCGCCCATGT ACTA	AGCAGAGGCTGGAC ACCAT	60	196	2,0

Per confermare i risultati ottenuti si è proceduto al sequenziamento dei prodotti amplificati per 2 animali per i principali genotipi identificati per ciascuno dei polimorfismi analizzati mediante PCR-RFLP. Il sequenziamento è stato effettuato come descritto sopra utilizzando gli stessi primer usati per l'amplificazione.

10.8 Sequenziamento

Il sequenziamento dei prodotti amplificati è stato effettuato dopo purificazione con ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, OH) per 15 min. a 37 °C. I primer innesco delle reazioni di marcatura sono stati gli stessi utilizzati per l'amplificazione (Tab. 3). La marcatura dei prodotti purificati è stata effettuata utilizzando il kit della BigDye v.3.1 (Applied Biosystem) utilizzando il seguente profilo di amplificazione: 1 min a 96 °C; (10 sec a 96 °C; 5 sec a 50 °C; 4 min. a 60 °C) x 25 cicli e 4 °C ad infinito, su un termociclatore Perkin Elmer 9600. Successivamente i prodotti marcati sono stati purificati utilizzando un protocollo di precipitazione con EDTA, etanolo 100% ed etanolo 70%.

I prodotti purificati sono stati risospesi in 10 ul di formamide e analizzati su un sequenziatore a capillare ABI3100 Avant (Applied Biosystem). Gli elettroferogrammi sono stati analizzati utilizzando il software Sequencing version 7.0.8, BioEdit, e CodonCode Aligner (Codon Code Corporation, Dedham, MA).

11 Analisi del gene KIT

11.1 Analisi in silico e disegno di primers

I primer per l'analisi del gene KIT sono stati disegnati utilizzando la sequenza genomica di suino AC141857 disponibile in GenBank che comprende il gene KIT. Tale sequenza è stata identificata mediante analisi con BLASTN utilizzando il cDNA completo del gene KIT di suino (NM_001044525).

L'analisi con BLAST2 ha permesso di identificare sulla sequenza genomica AC141857 l'organizzazione in esoni ed introni del corrispondente gene suino. Successivamente, con il software Primer 3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) sono state disegnate coppie di primers per amplificare tutti i 21 esoni del gene includendo i primer forward e reverse nelle regioni introniche (precedenti e successive alle regioni esoniche) in modo da amplificare tutte le parti codificanti. I primer disegnati sono inclusi in tabella 3.

Oltre a questi primer, che amplificano i 21 esoni del gene *KIT*, per analizzare la splice site mutation dell'esone/introne 17 sono stati utilizzati i primer riportati da Marklund et al. (1998)

11.2 Analisi della Splice Site Mutation (SSM)

La mutazione della Splice Site Mutation, è stata studiata mediante analisi PCR-RFLP utilizzando i seguenti primer (Marklund et al. 1998):

Forward: GTATTCACAGAGACTTGGCGGC

Reverse: AAACCTGCAAGGAAAATCCTTCACGG

L'analisi PCR e il profilo di amplificazione del termociclature sono quelli riportati nel paragrafo 10.5 per il gene *MC1R* in questo caso la temperatura di annealing usata nel termociclature è stata di 60 °C

Il prodotto amplificato è stato digerito con l'enzima di restrizione *NlaIII* che permette di identificare la mutazione puntiforme G>A.

11.3 Analisi della duplicazione

Per l'analisi della duplicazione del gene *KIT* sono stati utilizzati i primer riportati da Giuffra et al. (2002):

Forward – TAAGTGAAAGAAGTCAATCTGAG

Reverse - GGCAGTCATGTA ACTATCACC

Dal momento che l'analisi della duplicazione comporta la presenza o assenza di un frammento amplificato, per avere un controllo interno dell'amplificazione, nella stessa amplificazione è stato amplificato il gene *ESR* (*estrogen receptor*) che in base alla presenza o all'assenza della banda ha fornito chiare indicazioni sulla presenza o sull'assenza della duplicazione nel gene *KIT*.

La sequenza dei primer utilizzati per l'amplificazione del gene *ESR* è la seguente:

Forward - CCTGTTTTTACAGTGACTTTTACAGAG

Reverse –CACTTCGAGGGTCAGTCCAATTAG.

11.4 Analisi dell'indel nell'introne 18

Un'inserzione/delezione (indel) di 4 bp (AGTT), già identificata nell'introne 18 del gene *KIT* di suino (Johansson Moller et al., 1996), è stata analizzata sui suini oggetto di questa ricerca dopo PCR della regione che la contiene. Il prodotto amplificato di 164 bp è stato ottenuto utilizzando i primer:

Forward: - GTGGGAGCTCTTCTCTTTAG;

Reverse - ACTGGCATTCCGGGGTAG riportati da Xu et al. (2006):

il primer forward è stato marcato con 5-FAM.

La lunghezza dei frammenti ottenuti è stata valutata dopo analisi elettroforetica in un sequenziatore a capillare ABI3100 Avant (Applied Biosystems) con il software Genotyper (Applied Biosystems).

12. Sequenziamento del gene *KIT* e identificazione di mutazioni

Il sequenziamento del gene *KIT* è stato effettuato su 14 suini di cui: 4 suini di razza Nero Siciliano con mantello completamente nero

(suini indicati con i numeri 1, 2, 8 e 9); 2 suini di razza Nero Siciliano con mantello nero e porzioni bianche negativi per il test della duplicazione (suini indicati con i numeri 7 e 26); 2 suini di razza Nero Siciliano con mantello nero e porzioni bianche positivi alla mutazione della duplicazione (suini indicati con i numeri 25 e 46); 3 suini grigi (numeri 101, 102 e 10); un soggetto di razza Large White; 2 animali di razza Duroc.

Il sequenziamento è stato effettuato per le regioni codificanti dei 21 esoni di cui il *KIT* è composto (vedi tabella 3)

Le mutazioni sono state evidenziate allineando le sequenze ottenute utilizzando il software CodonCode Aligner.

Tabella 3: Analisi PCR del gene *KIT*

Gene region ¹	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Fragment size (bp)	T. Annealing (°C)	MgCl ₂ (mM)
Exon 1	TAGCACGTCGAAAGTGCA G	ACACCCGACTGTGTTTCGAG	392	59	2.0
Exon 2	GAAATGCTTTATTTGCGCA GA	CCCGCCGGTAATATTCTCTC	441	59	2.0
Exon 3	GGCCATTCAAACCTCCTGAT T	GATATGCCAGCTCCCAGAAG	358	57	2.0
Exon 4	ACTTGAGGGCTGCACAGTT T	AACCTTCAAACGTCCCACAC	391	59	2.0
Exon 5	GGAGGAGTTAATTGCTGCT	CAAATACCTAAGAATCTGTTCA	385	59	2.0
Exon 6	TGGATAACGCTTTCTTTCT GTT	CCAAGCCACGTCTGTAACCT	383	58	2.0
Exon 7	AAGCAGGCGTGTATTTCT G	AACCACCAAACCACAAGGTC	369	57	2.0
Exon 8	CCTCCTCAGGGTCATCTTC A	AAGTGAATTGCGGTCCTCAC	301	58	2.0
Exon 9	CTTCTAGTAAGCTTGAAC T	GGCCAGTGATGGAATGAAC	319	59	2.0
Exon 10-11	GGGTGAGTTGAGGGGTAG GT	GCTACCGGGGTTTGCTAAAG	485	60	2.0
Exon 12-13	ACACAAATGGCCCTTCAGT C	GCCAGGAAGAAGTTCACCAC	497	60	2.0
Exon 14	CCACAGAACGCTTTTTGCT A	GATTGCAAACCCTTCTGACC	388	59	2.0
Exon 15	TGCGTATTAATGCCCAT	AAGGCCCTGGATCCTACTA	396	60	2.0

	C				
Exon 16	TAAC TTTGGGGAGGGTTTC C	CATTTAGACAGGCGTGCACTT	483	59	2.0
Exon 17*	GTATTCACAGAGACTTGGC GGC	AAACCTGCAAGGAAAATCCTTC ACGG	175	60	2.0
Exon 17	GCACCATATAACATAGGCA GCA	GCAAAGGTAGGGTGTGCATT	333	60	2.0
Exon 18- 19	CCTCGCAGCAGGAGCAGT	CTCAGGGCTGAGCATTCTG	388	65	2.5
Exon 20	GCCTGGGATTATTGTGGAA A	ATCTTCCAGCCCAGGATAGG	399	60	2.0
Exon 21- 1	TCAGTGTGATTTGGTTCTT GG	GGATGCAAGTTGAAGGGAAA	396	59	2.0
Exon 21- 2	ATTCTGTGCGGATCAACTC C	AGGTTCTGGCATCATCATCA	496	59	2.0

Regione esonica amplificata. I frammenti amplificati comprendono anche regioni introniche (o regioni fiancheggianti 5' nel caso dell'esone 1) che precedono o che seguono gli esoni indicati. Per la coppia di primers che amplifica la regione indicata come exon 21-2, il frammento amplificato comprende solo la regione 3'-UTR del gene.

* Primers reported by Marklund et al. (1998)

** Primers reported by Xu et al. (2006)

13. Risultati e Discussione

13.1 Analisi di mutazioni nel gene MC1R

Le mutazioni già identificate nel gene MC1R di suino che permettono di distinguere i 5 principali alleli a questo locus sono stati analizzate mediante PCR-RFLP o mediante analisi della lunghezza dei frammenti amplificati.

Le figure 2, 3, e 4 riportano i pattern elettroforetici che risultanti dalle digestioni con gli enzimi riportati in materiali e metodi e gli elettroferogrammi risultanti dall'analisi con il sequenziatore.

La combinazione dei genotipi per queste mutazioni permette di attribuire i diversi alleli agli animali analizzati, come riportato nelle figure 5 e 6 tratte rispettivamente dai lavori di Kijas et al. (1998) e Kijas et al. (2001).

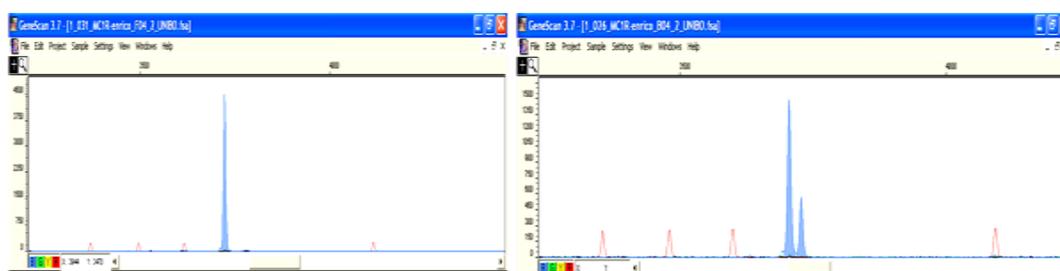


Figura 2: Analisi dell'inserzione di 2 bp del gene MC1R

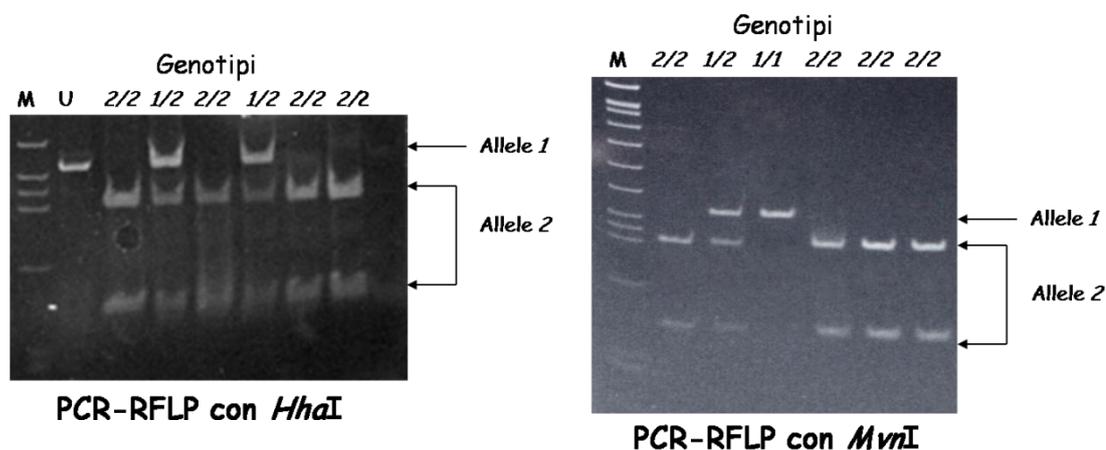


Figure 3 e 4: Esempi di analisi PCR- RFLP del frammento di 154 bp

Le frequenze alleliche e quelle genotipiche a questo locus relative ai campioni analizzati di Suino Nero sono riportati nelle tabelle 4 e 5.

<i>ED1</i>	0.093
<i>ED2</i>	0.724
<i>EP</i>	0.152
<i>E+</i>	0.005
<i>e</i>	0.021

Tabella 4: frequenze alleliche al locus *MC1R*

<i>ED1/ED2</i>	0.176
<i>ED2/e</i>	0.033
<i>ED2/ED2</i>	0.476
<i>E^{D1}/ED1</i>	0.010
<i>E^{D1}/ED2</i>	0.285
<i>E^{D1}/e</i>	0.010
<i>ED2/E+</i>	0.010

Tabella 5: frequenze genotipiche al locus *MC1R*

Dall'analisi di queste tabelle emerge che nel Suino Nero Siciliano sono presenti cinque alleli al locus *MC1R*.

L'allele E^{D2} (identificato anche nella razza Hampshire) è risultato il più frequente (0,724) mentre l'allele ***e*** (caratteristico della razza Duroc) il più raro (0,021). Le frequenze degli alleli E^{D1} (caratteristico delle razze Large Black e Meishan) ed E^P (identificato anche nelle razze Pietrain, Large White e Landrace) sono risultate essere rispettivamente di 0,093 e 0,152. Pur con bassissima frequenza in alcuni campioni è stato identificato l'allele E^+ (caratteristico del cinghiale europeo) con una frequenza di 0,005.

Considerando i cinque alleli identificati a questo locus, delle 10 possibili combinazioni genotipiche, solo 7 sono state identificate con le seguenti frequenze: E^{D2}/E^{D2} , 0,476; E^{D1}/E^{D2} , 0,176; E^{D2}/E^P , 0,285; E^{D2}/e , 0,033; E^{D1}/E^P , 0,010; E^P/e , 0,010; E^{D2}/E^+ , 0,010.

Questi risultati, in parte inattesi data la relativa omogeneità del colore del mantello nella razza Nera Siciliana (a parte la presenza di alcuni soggetti con macchie bianche), mette in evidenza diversi aspetti.

1) Il colore nero del mantello è determinato da diversi alleli a questo locus, come già evidenziato in altre razze (E^{D2} , E^{D1} e E^P). Eventuali effetti epistatici di altri geni non dovrebbero alterare in modo significativo il caratteristico colore nero del mantello negli animali di questa razza (con eccezione dei soggetti con macchie bianche).

a. E' possibile ipotizzare che nella costituzione della razza vi siano state diverse immissioni di sangue proveniente da altre razze, come già evidenziato da Russo et al. (2004). Questi Autori, infatti, hanno individuato nel pool genetico della razza Nera Siciliana la presenza di alcuni alleli in loci con effetti produttivi la cui origine potrebbe essere ricondotta ad altre razze. In particolare, è stata evidenziata la presenza dell'allele g.1843T del gene *RYR1* che determina il difetto della carne noto come PSE oltre che ad ipermuscolarità e che è quasi completamente fissato nella razza Pietrain e nelle linee commerciali costituite per la produzione di carne da consumo fresco originate dalla razza Pietrain. In questa razza è presente solo l'allele E^P a questo locus. In altre razze a mantello nero quali l'Hampshire è presente solo l'allele E^{D2} mentre in razze nere di origine cinese è presente in modo prevalente l'allele E^{D1} . La presenza dell'allele E^{D1} potrebbe essere riconducibile agli influssi che la razza Nera Siciliana ha subito all'inizio del secolo scorso con l'introduzione di sangue di razza Napoletana e Casertana. L'allele E^+ dovrebbe derivare dal cinghiale e potrebbe

essere stato introdotto accidentalmente nella razza per il fatto che la maggior parte dei suini di razza Nera Siciliana erano allevati allo stato brado o semi-brado. L'introduzione del sistema plain-air potrebbe aver ridotto la presenza dell'allele selvatico, soprattutto, negli allevamenti che sono passati a questo metodo più razionale. L'allele *e*, che determina il colore rosso recessivo caratteristico della razza Duroc, indica chiaramente l'influsso di quest'ultima razza nella costituzione del pool genico del Nero Siciliano. Il fatto che sia recessivo rispetto al nero potrebbe favorire il suo mantenimento nella razza in quanto non si esprime in modo evidente. Tuttavia, è da ricordare che in alcuni casi è stato riportata la presenza di setole rossastre in diversi soggetti, presenza che, comunque, porta all'esclusione degli animali dal registro anagrafico del Nero Siciliano.

- 2) L'elevata eterozigotità a questo locus (0,4997) conferma la discreta variabilità genetica presente nella razza come già evidenziato in altri studi che analizzano altri marcatori molecolari o un numero maggiore di loci. Questo aspetto è di particolare rilevanza ai fini della conservazione e mantenimento del tipo genetico autoctono studiato, in quanto sembra che non abbia subito un processo di inbreeding e quindi di riduzione della variabilità genetica. L'elevata variabilità genetica può risultare particolarmente vantaggiosa nel caso si dovessero impostare programmi di miglioramento genetico.
- 3) La presenza di più alleli al locus *MC1R* nella razza Nera Siciliana non permette di utilizzare mutazioni di questo gene per impostare una tracciabilità di razza. Infatti, la condizione ottimale che vede la fissazione di un allele o al massimo la presenza di

un secondo allele a bassa frequenza non si verifica nella razza oggetto di studio. Tuttavia, da un'analisi delle frequenze emerge che si potrebbero eventualmente impostare alcuni criteri per la scelta dei riproduttori in modo da portare ad una eliminazione di alcuni degli alleli a bassa frequenza. Questa ipotesi sarà discussa più avanti.

Nessuna nuova mutazione è stata identificata con i sequenziamenti effettuati per confermare alcuni genotipi.

13.2 Analisi di mutazioni nel gene *KIT*

Tre mutazioni già descritte in letteratura (Marklund et al. 1998; Giuffra et al. 2002; Johansson Moller et al. 1996) sono state analizzate nei soggetti campionati di razza Nero Siciliano e nei suini con mantello grigio.

La prima mutazione analizzata (Figg. 7a e 7b) è stata quella della prima base dell'introne 17 che permette di identificare se è presente la così detta "splice site mutation", caratteristica dei suini con mantello bianco portatori degli alleli della serie *I* (*I*¹, *I*², *I*³) al locus *Dominant White*.

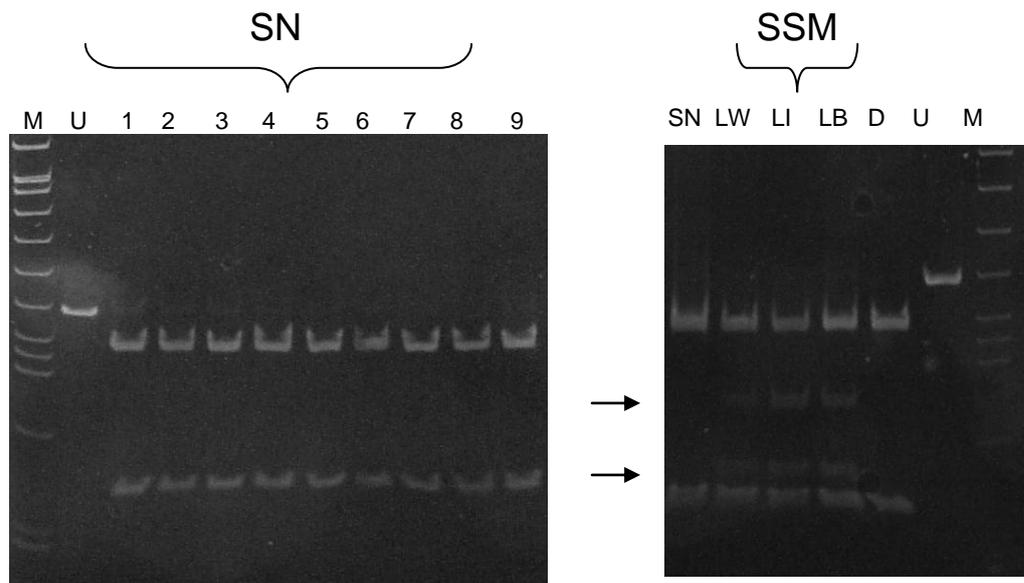


Figure 7a: analisi di 9 campioni di suino Nero Siciliano;
 7b: analisi di suini di diverse razze: SN-Suino Nero, LW-Large White, LI-Landrace italiana, LB-Landrace belga, D-Duroc, U-Frammento intero non digerito, M-Marker
 PCR-RFLP con endonucleasi *NlaIII* che analizza la splice site mutation

Nessuno dei suini analizzati appartenenti alla razza Nera Siciliana e alla popolazione di suini grigi è risultato portatore di questa mutazione.

Come controllo e per avere dati di riferimento oltre a quelli già disponibili in letteratura, questa mutazione è stata analizzata su alcuni campioni di suini delle razze Large White Italiana, Landrace Italiana, Duroc Italiana, Landrace Belga, Pietrain e Hampshire (Tab. 6)

Tabella 6: Suini analizzati per le tre mutazioni del gene *KIT* già riportate in letteratura (Marklund et al. 1998; Giuffra et al. 2002; Johansson Moller et al. 1996). E' riportato il numero dei suini per ciascun genotipo.

Razze	N. di animali	Splice site mutation		Kit duplication		Indel introne 18		
		+	-	+	-	160/160	160/164	164/164
Nero Siciliano (completamente neri)	70	0	70	0	70	0	0	70
Nero Siciliano (con alcune macchie bianche)	24	0	24	7	17	0	0	24
Grigi*	17 (10)	0	10	0	10	3	14	0
Large White Italiana	49	48	1	49	0	0	49	0
Landrace Italiana	44	44	0	44	0	0	43	1
Duroc Italiana	30	0	30	0	30	0	0	30
Landrace Belga	31	30	1	31	0	0	31	0
Pietrain	26	0	26	22	4	0	0	26
Hampshire	18	0	18	0	18	0	0	18
Totale	309	122	180	153	149	3	137	169

* Solo alcuni suini Grigi (n. = 10) sono stati analizzati per la splice site mutation e per la duplicazione.

Tutti i soggetti delle razze Duroc Italiana, Hampshire e Pietrain non sono risultati portatori della splice site mutation confermando dati

già disponibili in letteratura (Marklund et al. 1998). Tutti i soggetti delle razze bianche (Large White Italiana, Landrace Italiana e Landrace Belga), tranne due animali (uno della razza Large White Italiana e uno della razza Landrace Belga) sono risultati portatori della splice site mutation.

Questi dati confermano quanto già descritto in letteratura per le razze bianche. I due soggetti che non sono risultati portatori della splice site mutation dovrebbero essere omozigoti per l'allele I^P . E' da evidenziare che in questo studio è stata analizzata per la prima volta la razza Landrace Belga per questa mutazione. Infatti, i dati riportati in letteratura sebbene trattassero altre razze bianche non avevano ancora preso in esame questa razza, che, comunque, per questa mutazione non ha evidenziato sorprese rispetto a quello che si sarebbe potuto supporre.

Per quanto riguarda il test utilizzato per mettere in evidenza la presenza della duplicazione a questo locus (Kit insertion; Giuffra et al., 2002), l'analisi dei Suini Neri Siciliani con mantello completamente nero ha evidenziato che nessuno di questi soggetti con il fenotipo classico della razza è portatore di eventuali copie duplicate del gene *KIT*.

Però, per quanto riguarda i suini di questa razza che portano alcune parti bianche (facciolo, con lista frontale bianca e/o con balzane bianche o altre parti bianche), nei 24 soggetti campionati con questo fenotipo, 7 sono risultati portatori di almeno un allele con la duplicazione del locus *KIT*, presumibilmente l'allele I^P . La non completa associazione tra la presenza del possibile allele I^P con la presenza di macchie bianche permette di ipotizzare che altri geni o altre mutazioni nel gene *KIT* possano determinare il fenotipo osservato nei rimanenti 17 animali.

Tutti i suini Grigi non sono risultati portatori di un allele con duplicazione del gene *KIT*. Lo stesso genotipo è stato osservato in tutti

gli animali di razza Duroc Italiana e Hampshire, confermando i dati già riportati in letteratura (Giuffra et al., 2002). Anche per quanto riguarda le altre razze analizzate i risultati ottenuti in questo studio confermano quanto riportato in bibliografia (Giuffra et al. 2002) anche se per la razza Landrace Belga questo è il primo studio che genotipizza questo marcatore.

Tutti i soggetti di razza Large White Italiana e Landrace Italiana hanno dato un risultato positivo al test della duplicazione mentre alcuni soggetti di razza Pietrain (4 su 26) non sono risultati portatori di alleli con duplicazione a questo locus.

L'analisi dell'inserzione di 4 bp nell'introne 18 (Johansson Moller et al. 1996) ha mostrato alcuni dati interessanti.

In particolare tutti i soggetti della popolazione di Grigi sono risultati almeno portatori dell'allele di 160 bp (con delezione di 4 bp). Inoltre 3 dei 17 soggetti analizzati sono risultati omozigoti per lo stesso allele. Nessun soggetto è risultato omozigote per l'allele di 164 bp (cioè con l'inserzione di 4 bp). Questo dato, alla luce dei genotipi identificati per le altre due mutazioni (splice site mutation e kit duplication) rendono unici i soggetti di questa popolazione rispetto a tutte le altre razze analizzate.

Questi genotipi particolari a questo locus dei soggetti Grigi potrebbe essere causato da un effetto di bottleneck (collo di bottiglia) e deriva genetica nella popolazione nella quale solo pochi riproduttori potrebbero avere originato questa popolazione che comunque, rimane, al momento di dimensioni ridotte. Tuttavia, si potrebbe anche ipotizzare che la presenza dell'allele di 160 bp potrebbe essere associato al caratteristico colore grigio di questi animali. Ulteriori studi saranno necessari per confermare questa ipotesi campionando, se sarà possibile (ipotesi da valutare solo dopo un censimento più preciso della popolazione di suini Grigi), un numero più elevato di animali ed

eventualmente analizzando la segregazione dei fenotipi e dei genotipi in incroci programmati.

Per quanto riguarda il genotipo all'introne 18 dei suini di razza Nero Siciliano, tutti i soggetti analizzati, sia quelli completamente neri, sia quelli con parti bianche (inclusi quelli positivi alla duplicazione), sono risultati omozigoti per l'allele di 164 bp. Questo genotipo è risultato l'unico identificato in tutti gli animali di razza Duroc Italiana, Pietrain e Hampshire. Per quanto riguarda le razze bianche, un solo animale di razza Landrace Italiana è risultato avere il genotipo 164/164.

Nessun altro studio aveva ancora riportato soggetti omozigoti per l'allele di 164 bp per questa mutazione intronica in suini bianchi. Tutti gli altri sono risultati con genotipo 160/164 confermando i dati in letteratura (Johansson Moller et al. 1996).

13.3 Sequenziamento del gene *KIT* e identificazione di nuove mutazioni

Per verificare se altre mutazioni al locus *KIT* potessero determinare parti bianche nei suini Neri Siciliani con parti bianche ma che non erano portatori dell'allele I^P e per effettuare uno studio sulla variabilità di questo gene nella razza e nei suini Grigi, in questo studio è stato sequenziato completamente il gene *KIT* nelle sue parti codificanti (includendo parti introniche fiancheggianti, 3'-UTR e 5'-flanking region) per diversi animali di diverse razze e colore.

Per il sequenziamento di tutti i 21 esoni codificanti che compongono questo gene sono stati selezionati 4 suini di razza Nera Siciliana completamente neri, 2 suini di razza Nera Siciliana con parti bianche ma non portatori dell'allele I^P , 2 suini della stessa razza con parti bianche ma portatori dell'allele I^P , 3 suini Grigi, un suino di razza Large White Italiana e 2 suini di razza Duroc Italiana.

In totale sono state ottenute 106400 bp di sequenziamento.

L'allineamento e il confronto delle sequenze ottenute nei diversi suini selezionati ha permesso di identificare 32 mutazioni. La numerazione delle mutazioni identificate è stata riportata utilizzando la sequenza di riferimento disponibile in banca dati (GenBank accession number AC141857)

Tre di queste mutazioni sono inserzioni/delezioni (indel) di 1 bp, o 4 bp (2 indel). Le rimanenti mutazioni sono single nucleotide polymorphisms.

Delle 17 mutazioni esoniche, solo 2 dell'esone 3 cambiano l'aminoacido codificato (mutazioni missenso). Queste mutazioni sono la g.58390G>A e la g.58455G>A.

La prima causa un cambio di una arginina con una lisina in posizione 173 della sequenza proteica (p.R173K). Da un'analisi in database di sequenze risulta che tale mutazione è già stata identificata in altri suini da alcuni altri autori. La seconda mutazione cambia una valina in una metionina in posizione 195 della sequenza proteica (p.V195M). Da un'analisi in banca dati, questa mutazione non è risultata essere già stata identificata in altri suini di altre razze.

Le altre mutazioni esoniche che non cambiano un aminoacido sono già state riportate in sequenze del cDNA del gene *KIT* presenti in banca dati. Per tutte le altre mutazioni introniche, dal momento che in banca dati esiste solo una sequenza completa del gene *KIT* che include tutte le sequenze introniche (GenBank accession number AC141857), questo studio le identifica per la prima volta.

Dall'analisi di tabella 7 risulta che nessuna delle mutazioni identificate è associata ad una particolare colorazione del mantello, se si confrontano i suini di razza Nera Siciliana completamente neri con quelli che portano macchie bianche. Questo dato risulta evidente anche se solo pochi soggetti sono stati sequenziati per i due tipi fenotipici.

Dal sequenziamento dei suini di razza Nero Siciliano con parti bianche che portano la duplicazione e del suino di razza Large White Italiana si evidenzia che negli SNP eterozigoti l'altezza dei picchi di sequenziamento è diversa rispetto ai soggetti eterozigoti di animali che non presentano la duplicazione (Fig. 8)

Questa è una chiara conferma della presenza di Copy Number Variation (CNV) nei soggetti con la duplicazioni per cui un allele è probabilmente presente in un rapporto diverso dal 50:50 degli altri soggetti.

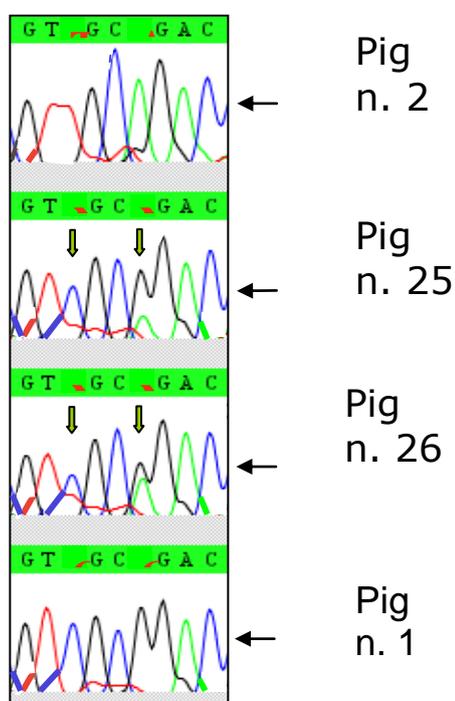


Figura 8: Picchi che evidenziano i suini eterozigoti (25 e 26) per la mutazione dell'esone 3

SNP/indel position ¹	Nero Siciliano (black)				Nero Siciliano (black white)				LW	Gray			Duroc		AC14 1857
					Without duplicati on	With duplicati on									
	1	2	8	9	7	26	25	46	LW1	10 1	10 2	10 3	M	N	
Exon 3 58361	C C	TT	CC	CC	CC	CT	CT	CC	CC	C C	C C	C C	CC	CC	C
Exon 3 58364	G G	AA	GG	GG	GG	AG	AG	GG	GG	G G	G G	G G	GG	GG	G
Exon 3 58390	G G	AA	GG	GG	GG	AG	AG	GG	GG	G G	G G	G G	GG	GG	G
Exon 3 58394	C C	TT	CC	CC	CC	CT	CT	CC	CC	C C	C C	C C	CC	CC	C
Exon 3 58418	C C	GG	CC	CC	CC	CG	CG	CC	CC	C C	C C	C C	CC	CC	C
Exon 3 58424	C C	AA	CC	CC	CC	CA	CA	CC	CC	C C	C C	C C	CC	CC	C
Exon 3 58455	G G	GG	AG	AA	GG	AG	GG	GG	GG	G G	G G	G G	GG	GG	G
Intron 3 58511	T T	CC	TT	TT	TT	CT	CT	TT	CT	TT	TT	TT	TT	TT	T
Intron 3 59466	A G	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AG	GG	G G	G G	G G	GG	AA	G
Intron 3 59511	C T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	C C	C C	C C	CC	TT	C
Intron 3 59513	T C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TC	TT	TT	TT	TT	TT	CC	T
Intron 3 59525	T C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TC	TT	TT	TT	TT	TT	CC	T
Intron 4 64098*			Ins TT TT/ ins TT TT	Ins TT TT/ ins TT TT	-/-			-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Ins TT TT/ ins TT TT	-
Intron 4 64105			TT	TT	CC			CC	CC	C C	C C	C C	CC	TT	C
Exon 5 64191			AA	AA	GG			GG	AG	G G	G G	G G	GG	AA	G
Exon 5 64198			GG	GG	AA			AA	AG	AA	AA	AA	AA	GG	A
Exon 6 69784	C C	CC	CT	CC	CT	CC	CC	CT*	*CT	TT	TT	TT	TT	CC	
Exon 6 69790	A A	AA	AC	AA	AC	AA	AA	AC*	*AC	C C	C C	C C	CC	AA	
Exon 6 69814	A A	GG	AG	GG	AG	GG	AG*	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	
Intron 7	T	CT	CT	CC	CT	CT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	

87187	T														
Exon 9 90482	A A	AG	AG	GG	AG	AG	GG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	A
Intron 9 91927	A A	AA	AA	G G	G G	G G	AA	AA	A						
Intron 12 92954**	--	--	-C	CC	--	-C	--	--	--	--	--	--	--	--	-
Exon 13 93062	A A	AA	AG	GG	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	A
Intron 14 96511	T T	TT	TT	CC	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	T
Intron 17 98513	G G	GG	GA	G G	G G	G G	GG	GG	G						
Exon 18 100973	C C	CT	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	C C	C C	C C	CC	CC	C
Intron 18 101084***	In s A G T T/ In s A G T T	Ins AG TT/ Ins AG TT	Ins AGTT /DelAG TT	De IA GT T/ De IA GT T	Ins A GT T /D el A GT T	Ins A GT T /D el A GT T	Ins AG TT/ Ins AG TT	Ins AG TT/ Ins AG TT	DelAG TT						
Exon 19 101183	C C	CC	CC	TT	CC	CT	CC	CC	CC	C C	C C	C C	CC	CC	C
Exon 20 101967	C C	CC	CT	TT	CC	CT	CC	CC	CC	C C	C C	C C	CC	CC	C
Exon 21 (3'-UTR) 104085	G G	GG	GT	TT	GG	GT	GG	GG	GG	G G	G G	G G	GG	GG	G
Exon 21 (3'-UTR) 104209	C C	CC	CT	TT	CC	CT	CC	CC	CC	C C	C C	C C	CC	CC	C

14. Possibilità di utilizzo di marcatori nei geni *MC1R* e *KIT* per la tracciabilità di razza dei prodotti di Nero Siciliano: eventuali implicazioni.

Come in parte già accennato nella trattazione dei risultati ottenuti per il gene *MC1R*, marcatori a questo locus non risultano utilizzabili per una loro applicazione in un programma di tracciabilità molecolare di razza dei prodotti di Nero Siciliano.

Questo è dovuto al fatto che questa razza non è fissata per un allele di questo gene, che sarebbe la situazione ottimale. Un'altra eventualità che potrebbe trovare alcune applicazioni per una tracciabilità di razza potrebbe essere la presenza di un secondo allele a frequenza non molto elevata rispetto a quello predominante. Nemmeno questa ipotesi di lavoro si verifica nel suino Nero siciliano per il gene *MC1R*.

Tuttavia, i dati ottenuti per il gene *MC1R* potrebbero fornire alcuni spunti di lavoro nel caso si volesse pensare ad un possibile suo utilizzo nella tracciabilità di razza. Si potrebbe, infatti, valutare la possibilità di eliminare dalle popolazioni di questa razza gli alleli con frequenza più bassa (E^+ , e), in modo da poter escludere in un eventuale test che i prodotti analizzati possano derivare dalla razza Duroc o da Cinghiali.

L'eventuale eliminazione di un altro allele che non ha una frequenza molto elevata, l'allele E^P , potrebbe permettere di escludere la presenza delle razze bianche e della razza Pietrain.

Queste ipotesi dovrebbero essere valutate confrontando gli svantaggi di operare una selezione mirata dei riproduttori, con possibilità di perdita di variabilità genetica nella popolazione e valutando inoltre i costi di tale operazione, con i possibili vantaggi che ne potrebbero derivare, cioè la possibilità di escludere alcune razze in un eventuale applicazione del test molecolare con questo gene.

Le ipotesi di lavoro qui elencate per il gene *MC1R* potrebbero avere un senso se ovviamente potrebbero risultare convenienti direttamente dal punto di vista economico considerando anche aspetti indiretti che potrebbero essere riassunti nel concetto di valorizzazione di questa razza locale. Tuttavia, prima di applicare le azioni che includono il gene *MC1R* dovrebbe essere valutata la possibilità di identificare altri marcatori in altri geni che potrebbero avere caratteristiche spendibili per una tracciabilità di razza dei prodotti di Nero Siciliano.

Il secondo gene che è stato analizzato in questa tesi (gene *KIT*) offre la possibilità di poter escludere tutti i soggetti che portano la splice site mutation, presente nella maggior parte dei suini a mantello bianco. Questo aspetto è particolarmente interessante perché la maggior parte delle frodi potrebbe derivare dalla commercializzazione di carne di suini commerciali (in genere a mantello bianco) venduti come carne di suino Nero Siciliano.

Infatti, ovviamente, il colore del mantello non risulta distinguibile dal colore della carne.

Per poter mettere a punto un test più efficace di tracciabilità di razza utilizzando il gene *KIT*, potrebbe essere utile escludere dalla popolazione di Nero Siciliano i soggetti portatori della duplicazione portatori dell'allele f^P . Questi soggetti rappresentano solo circa il 7% della popolazione di suini di Nero Siciliano.

Dai dati ottenuti in questo studio, risulterebbe che la semplice riduzione della popolazione con macchie bianche, dovrebbe automaticamente portare ad una riduzione della frequenza dell'allele f^P in quanto i soggetti positivi al test della duplicazione sono stati solo quelli con macchie bianche.

Tuttavia, solo un terzo circa (7 su 24) dei soggetti con macchie bianche è risultato portatore della duplicazione al locus *KIT*, indicando

che la presenza di macchie bianche non è un indicatore completamente efficace e un test molecolare dovrebbe essere utilizzato.

15. Conclusioni

Da questo studio sono emerse diversi risultati con alcune possibilità applicative per la tracciabilità di razza dei prodotti di Nero Siciliano e altri aspetti di particolare interesse in genetica delle popolazioni, caratterizzazione di popolazioni suine locali e informazioni di base su geni che influenzano il colore del mantello nella specie suina.

Per quanto riguarda l'aspetto della tracciabilità molecolare, il gene *KIT*, sulla base delle caratteristiche genetiche di questa razza confrontata con quella delle altre razze offre già alcune possibilità di applicazione anche se i dati dovrebbero poi essere valutati con cautela.

Il gene *MC1R* non offre, al momento, spunti per una sua applicazione per la tracciabilità di razza dei prodotti di Nero Siciliano. Per quanto riguarda la popolazione di suini Grigi, l'analisi del gene *KIT* apre alcune importanti ipotesi di lavoro che dovranno essere ulteriormente verificate in quanto un allele di questo gene sembrerebbe associato al particolare fenotipo di questi animali.

Il sequenziamento di una parte consistente del gene *KIT*, includendo tutti i 21 esoni codificanti, ha messo in evidenza nuove mutazioni che potranno essere oggetto di ulteriori studi per analizzare

la variabilità di questo gene in cui la pressione selettiva operata dall'uomo ne ha certamente influenzato il livello.

Questo studio, infatti, rappresenta il primo studio di sequenziamento massiccio di questo gene su un numero abbastanza importante di animali.

Il confronto dei genotipi di alcune mutazioni del gene *KIT* in diverse altre razze suine ha permesso di identificare alcuni aspetti non ancora descritti in letteratura.

Inoltre, per quanto riguarda la presenza di macchie bianche nei suini di razza Nera Siciliana è stato messo in evidenza che l'allele *I^P* del gene *KIT* non è il solo determinante di questo fenotipo ma altre mutazioni nello stesso gene o, più probabilmente, l'effetto di altri geni modificatori dovrebbe essere la causa della presenza di macchie bianche. L'ipotesi che altri geni abbiano un effetto su questo fenotipo deriva dal fatto che il sequenziamento di alcuni soggetti di Nero Siciliano con macchie bianche non ha rilevato nessun marcatore specifico degli animali con questo fenotipo.

Ulteriori studi dovranno essere condotti per identificare questi geni. Un approccio innovativo potrebbe essere l'impiego dei nuovi chip dell'Illumina che permettono di analizzare contemporaneamente più di 60.000 SNP per volta mettendo a disposizione gli strumenti necessari per un'analisi di associazione con potenza di identificare tipizzando solo pochi campioni i geni con effetto sul carattere studiato.

Tale esperimento sarà programmato non appena i chip saranno commercialmente disponibili.

16. Bibliografia:

- Adams M.D., Kerlavage A.R., Fleischmann R.D., Fuldner R.A., Bult C.J., Lee N.H., Kirkness E.F., Weinstock K.G., Gocayne J.D., White O., (1995): *Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence*, «Nature», 377, (6547, Suppl.), pp. 3-174.
- ALEXANDER L.J., SMITH T.P., BEATTIE C.W., BROOM M.F. (1997): *Construction and characterization of a large insert porcine YAC library*, «Mammalian Genome», 8, pp. 50-51.
- ANAS, 2008 – Associazione Nazionale Allevatori Suini, www.anas.it.
- ANDERSSON L., HALEY C.S., ELLEGREN H., KNOTT S.A., JOHANSSON M., ANDERSSON K., ANDERSSON-EKLUND L., EDFORS-LILJA I.,

- FREDHOLM M., HANSSON I., HÅKANSSON J., LUNDSTÖM K. (1994): *Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs*, «Science», 263, pp. 1771-1774.
- ANDERSON S.I., LOPEZ-CORRALES N.L., GORICK B., ARCHIBALD A.L. (2000): *A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector*, «Mammalian Genome», 11, pp. 811-814.
- ARCHIBALD A.L., HALEY C.S., BROWN J.F., COUPERWHITE S., MCQUEEN H.A., NICHOLSON D., COPPIETERS W., VAN DE WEGHE A., STRATIL A., WINTERØ A.K., FREDHOLM M., LARSEN N.J., NIELSEN V.H., MILAN D., WOLOSZYN N., ROBIC A., DALENS M., RIQUET J., GELLIN J., CARITEZ J.-C., BURGAUD G., OLLIVIER L., BIDANEL J.-P., VAIMAN M., RENARD C., GELDERMANN H., DAVOLI R., RUYTER D., VERSTEGE E.J.M., GROENEN M.A.M., DAVIES W., HØYHEIM B., KEISERUD A., ANDERSSON L., ELLEGREN H., JOHANSSON M., MARKLUND L., MILLER J.R., ANDERSON DEAR D.V., SIGNER E., JEFFREYS A.J., MORAN C., LE TISSIER P., MULADNO, ROTHSCHILD M.F., TUGGLE C.K., VASKE D., HELM J., LIU H.-C., RAHMAN A., YU T.-P., LARSON R.G., SCHMITZ C.B. (1995): *The PiGMaP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa)*, «Mammalian Genome», 6, pp. 157-175.
- BARRINGTON A., PEARSON K. (1906) *On the inheritance of coat color in cattle. I. Shorthorn crosses and pure Shorthorn*. Biometrika 4, 427-437
- BUIATTI P. G. (1979): *Stato attuale della suinicoltura in Italia*. In Atti Conv. Inter. Rassegna suinicola Internazionale: *Il miglioramento genetico della produzione suinicola per selezione e per incrocio*. Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Reggio Emilia
- BERGE S. (1961): *Heredity of colour in pigs (in Norwegian)*. Tidsskriftr. Norske Landbruk

- BUSHNELL R. L. (1943): *Linked colour factors in Hampshire swine. Linkage of black and the basic white of the white belt pattern.* Journal of Heredity, 34, 303-306.
- CAETANO A.R., JOHNSON R.K., POMP D. (2003): *Generation and sequence characterization of a normalized cDNA library from swine ovarian follicles*, «Mammalian Genome», 14, pp. 65-70.
- CARR-SAUNDERS A. M. (1922): *Note on inheritance in swine*, Science, 55, 19
- CASSELLA, P. (1921). *Il maiale: razze, allevamento, ingrassamento, malattie*. F. Battiato, Ed. Catania (Italy).
- CHABOT B., STEPHENSON D.A., CHAPMAN V.M., BRESMER Å., BERNSTEIN A. (1988) *The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus*. Nature 335, 88-89.
- CHOWDHARY B.P. (1998): *Cytogenetics and physical chromosome maps*, in *Genetics of the Pig* a cura di M.F Rothschild e A. Ruvinsky, CAB Publishing, pp. 199-264
- CHIOFALO, L. (2000a). *Proteggere il suino Nero dei Nebrodi. Messina (Italy) 27 gen.*, Gazzetta del Sud (49), 26: 11.
- CHIOFALO, L., LIOTTA, L. (2003). *Suino Nero, una perla in terra Siciliana*. Rivista di Suinicoltura 44 (10): 79-86.
- CONSTANTINESCU G. K. (1933): *Vererbungsversuche an Schweinen unter besonderer Berücksichtigung des Mangalitza Schweines*. Zeitschrift. B. 26, 395-427.
- COMMITTEE FOR THE STANDARDIZED KARYOTYPE OF THE DOMESTIC PIG (1988): *Standard karyotype of the domestic pig*, «Hereditas», 109, pp. 151-157.
- DVORAK C.M., HYLAND K.A., MACHADO J.G., ZHANG Y., FAHRENKRUG S.C., MURTAUGH M.P. (2005): *Gene discovery and expression*

- profiling in porcine Peyer's patch*, «Veterinary Immunology and Immunopathology», 105, pp. 301-315.
- ELLEGREN H., CHOWDHARY B., JOHANSSON M., ANDERSSON L. (1994): *A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of recombination*, «Genetics», 137, pp. 1089-1100.
- ECHARD G., MILAN D., YERLE M., LAHBIB-MANSAIS Y., GELLIN J. (1992): *The gene map of the pig (Sus scrofa domestica L.): a review*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 61, pp. 146-151.
- FAHRENKRUG S.C., ROHRER G.A., FREKING B.A., SMITH T.P., OSOEGAWA K., SHU C.L., CATANESE J.J., DE JONG P.J. (2001): *A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration*, «Mammalian Genome», 12, pp. 472-474.
- FAHRENKRUG S.C., FREKING B.A., SMITH T.P., ROHRER G.A., KEELE J.W. (2002): *Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in porcine expressed genes*, «Animal Genetics», 33, pp. 186-195.
- FUJII J., OTSU K., ZORZATO F., DE LEON S., KHANNA V.K., WEILER J.E., O'BRIEN P.J., MACLENNAN D.H. (1991): *Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia*, «Science», 253, pp. 448-451.
- GELLIN J., BROWN S., MARSHALL GRAVES J.A., ROTHSCHILD M., SCHOOK L., WOMACK J., YERLE M. (2000): *Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animals*, «Mammalian Genome», 11, pp. 140-144.
- GIMENEZ-MARTIN G., LOPEZ-SAEZ J.F., MONGE F.G. (1962): *Somatic chromosomes of the pig*, «Journal of Heredity», 53, pp. 281-290.
- GIUFFRA E., TÖRNSTEN A., MARKLUND S., BONGCAM-RUDLOFF E., CHARDON P., KIJAS, J. M. H., ANDERSON S. I., ARCHIBALD A. L.,

- ANDERSSON L. (2002): *A large duplication associated with dominant white colour in pigs originated by homologous recombination between LINE elements flanking KIT*. «Mammalian Genome», 13, 569-577.
- GUSTAVSSON I. (1990): *Chromosomes of the pig*, «Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine», 34, pp. 73-107.
- HALEY C., VISSHER P. (2000): *DNA markers and genetic testing in farm animal improvement: current applications and future prospects*, «Roslin Institute Annual Report», 98-99, pp. 28-39.
- HAMASIMA N. SUZUKI H., MIKAWA A., MOROZUMI T., PLASTOW G., MITSUHASHI T. (2003): *Construction of a new porcine whole-genome framework map using a radiation hybrid panel*, «Animal Genetics», 34, pp. 216-220.
- HANSET R. (1959): UN APERCU DE LA GENETIQUE DES ROBES CHEZ LE PORC. ANNALES DE MEDECINE VETERINAIRE, 103, 53-66.
- HAWKEN R.J., MURTAUGH J., FLICKINGER G.H., YERLE M., ROBIC A., MILAN D., GELLIN J., BEATTIE C.W., SCHOOK L.B., ALEXANDER L.J. (1999): *A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map*, «Mammalian Genome», 10, pp. 824-830.
- HETZER H. O. (1945a): *Inheritance of coat colour in swine. I. General survey of major colour variations in swine*. Journal of Heredity, 36, 121-128.
- HETZER H. O. (1945b): *Inheritance of coat colour in swine. II. Results of Landrace by Poland-China crosses*. Journal of Heredity, 36, 187-192.
- HETZER H. O. (1945c): *Inheritance of coat colour in swine. III. Results of Landrace by Berkshire crosses*. Journal of Heredity, 36, 255-266.

- HETZER H. O. (1945c): *Inheritance of coat colour in swine. IV. Analysis of hybrids of Landrace and Large Black*. Journal of Heredity, 36, 309-312.
- Hetzer H. O. (1948): Inheritance of coat colour in swine. Results of Landrace by Hampshire crosses Journal of Heredity, 39, 123-128
- JOHANSSON M., ELLEGREN H., ANDERSSON L., GUSTAVSSON U., RINGMAR-CEDERBERG E., ANDERSON K., EDFORD-LILJA I., AND ANDERSSON L. (1992): *The gene for dominant white colour in the pig is closely linked to ALB and PDGFRA on chromosome 8*. Genomics, 14, 965-969
- JOHANSSON M., ELLEGREN H., ANDERSSON L. (1995): *Comparative mapping reveals extensive linkage conservation – but with gene order rearrangements – between the pig and the human genomes*, «Genomics», 25, pp. 682-690.
- JOHANSSON MOLLER M., CHAUDHARY R., HELLMÉN E., HÖYHEIM B., CHOWDHARY B., ANDERSSON L. (1996) *Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the KIT gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor*. Mammalian Genome 7, 822-830.
- KIJAS J.M.H., WALES R., TÖRNSTEN A., CHARDON P., MOLLER M., ANDERSSON L. (1998) *Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs*. Genetics 150, 1177-1185.
- KIJAS, J. M. H., MOLLER, M., PLASTOW, G., ANDERSSON, L., 2001. A frameshift mutation in *MC1R* and high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics*, 158, 779-785.
- KOSSWING C. AND OSSENT H. P., (1931), *Die Vererbung der Haarfarben beim Schwein. Zeitschrift für induktive*

- Abstammungs – und Vererbungslehre. Abstamm. –u. Vererblehre* B. 22, 297-381.
- KRONACHER C. (1924): *Vererbungsversuche und Beobachtungen an Schweinen. Z. induktive Abstamm. –u. Vererblehre*, 34, 1-120.
- LALLEY P. E MCKUSICK V. (1985): *Report of the committee on comparative mapping. Eighth International Workshop on Human Gene Mapping*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 40, pp. 536-566.
- LALLEY P., DAVIDSSON M., GRAVES J., O'BRIEN S., WOMACK J., RODERICK T., CRE-GOLDBERG M., HILLYARD A., DOOLITTLE D., ROGERS J. (1989): *Report of the committee on comparative mapping. Tenth International Workshop on Human Gene Mapping*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 51, pp. 503-532.
- LAUVERGNE J.J AND CANOPE I. (1979): *Etude de quelques variants colorés du porc Crèole de la Guadeloupe. Annales de Génétique et de Sélection Animale* 11, 381-390.
- LAUVERGNE J.J AND OLLIVIER L. (1966): *A propos de colorations observées lors de croisements entre porc de Pietrain et porcs large White. Annales de Génétique*, 9, 39-41.
- LEEB T., RETTENBERGER G., HAMEISTER H., BREM G., BRENIG B. (1995): *Construction of a porcine YAC library and mapping of the cardiac muscle ryanodine receptor gene to chromosome 14q22-q23*, «Mammalian Genome», 6, pp. 37-41.
- LIOTTA, L., D'ALESSANDRO, E., CHIOFALO, V. (2006). *Performance migliorabili per le scrofe Nero siciliano. Rivista di Suinicoltura*, 47 (11): 30-35.
- LIOTTA, L., CHIOFALO, B., ZUMBO, A., CHIOFALO, V. (2003). *Nero Siciliano pig for the production of the "S.Angelo" salame:*

- sensorial characteristics*. In Proc. 54th Annual Meeting of the EAAP, Rome (Italy) 2003, Ynze van der Honing (ed.). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 372.
- LUSH J. L., (1921): *Inheritance in swine*. Journal of Heredity, 12, 57-71.
- MARCHI, E. (1897). *Il maiale*. U. Hoepli - Ed. Milano (Italy)
- MARKLUND L., JOHANSSON MOLLER M., HØYHEIM B., DAVIES W., FREDHOLM M., JUNEJA R. K., MARIANI P., COPPIETERS W., ELLEGREN H., ANDERSSON L. (1996): *A comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig – Large White intercross*, «Animal Genetics», 27, pp. 255-269.
- MARKLUND S., KIJAS J., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., RÖNNSTRAND L., FUNA K., MOLLER M., LANGE D., EDFORS-LILJA I., ANDERSSON L. (1998) *Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig*. Genome Res. 8, 826-833.
- MARKLUND L., JOHANSSON MOLLER M., SANDBERG K., ANDERSSON L. (1996) A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. Mamm. Genome 7, 895-9.
- MCCONNELL J., FECHHEIMER N.S., GILMORE L.O. (1963): *Somatic chromosomes of the domestic pig*, «Journal of Animal Science», 22, pp. 374-379.
- MCPHEE H. C., RUSSEL E. Z. AND ZELLER J. (1931): *An inbreeding experiment with Poland-China swine*. Journal of Heredity, 22, 393-403.
- MILOJIC M. (1966): *Colour inheritance when crossing certain pig breeds (in Serbo-Croat)*. Zbornik radova Poljoprivrednog Fakulteta, Universitet u Beogradu, 14, 1-13.
- MONDELLO, L., COSTA, R., CHIOFALO, B., CHIOFALO, V., LIOTTA, L., DUGO, P., DUGO, G. (2003). *Caratteristiche della frazione*

lipidica delle carni di suino Nero siciliano mediante GC ultraveloce. In *Qualità e Sicurezza degli Alimenti*, Milano, 2004, Marchelli R. (ed.). Morgan Edizioni Tecniche, Milano, pp. 439-441.

MIKAWA S., AKITA T., HISAMATSU N., INAGE Y., ITO Y., KOBAYASHI E., KUSUMOTO H., MATSUMOTO T., MIKAMI H., MINEZAWA M., MIYAKE M., SHIMANUKI S., SUGIYAMA C., UCHIDA Y., WADA Y., YANAI S., YASUE H. (1999): *A linkage map of 243 DNA markers in an intercross of Göttingen miniature and Meishan pigs*, «*Animal Genetics*», 30, pp. 407-417.

NOBIS W., REN X., SUCHYTA S.P., SUCHYTA T.R., ZANELLA A.J., COUSSENS P.M. (2003): *Development of a porcine brain cDNA library, EST database, and microarray resource*, «*Physiological Genomics*», 16, pp. 153-159.

O'BRIEN S.J., MENOTTI-RAYMOND M., MURPHY W.J., NASH W.G., WIENBERG J., STANYON R., COPELAND N.G., JENKINS N.A., WOMACK J.E., MARSHALL GRAVES J.A. (1999): *The promise of comparative genomics in mammals*, «*Science*», 286, pp. 458-481.

OLSON T.A. (1999) *Genetics of colour variation*. In: FRIES R., RUVINSKY A. "The Genetics of Cattle" CABI Publishing, Oxon, UK.

PIELBERG G., OLSSON C., SIVÄNEN A. C. AND ANDERSSON L, (2002): *Unexpectedly high allelic diversity at the KIT locus causing dominant White colour in the domestic pig*. «*Genetics*», 160, 305-311.

PIELBERG G., DAY A. E., PLASTOW G. S., ANDERSSON L. (2003): *A sensitive method for detecting variation in copy numbers of duplicated genes*. «*Genome Research*», 13, 2171-2177.

- PINO, N. (1947). *Il patrimonio suino della Sicilia e la sua etnologia alla luce di ricerche biometriche su alcuni caratteri razziali*. Zootecnica e Veterinaria. La fecondazione artificiale II , 1: 1-15 Milano (Italy).
- RATTINK A.P., FAIVRE M., JUNGERIUS B.J., GROENEN M.A., HARLIZIUS B. (2001): *A high-resolution comparative RH map of porcine chromosome (SSC) 2*, «Mammalian Genome», 12, pp. 366-370.
- REMPEL W. E. AND MARSHALL M. L. (1990): *Inheritance of coat colour in swine. Genetics of Swine*. Agricultural Research Service, Roman L. Hrusca U.S. Meat Animal Research Center, Nebraska.
- RINK A., SANTSCHI E.M., EYER K.M., ROELOFS B., HESS M., GODFREY M., KARAJUSUF E.K., YERLE M., MILAN D., BEATTIE C.W. (2002): *A first-generation EST RH comparative map of the porcine and human genome*, «Mammalian Genome», 13, pp. 578-587.
- ROBBINS L.S., NADEAU J.H., JOHNSON K.R., KELLY M.A., ROSELLI-REHFUSS L., BAACK E., MOUNTJOY K.G., CONE R.D. (1993) Pigmentation phenotypes of variant Extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827-34.
- ROHRER G.A., ALEXANDER L.J., KEELE J.W., SMITH T.P.L., BEATTIE C.W. (1994): *A microsatellite linkage map of the porcine genome*, «Genetics», 136, pp. 231-245.
- ROHRER G.A., ALEXANDER L.J., HU Z., SMITH T.P.L., KEELE J.W., BEATTIE C.W. (1996): *A comprehensive map of the porcine genome*, «Genome Research», 6, pp. 371-391.
- ROGEL-GAILLARD C., BOURGEOUX N., SAVE J.C., RENARD C., COULLIN P., PINTON P., YERLE M., VAIMAN M., CHARDON P. (1997): *Construction of a swine YAC library allowing an efficient*

recovery of unique and centromeric repeated sequences, «Mammalian Genome», 8, pp. 186-192.

ROGEL-GAILLARD C., BOURGEAUX N., BILLAULT A., VAIMAN M., CHARDON P. (1999): *Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 85, pp. 205-211.

RUSO V. (1988): *Pig carcass and meat quality: requirements of industry and consumers*. In Proc. Meet: Pig Carcass and meat quality. Università di Bologna.

RUSO V., DAVOLI R., FONTANESI L., SCOTTI E., BRAGLIA S., COLOMBO M., ZAMBONELLI P., 2004a. *Use of single nucleotide polymorphism to study variability in local and cosmopolitan pig breeds reared in Italy*. Options Méditerranéennes, 76, 61-65

RUSO V., FONTANESI L., DAVOLI R., CHIOFALO L., LIOTTA L., ZUMBO A., 2004b. *Analysis of single nucleotide polymorphisms in major and candidate genes for production traits in Nero Siciliano pig breed*. Ital. J. Anim. Sci., 3, 19-29.

RUSO V. e NANNI COSTA L. (1995): *Suitability of pig meat for salting and the production of quality processed products*, «Pig News and Information», 16, pp. 17N-26N.

RUSO V., DALL'OLIO S., DAVOLI R., COSCELLI M.B., BIGI D. (1996): *Studio del locus Alotano nelle razze suine allevate in Italia mediante test PCR*, «Zootecnica e Nutrizione Animale», 22, pp. 33-38.

SEARLE A.G. (1968) *Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals*. Logos Press, London, UK.

SMITH T.P., FAHRENKRUG S.C., ROHRER G.A., SIMMEN F.A., REXROAD C.E., KEELE J.W. (2001): *Mapping of expressed sequence tags*

- from a porcine early embryonic cDNA library, «Animal Genetics», 32, pp. 66-72.
- SOLLER M. (1991): *Mapping quantitative trait loci affecting traits of economic importance in animal populations using molecular markers*, in *Gene-Mapping Techniques and Applications*, a cura di L.B. Schook, H.A. Lewin, D.G. McLaren, Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 21-49.
- STONE L. (1963): *A chromosome analysis of the domestic pig (Sus scrofa) utilizing a peripheral blood culture technique*, «Canadian Journal of Genetics and Cytology», 5, pp. 38-42.
- TAKEUCHI S., SUZUKI H., YABUUCHI M., TAKAHASHI S. (1997) A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta* 1308, 164-8.
- TEODOREANU N. I. (1935): *Vererbungsbeobachtungen über die Farbe des roten und des schwarzen Mangaliczaschweines*. *Analele Academici Române (Menortile) Sectianii Stitifice* 10, Men. 11, 20 pp.
- THIELSCHER H. H., (1986): *Colour variations in crosses of wild boars*, *Veterinary Medical Review, German Federal Republic* (1), 183-188.
- TOSSER-KLOPP G., BENNE F., BONNET A., MULSANT P., GASSER F., HATEY F. (1997): *A first catalog of gene involved in pig ovarian follicular differentiation*, «Mammalian Genome», 8, pp. 250–254.
- VÅGE D.I, KLUNGLAND H., LU D., CONE R.D. (1999) Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm. Genome* 10, 39-43.
- VALVERDE P., HEALY E., JACKSON I., REES J.L., THODY A.J. (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene

are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genet.* 11, 328-30.

- VILLANUEVA B., PONG-WONG R., FERNANDEZ J., TORO M.A. (2005): *Benefits from marker-assisted selection under an additive polygenic genetic model*, «*Journal of Animal Science*», 83, pp. 1747-1752.
- WAKEFIELD M.J. E GRAVES J.A. (1996): *Comparative maps of vertebrates*, «*Mammalian Genome*», 7, pp. 715-716.
- WANTWORTH E.N. AND LUSH J. L. (1923): *Inheritance in swine*. *Journal of Agricultural Research*, 23, 557-582.
- WINTERO A.K., FREDHOLM M., DAVIES W. (1996): *Evaluation and characterization of a porcine small intestine cDNA library*, «*Mammalian Genome*», 7, pp. 509-517.
- WØDSEDALEK J.E. (1913): *Spermatogenesis of the pig with special reference to the accessory chromosomes*, «*Biological Bulletin*», 25, pp. 8-32.
- WRIGHT S. (1917) *Colour inheritance in mammals*. *J. Hered.* 8, 224-235.
- S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J., Beattie C.W. (1994) *A genetic linkage map for cattle*. *Genetics* 136, 619-639.
- XU G. L., REN J., DING N. S., AY H. S., GUO Y. M., CHEN C. Y. AND HUANG L. S.. (2006): *Genetic analysis of the KIT and MC1R genes in Chinese indigenous pigs with belt-like coat color phenotypes*, «*Animal Genetics*», 37, 518-528.
- YERLE M., LAHBIB-MANSAIS Y., MELLINK C., GOUREAU A., PINTON P., ECHARD G., GELLIN J., ZIJLSTRA C., HAAN N., BOSMA A. A., CHOWDHARY B., GU F., GUSTAVSSON I., THOMSEN P. D., CHRISTENSEN K., RETTENBERGER G., HAMEISTER H., SCHMITTZ A., CHAPUT B., FRELAT G. (1995): *The PiGMaP consortium cytogenetic map of the domestic pig (Sus scrofa domestica)*, 6, pp. 176-186.

- YERLE M., ECHARD G., ROBIC A., MIRAL A., DUBUT-FONTANAT C., RIQUET J., PINTON P., MILAN D., LAHBIB-MANSAIS Y., GELLIN J. (1996): *A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 73, pp. 194-202.
- YERLE M., LAHBIB-MANSAIS Y., PINTON P., ROBIC A., GOUREAU A., MILAN D., GELLIN J. (1997): *The cytogenetic map of the domestic pig (Sus scrofa domestica)*, «Mammalian Genome», 8, pp 592-607.
- YERLE, M., PINTON. P., ROBIC A., ALFONSO A., PALVADEAU Y., DELCROS C., HAWKEN R., ALEXANDER L., BEATTIE C., SCHOOK L., MILAN D., GELLIN J., (1998): *Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs*, «Cytogenetics and Cell Genetics», 82, pp.182-188.
- YERLE M., PINTON P., DELCROS C., ARNAL N., MILAN D., ROBIC A. (2002): *Generation and chracterization of a 12,000-rad radiation hybrid panel for fine mapping in pig*, «Cytogenetics and Genome Research», 97, pp. 219-228.
- ZUMBO, A., CHIOFALO, B., PICCOLO, D., CHIOFALO, L. (2003). *Chemical composition of the meat of "Nero Siciliano" pigs reared outdoor and plein air*. Ital. J. Anim. Sci. (Suppl. 1) 2: 379-381.
- ZIJLSTRA C., BOSMA A.A., DE HAAN N.A., MELLINK C. (1996): *Construction of a cytogenetically characterized porcine somatic cell hybrid panel and its use as a mapping tool*, «Mammalian Genome», 7, pp. 280-284.

Enrico D'Alessandro

Titolo della tesi: Analisi di due geni (*KIT* e *MC1R*) che influenzano il colore del mantello nel suino e potenziali applicazioni per la tracciabilità di razza dei prodotti di suino Nero Siciliano
Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università di Sassari

Enrico D'Alessandro

Titolo della tesi: Analisi di due geni (*KIT* e *MC1R*) che influenzano il colore del mantello nel suino e potenziali applicazioni per la tracciabilità di razza dei prodotti di suino Nero Siciliano
Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università di Sassari

Enrico D'Alessandro

Titolo della tesi: Analisi di due geni (*KIT* e *MC1R*) che influenzano il colore del mantello nel suino e potenziali applicazioni per la tracciabilità di razza dei prodotti di suino Nero Siciliano
Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università di Sassari

Enrico D'Alessandro

Titolo della tesi: Analisi di due geni (*KIT* e *MC1R*) che influenzano il colore del mantello nel suino e potenziali applicazioni per la tracciabilità di razza dei prodotti di suino Nero Siciliano
Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale – Università di Sassari