

IL GENE MC1R E IL COLORE DEL MANTELLO DELLA RAZZA ROMAGNOLA

Marilli M. (1), Fornarelli F. (1), Casaleggi M. (1), Milanese E. (2),
Filippini F. (3), Crepaldi P. (1)

- (1) Istituto di Zootechnia Generale - Università di Milano – Facoltà di Agraria, Via Celoria, 2 - 20133 Milano, Italia
- (2) Istituto di Zootechnia - Università Cattolica del S. Cuore - Via Emilia Parmense, Piacenza, Italia
- (3) ANABIC - Via Visciolosa, 06070 S. Martino in Colle, Perugia, Italia

RIASSUNTO - Nella razza Romagnola sono stati recentemente segnalati 3 vitelli caratterizzati da una pigmentazione rossa del mantello che persiste oltre i tre mesi di età. Poiché un colore diverso dallo standard di razza preclude la registrazione degli animali nel Libro Genealogico, è stata studiata la delezione G310 nel gene MC1R, supponendone un coinvolgimento nel colore anomalo di questi vitelli. Su 243 soggetti di razza Romagnola, le analisi di PCR-RFLP hanno permesso di osservare la delezione G310 allo stato omozigote nei 3 vitelli con pigmentazione rossa mentre in altri 27 animali tale mutazione è stata osservata allo stato eterozigote. Poiché la delezione G310 allo stato omozigote causa un danno economico agli allevatori, a partire dal settembre 2004, l'ANABIC ha deciso di sottoporre i maschi, prima dell'ingresso al centro genetico, ad uno screening per accertare che non siano portatori di tale mutazione.

PAROLE CHIAVE: Cattle, Coat colour, Romagnola breed, MelanoCortic-1 Receptor gene.

INTRODUZIONE

Ancor oggi, sebbene la selezione sia prevalentemente basata sui caratteri quantitativi, la pigmentazione del mantello di un animale costituisce un carattere molto importante. Infatti, fra le caratteristiche considerate nella selezione delle razze bovine, una pigmentazione corrispondente alla descrizione riportata nello standard di razza permette l'identificazione di un animale e costituisce uno dei requisiti fondamentali per la sua registrazione nel Libro Genealogico. I difetti di pigmentazione possono portare all'esclusione degli animali che non presentano la pigmentazione tipica della razza di appartenenza.

A livello fenotipico i soggetti che appartengono alla razza Romagnola mostrano pelle pigmentata e colore del mantello bianco con aree grigie, diffuse prevalentemente attorno agli occhi, sul collo, sui quarti posteriori e sulle orecchie. Come nella maggior parte delle razze podoliche, i vitelli di razza Romagnola alla nascita presentano un colore fromentino che diventa bianco intorno ai tre mesi di età. La presenza di peli rossi, in particolare nella regione frontale, è tollerata in animali giovani e/o in quelli con eccellenti caratteri morfo-funzionali, mentre la persistenza di una pigmentazione rossa più diffusa causa l'esclusione dell'animale dal Libro Genealogico.

In base agli studi mendeliani si riteneva che il colore del mantello della razza Romagnola, definito feomelanico ad estremità eumelaniche ed analogo a quello di altre razze italiane da carne (Piemontese, Chianina e Marchigiana), fosse da attribuire alla presenza dell'allele A^y (feomelanico ad estremità eumelaniche) al locus Agouti, dell'allele C^{ch} (chincilla) al locus Albino e dell'allele selvatico E^+ fissato al locus Estensione (Renieri *et al.*, 1984).

Nei bovini, i geni implicati nel meccanismo della pigmentazione sono stati studiati a livello molecolare soltanto negli ultimi dieci anni (Klungland *et al.*, 1995; Joerg *et al.*, 1996; Seitz *et al.*, 1999; Rouzard *et al.*, 2000; Berryere *et al.*, 2003) e finora non sono state evidenziate mutazioni dei geni che mappano ai loci mendeliani Agouti (A) ed Albino (C).

Fra i geni coinvolti nella pigmentazione, il gene MC1R (MelanoCortic-1 Receptor), che mappa al locus Estensione, è uno dei più importanti sia per il suo ruolo fondamentale nella regolazione

della melanogenesi sia per la possibilità di utilizzare il suo polimorfismo per discriminare fra animali che appartengono a razze bovine diverse al fine di tracciare i loro prodotti (Chung *et al.*, 2000; Maudet e Taberlet, 2002; Crepaldi *et al.*, 2003a; Crepaldi *et al.*, 2003b; Russo *et al.*, 2004). Per questo gene sono stati descritti, accanto all'allele selvatico E^+ , che codifica per un recettore funzionale, l'allele dominante E^d , caratterizzato dalla sostituzione T297C ed associato ad un'elevata produzione di eumelanina e l'allele recessivo e , caratterizzato dalla delezione G310, che provoca la formazione di un recettore difettoso e la conseguente produzione di pigmento feomelanico. I due alleli, E^d ed e , determinano rispettivamente la prevalenza nel mantello di eumelanina (nera) e di feomelanina (gialla/rossa).

La comparsa di soggetti con difetti di pigmentazione, quali la persistenza del colore rosso diffuso nel mantello, ha suggerito di indagare il polimorfismo del gene MC1R nella razza Romagnola per valutare se la delezione G310 fosse coinvolta in questo tipo di alterazione.

MATERIALI E METODI

Il DNA di 243 soggetti di razza Romagnola è stato analizzato con un protocollo di PCR-RFLP (Crepaldi *et al.*, 2003a). In particolare, sono stati testati 195 maschi (prevalentemente tori e torelli del centro genetico dell'ANABIC, 1 toro aziendale e 1 vitello feomelanico) e 48 femmine (incluse 2 vitelle feomelaniche). I 3 vitelli feomelanici erano stati indicati dal veterinario aziendale e dall'allevatore per l'anomalo colore del mantello. Per due di questi vitelli, allevati nella medesima azienda, è stato possibile analizzare entrambi i genitori mentre per il terzo abbiamo analizzato soltanto la madre. Nell'azienda di provenienza dei primi due vitelli abbiamo campionato la maggior parte delle femmine studiate (45 su 48) ed il toro aziendale. Il DNA è stato estratto a partire dai campioni ematici e di seme utilizzando kit commerciali (Macherey-Nagel e Genra). I prodotti di PCR di alcuni soggetti sono stati sequenziati (Servizio di Sequenziamento dell'Università di Padova).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati del campione analizzato per la delezione G310 (allele e) sono riportati in tabella 1.

Le 2 vitelle ed il vitello segnalati per la persistenza del colore rosso del mantello oltre i tre mesi di età sono risultati omozigoti per la delezione. Tali animali presentavano una diffusione persistente di peli rossi sul mantello sensibilmente differente dalla pigmentazione standard della razza descritta in precedenza. La pigmentazione anomala osservata non ha permesso la registrazione di questi tre soggetti nel Libro Genealogico della razza Romagnola.

Si è inoltre osservato che le madri dei 3 vitelli erano normalmente pigmentate pur essendo eterozigoti per la stessa mutazione. Anche il padre di 2 di questi vitelli, un toro aziendale, è risultato eterozigote per questa mutazione e presentava una pigmentazione standard. Non è stato possibile analizzare il padre del terzo vitello. L'ANABIC ha confermato la paternità dei primi due vitelli attraverso l'analisi dei microsatelliti effettuata presso i laboratori LGS.

Dopo aver ottenuto questi risultati (Marilli *et al.*, 2003), è stata estesa l'analisi di questa mutazione ad un maggior numero di soggetti di razza Romagnola scegliendo gli animali del centro genetico dell'ANABIC ed un certo numero di femmine allevate nell'azienda di provenienza dei due vitelli omozigoti e del toro aziendale eterozigote. In totale, inclusi i 3 vitelli sopra riportati, si è osservata una frequenza dell'allele e pari al 12,5% ed al 5,38% rispettivamente nelle femmine e nei maschi analizzati (tabella 1). L'elevata percentuale di femmine portatrici dell'allele e può essere spiegata dalla presenza del toro aziendale eterozigote per la delezione G310 nell'azienda in cui 45 delle 48 bovine sono state campionate.

La maggior parte dei maschi eterozigoti erano tori approvati per l'inseminazione strumentale.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti confermano che l'allele e , corrispondente alla delezione G310 nel gene MC1R, segrega nella razza Romagnola nonostante questa presenti un modello di pigmentazione

caratterizzato dall'allele selvatico E^+ al locus Estensione e supportano l'ipotesi che tale delezione sia responsabile, allo stato omozigote, della pigmentazione rossa che persiste oltre i tre mesi di età, come osservato nei 3 vitelli analizzati.

Il 54% dei soggetti maschi portatori dell'allele e ha nel proprio pedigree un toro eterozigote nato nel 1976. La presenza della delezione G310 nella razza Romagnola può essere dovuta all'introggressione dell'allele e da un'altra razza bovina utilizzata durante un periodo di contrazione numerica fra le due guerre mondiali. Si ritiene infatti che alcuni soggetti di razza Pezzata Rossa Italiana, caratterizzata dalla fissazione di questo allele, possano essere stati utilizzati in incroci con la Romagnola. Tuttavia è anche possibile che questo allele fosse presente fin da tempi più remoti nella razza Romagnola. Infatti esistono testimonianze storiche circa la presenza fra il 1300 e il 1500 d.C., di soggetti con mantello rosso (*pillamini rubei* o *roxus*) accanto a soggetti tipicamente bianchi (*pillamini albi* o *bonelli*) (Silvestri, 1975).

In conclusione, la delezione G310 allo stato omozigote è risultata associata a questa alterazione del colore del mantello. Questo allele, al pari delle patologie recessive, può causare danni economici agli allevatori poiché attualmente animali omozigoti per questa mutazione vengono esclusi dai programmi di selezione anche se figli di tori di elevato valore genetico. Recentemente l'ANABIC ha avviato un programma di screening dei giovani riproduttori destinati al centro genetico per escludere i soggetti portatori di tale allele al fine di evitare la comparsa di animali rossi.

Questa ricerca è un esempio di applicazione pratica dello studio dei geni del colore. L'approfondimento delle basi genetiche del complesso meccanismo della pigmentazione nella specie bovina potrebbe inoltre essere utile allo scopo di individuare marcatori molecolari che possono essere utilizzati nella selezione e nella gestione delle diverse razze e nell'aumentare il valore delle razze autoctone e dei loro prodotti.

Tabella 1 - Bovini di razza Romagnola omozigoti ed eterozigoti per la delezione G310 (allele e).

Table 1 - Number of Romagnola breed animals homozygous or heterozygous for the G310 (e allele) deletion.

Genotipo MC1R MC1R Genotype	E^+/e	e/e	tot.
Maschi /Males	19	1	195
Femmine/Females	8	2	48

Ricerca finanziata da FIRST 2001 e FIRST 2003.

BIBLIOGRAFIA - REFERENCES

- Berryere T.G., Schmutz S.M., Schimpf R. J., Cowan C.M., Potter J. 2003. *Animal Genetics* 34:169-175.
- Chung E.R., Kim W.T., Kim Y.S., Han S.K. 2000. *Korean J Anim Sci* 42:379-390.
- Crepaldi P., Marilli M., Gorni C., Meggiolaro D., Cicogna M., Renieri C. 2003a. *Ital. J. Anim. Sci.* 2(1):13-15.
- Crepaldi P., Marilli M., Meggiolaro D., Fornarelli F., Renieri C., Milanese E., Ajmone-Marsan P. 2003b. *Pigment Cell Research* 16:578.
- Joerg H., Fries H.R., Meijerink E., Stranzinger G.F. 1996. *Mammalian Genome* 7:317-318.
- Klungland H., Vage D.I., Gomez-Raya L., Adalsteinsson S., Lien S. 1995. *Mammalian Genome* 6:636-639.
- Marilli M., Meggiolaro D., Bonato L., Filippini F., Negrini R., Ajmone---Marsan P., Crepaldi P. 2003. *Pigment Cell Research* 16:598.
- Maudet C., Taberlet P., 2002. *J. Dairy Sci.* 85:707-715.

- Renieri C., Lauvergne J.J., Valfre' F. 1984. Riv. Zoot. Vet. 12(5):310-317.
- Rouzaud F., Martin J., Gallet P.F., Delourme D., Goulemot-Leger V., Amigues Y., Menissier F., Leveziel H., Julien R., Oulmouden A. 2000. Genet. Sel. Evol. 32:511-520.
- Russo V., Fontanesi L., Scotti E., Tazzoli M., Dall'olio S., Davoli R. 2004 Eaap-55th Annual Meeting, Bled, P. 62
- Seitz J.J., Schmutz S.M., Thue T.D., Buchanan F.C. 1999. Mammalian Genome 10:710-712.
- Silvestri A., 1975. Tipografia Moderna F.Lli Zauri, Castrocaro Terme, Italy.

MC1R GENE AND COAT COLOUR OF ROMAGNOLA BREED

Marilli M. (1), Fornarelli F. (1), Casaleggi M. (1), Milanesi E. (2),
Filippini F. (3), Crepaldi P. (1)

ABSTRACT - Three Romagnola calves over three months of age with the persistence of red coat pigmentation were recently picked out. Since this coat colour bars them from Herd Book registration, we investigated the G310 deletion on MC1R gene assuming that it could be involved in this anomalous pigmentation. On a sample of 243 Romagnola animals, including the 3 calves showing the red persistent pigmentation, we found the G310 deletion at the homozygous state only in these 3 calves and in 27 animals at the heterozygous state. These data confirm that the e allele segregates in this breed, causing at the homozygous state red coat colour and accordingly an economic loss for the breeders. Since September 2004 ANABIC has decided to screen all males before they enter the genetic centre to avoid carriers on G310 deletion.

KEYWORDS: Cattle, Coat colour, Romagnola breed, MelanoCortic-1 Receptor gene.

INTRODUCTION

Nowadays, even though selection is mainly based on quantitative traits, pigmentation of animals is still of great importance. In fact, among the characteristics considered by breeders, pigmentation corresponding to that described in the breed standard permits animal identification and it constitutes one of the fundamental requisites for registration in the Herd Book. Pigmentation defects can even lead to the exclusion of those animals not presenting the typical pigmentation of the breed they belong to.

From a phenotypic point of view the Romagnola breed has pigmented skin and white coat colour with shades of grey, mainly spread around eyes, on the neck, hindquarters and ears. As in many long-horned breeds, also the Romagnola calf is wheat-coloured at birth and turns white towards three months of age. The presence of red hair, in particular in the sinciput region, is tolerated in young animals and/or in those with excellent morpho-functional traits whereas the persistence of more widely spread red pigmentation leads to the exclusion from the Herd Book. On the basis of Mendelian genetic studies it is believed that Romagnola coat colour, described as phaeomelanistic with eumelanistic extremities and similar to that of some other Italian beef breeds (Piedmontese, Chianina and Marchigiana) can be attributed to the presence of the A^y allele (phaeomelanistic with eumelanistic extremities) at the Agouti locus and to the C^{ch} allele (chinchilla) at the Albino locus, while the Extension locus, harbouring the MC1R gene, should present the E^+ wild type allele fixed (Renieri *et al.*, 1984).

In cattle, genes implicated in pigmentation have only been studied at molecular level over the last ten years (Klungland *et al.*, 1995; Joerg *et al.*, 1996; Seitz *et al.*, 1999; Rouzard *et al.*, 2000; Berryere *et al.*, 2003). So far there is no molecular evidence of any mutation at the gene encoding for the Mendelian loci Agouti (A) and Albino (C).

Among the genes involved in pigmentation, one of the most important is the MC1R (MelanoCortic-1 Receptor) due to its fundamental role in the regulation of melanogenesis and

the possibility of using its polymorphism to discriminate among animals belonging to different bovine breeds in order to trace their production (Chung *et al.*, 2000; Maudet and Taberlet, 2002; Crepaldi *et al.*, 2003a; Crepaldi *et al.*, 2003b; Russo *et al.*, 2004). In the MC1R gene, besides the wild E^+ allele, coding for a functional receptor, also the dominant E^d allele and the recessive e allele were described (Klungland *et al.*, 1995). The E^d allele is characterised by a T297C substitution, determining the production of high black eumelanin quantities. The recessive e allele is characterised by the G310 deletion leading to the formation of a non-functional receptor with pheomelanin synthesis. These two principal mutations of the MC1R gene, E^d and e , are respectively tied to the prevalence of eumelanin (black) and pheomelanin (red /yellow) in coat.

The appearance of animals showing persistent widespread red pigmentation encouraged us to investigate the polymorphism of the MC1R gene in this breed in order to evaluate if the G310 deletion could be responsible for this alteration in the Romagnola breed.

MATERIALS AND METHODS

DNA of 243 Romagnola animals with a PCR-RFLP protocol (Crepaldi *et al.*, 2003a) was analysed. In particular 195 males (mainly young bulls of the ANABIC genetic centre, 1 farm bull and 1 pheomelanic calves) and 48 cows (including 2 pheomelanic calves) were tested. The 3 calves were indicated by the farm veterinary and by the breeder for their unusual coat colour. For 2 of these calves raised on the same farm we were able to test both parents, while for the third, only the mother. On that farm we tested the majority of females (45 out of 48) and the farm bull. The DNA was extracted from whole blood and semen using commercial kit (Macherey-Nagel and Genra) following the manufacturer's procedure. The PCR products of some Romagnola animals were sequenced (Sequencing Service of the Padua University).

RESULTS AND DISCUSSION

The results on the sample analysed for the G310 deletion (e allele) are shown in Table 1.

The 2 young heifers and 1 young bull characterized by the persistency of red hair after three months of age resulted homozygous for the deletion. These 3 calves had a clearly different coat colour from the standard breed which states that Romagnola animals must have pigmented skin and white coat colour with shades of grey. This anomalous pigmentation prevented these 3 animals from being registered in the Romagnola Herd Book even if they are of high genetic merit.

Besides these 3 homozygous calves, their 3 mothers were heterozygous for the same mutation even if normally pigmented. Also the sire of two of them, a farm bull, was heterozygous for this mutation and had a standard breed pigmentation. It was not possible to analyse the sire of the third calf. The paternity of the first two calves was confirmed using microsatellite analyses (LGS laboratory).

After these first results (Marilli *et al.*, 2003), we extended the analyses of the presence of this mutation to a larger sample of Romagnola animals including males of the ANABIC genetic centre and females from the farm where the two homozygous calves and the heterozygous bull were previously found. In total, including the 3 above mentioned calves, the e allele frequency resulted of 12.5% and 5.38% respectively for the females and males analysed (Table 1). The high percentage of e carrier females could be due to the presence of a farm bull heterozygous for the G310 deletion on the farm where 45 out of 48 females have been sampled.

The majority of heterozygous bulls were approved as A.I. bulls.

CONCLUSIONS

The data shown confirm that the e allele, corresponding to the G310 deletion at MC1R gene, segregates in the Romagnola breed although the pigmentary pattern of this breed is characterized by the fixation of the wild type E^+ allele at the Extension locus. The data also

support the hypothesis that the G310 mutation is responsible, at the homozygous state, for the anomalous red pigmentation persistent after three months of age, as observed in the 3 calves analysed.

54% of the male carriers the *e* allele have, in their pedigree, a bull born in 1976 resulting heterozygous for the mutations.

The presence of this G310 deletion in the Romagnola breed could be ascribed to the introgression of this allele from another cattle breed during a period of bottlenecks between the two world wars. It is, in fact, believed that some animals of the Red Italian Spotted breed, characterised by the fixation of *e* allele, had been used in mating with Romagnola animals. Probably this allele was also present for far longer in this breed. There are, in fact, historical documents dating from 1300 A.D. to 1500 A.D. that prove the presence of red haired animals (*pillamini rubei* or *roxus*) beside the typical white animals (*pillamini albi* or *bonelli*) (Silvestri 1975).

In conclusion the G310 deletion is associated with this alteration of coat colour of the Romagnola breed. This allele, like recessive genetic diseases, causes considerable economic loss to breeders because homozygous animals are excluded from selection programs, even if offspring of sires of high genetic merit. Recently ANABIC has started a screening program of young males before they enter the genetic centre in order to exclude males carrier this allele thus avoiding the presence of red animals in the Romagnola breed.

This is a first practical application of pigmentation genes study and we are continuing along these lines to better understand the genetic basis of the complex pigmentation mechanism in the bovine species. This could lead to the recognition of molecular markers used in selecting and managing different breeds and, therefore, increase the value of autochthonous breeds and their products.

Research supported by grants from FIRST 2001 and FIRST 2003.