

METODI MOLECOLARI PER LA TRACCIABILITÀ DEI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE

Mariani P. (1), Panzitta F. (1), Nardelli Costa J. (1), Lazzari B. (1), Crepaldi P. (2), Marilli M. (2), Fornarelli F. (2), Fusi M. (2), Milanese E. (3), Negrini R. (3), Silveri R. (3), Filippini F. (4), Ajmone Marsan P. (3)

- (1) *Laboratorio Genomica Animale 2 & Laboratorio di Genetica Statistica e Bioinformatica, Fondazione Parco Tecnologico Padano, Polo Universitario, Via Einstein, 26900 Lodi, Italia*
(2) *Istituto di Zootecnia Generale - Università di Milano - Via Celoria, 2 - 20133 Milano, Italia*
(3) *Istituto di Zootecnica - Università Cattolica del S. Cuore - Via Emilia Parmense, 29100 Piacenza, Italia*
(4) *ANABIC - Via Visciolosa, 06070 S. Martino in Colle, Perugia, Italia*

RIASSUNTO - Lo sviluppo di sistemi di tracciabilità molecolare per risalire dalla vendita al dettaglio di un prodotto di origine animale alla sua origine di specie, di razza, di individuo ed eventualmente geografica, assume oggi una funzione importante nel garantire l'origine e la sicurezza dei prodotti alimentari e nel valorizzare ampi settori del comparto produttivo zootecnico nazionale. I sistemi di tracciabilità basati sulle analisi molecolari costituiscono un vantaggio rispetto al sistema attuale basato sull'uso di marche auricolari e di documentazione cartacea che segue l'animale lungo la filiera di produzione, poiché il DNA rappresenta una etichetta indelebile e inalterabile. Vengono passate in rassegna le tecniche molecolari utili per la messa a punto di sistemi di tracciabilità efficienti. Sono inoltre presentati alcuni progetti per la messa a punto di test diagnostici molecolari a cui gli Autori partecipano.

PAROLE CHIAVE: Tracciabilità, Produzioni animali, Marcatori molecolari (AFLPs, SNPs), Geni candidati.

INTRODUZIONE

Nel settore zootecnico per tracciabilità si intende la capacità di mantenere il controllo dell'origine dei prodotti e dell'identità degli animali lungo i diversi passaggi della catena alimentare, dall'allevatore alla vendita al dettaglio (McKean, 2001). La necessità di mettere a punto sistemi validi ed economici per tracciare i prodotti animali 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. Tale necessità si è sviluppata anche in seguito alle nuove condizioni di mercato dettate dall'ingresso nella UE di paesi con forti produzioni agricole a basso costo, alla riduzione degli aiuti statali o europei agli agricoltori, alla politica dell'Unione Europea orientata alla valorizzazione dei prodotti locali e non ultimo al crollo della fiducia dei consumatori a fronte delle recenti problematiche sanitarie quali lo scandalo della BSE e della diossina, il problema degli ormoni e della salmonellosi. Inoltre, la possibilità di verificare l'origine di prodotti di derivazione animale permetterebbe oltre alla certificazione dei marchi di qualità anche la valorizzazione di prodotti tipici legati a specifiche razze.

Il recente sviluppo della biologia molecolare e delle tecnologie per l'analisi diretta del DNA ha reso i sistemi diagnostici per l'identificazione genetica degli animali di semplice applicazione, relativamente poco costosi, sensibili e adatti all'automazione.

L'applicazione dell'analisi a livello del DNA per tracciare animali o prodotti di origine animale rappresenta un sistema di controllo che potrebbe essere utilmente integrato con i metodi tradizionali di identificazione degli animali, metodi che soffrono di alcune limitazioni dovute alla complessità del sistema informatico necessario, a possibili errori di registrazione a livello aziendale e ad eventuali frodi.

Il DNA infatti è una etichetta permanente e inalterabile che offre possibilità di identificazione a differenti livelli: individuale (marcatori neutri polimorfici tra individui), di razza (marcatori neutri razza-specifici, varianti alleliche di geni candidati), di specie (marcatori neutri AFLP, DNA

mitocondriale, sequenze intersperse ripetute come le SINE bovine), di taxa superiori (es. MIR; Mammalian Interspersed Repeat).

Attualmente, le classi di marcatori molecolari neutri più utilizzate spaziano dai microsatelliti, alle tecnologie ad alta efficienza quali gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.*, 1995), fino ai più recenti SNP (Single Nucleotide Polymorphism; Syvänen, 2001).

La tecnica molecolare più utilizzata per l'identificazione degli individui si basa su pannelli di microsatelliti, corte sequenze ripetute in tandem, il cui polimorfismo si basa sul differente numero di ripetizioni. Questi marcatori sono ipervariabili, altamente informativi e nelle specie di interesse zootecnico vengono impiegati, fra l'altro, per le analisi di paternità.

Altre tecnologie la cui applicazione è attualmente in fase di valutazione in campo zootecnico sono rappresentate dagli AFLP e più recentemente dagli SNP.

Gli AFLP identificano polimorfismi in frammenti di restrizione. Il vantaggio di questa tecnologia è l'efficienza con cui si possono produrre un numero elevato di marcatori, in qualsiasi specie si voglia analizzare, senza necessità di specifiche informazioni sulle sequenze del genoma.

Gli SNP identificano singole mutazioni di nucleotidi e sono presenti in tutto il genoma sia nelle regioni non codificanti che nelle regioni codificanti. La possibilità di individuare SNP all'interno delle regioni codificanti in geni candidati per essere stati selezionati in modo differenziale nelle diverse razze è di particolare importanza poichè potrebbe facilitare l'identificazione di marcatori specifici di razza. Gli SNP sono marcatori bi-allelici adatti all'automazione. La possibilità di identificare un pannello di marcatori SNP da utilizzare per la tracciabilità individuale o di razza o di specie, rappresenta quindi uno strumento innovativo assai valido in termini di costi ed accuratezza.

Un esempio di utilizzo dei marcatori SNP per l'identificazione di specie nei prodotti di origine animale è rappresentato dall'indagine basata sul sequenziamento dei geni localizzati nella regione MHC (Complesso Maggiore di Istocompatibilità) delle principali specie avicole. Indagine che ha permesso l'individuazione di due *cluster* di nucleotidi che permettono di distinguere pollo, tacchino e fagiano (Sironi *et al.*, manoscritto in preparazione).

Mentre il problema della tracciabilità individuale è essenzialmente risolto mediante i marcatori sopra descritti e le tecniche che si utilizzeranno in futuro dipenderanno esclusivamente dai costi dei saggi diagnostici, la sfida attuale è costituita dallo sviluppo di protocolli diagnostici per la tracciabilità di razza. L'assegnazione di un soggetto ad una razza utilizzando metodi molecolari può essere effettuata dal punto di vista teorico essenzialmente attraverso due strategie. Un *approccio deterministico*, che stabilisce l'origine di un prodotto analizzando marcatori molecolari con differenti varianti alleliche fissate in razze diverse. Questi marcatori, attivamente cercati in diverse specie, permetterebbero lo sviluppo di protocolli diagnostici semplici che non richiedono alcuna inferenza statistica. Un *approccio probabilistico* che utilizza invece pannelli di marcatori con frequenze alleliche caratteristiche di ciascuna razza. L'attribuzione di un individuo ad una razza viene di conseguenza effettuata attraverso analisi statistiche.

MATERIALI E METODI

Nei nostri laboratori sono attualmente in corso ricerche per l'identificazione delle razze secondo i due approcci precedentemente descritti.

In particolare marcatori casuali ed alcuni geni candidati sono stati studiati in bovini, caprini e nelle principali specie avicole domestiche alla ricerca di marcatori razza-specifici da utilizzare seguendo l'approccio deterministico.

Circa 13000 loci AFLP sono stati analizzati su pool di animali appartenenti alle razze bovine Frisona, Chianina, Piemontese, Marchigiana, Limousine e Romagnola, alla ricerca di marcatori specifici per la Romagnola. Sono stati identificati 62 marcatori specifici dei pool di individui romagnoli 17 di questi marcatori "candidati" sono stati verificati analizzando la loro presenza/assenza in singoli individui (50 Romagnoli e 20 individui delle altre 5 razze). Nessuno dei marcatori verificati si è rivelato specifico della razza Romagnola. Le differenze riscontrate a livello dei pool si sono infatti rivelate, a livello dei singoli individui, differenze di frequenze alleliche (Negrini *et al.*, 2003).

Fra i geni candidati il gene che codifica per l'ormone della crescita (GH) è stato studiato in bovini e caprini. L'analisi condotta su 8 razze bovine (Frisona, Chianina, Piemontese, Marchigiana, Maremmana, Limousine e Romagnola) non ha portato alla identificazione di varianti alleliche specifiche a questo locus.

Analizzando 10 razze caprine allevate od autoctone dell'arco alpino (Trentina, Lariana, Orobica, Bionda, Saanen, Ciavenasca, Val Passiria, Valdostana, Camosciata e Frisa) sono stati identificati aplotipi specifici di razza nella Lariana, Orobica e Valdostana (Nardelli-Costa *et al.*, 2004), nessuno dei quali è però risultato fissato all'interno delle razze.

Al contrario, lo studio del gene che codifica per il recettore dell'ormone che stimola i melanociti (MC1R) ha portato all'identificazione di alcune varianti alleliche fissate in diverse razze bovine e legate a differenti modelli di pigmentazione. Il gene MC1R, svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della melanogenesi e presenta due polimorfismi principali, la delezione G310 (allele e) e la sostituzione T296C (allele E^d) responsabili rispettivamente della pigmentazione feomelanica ed eumelanica nera (Klungland *et al.*, 1995). Queste due varianti alleliche risultano fissate in alcune delle razze allevate in Italia (Crepaldi *et al.*, 2003a). Nella Pezzata Rossa italiana e nella Limousine risulta infatti fissata la delezione G310, mentre la Frisona Italiana presenta la mutazione E^d. Anche nella razza Reggiana l'allele e risulta fissato (Russo *et al.*, 2004). Nelle altre razze (Cabannina, Chianina, Marchigiana, Grigio Alpina, Piemontese e Romagnola) nelle quali è risultato presente l'allele selvatico E⁺ e in alcuni casi l'allele E¹, il colore del mantello subisce l'azione di altri geni che influenzano il colore del mantello. Infatti nel gruppo di razze sopra riportato troviamo sia razze caratterizzate da mantello eumelanico bruno sia da mantello feomelanico ad estremità eumelaniche (Crepaldi *et al.*, 2003b). I polimorfismi di questo gene possono essere utilizzati per tracciare i prodotti di alcune razze bovine come indicato da diversi autori (Maudet e Taberlet 2002; Chung *et al.*, 2000; Crepaldi *et al.* 2003a e b; Russo *et al.*, 2004).

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

L'approccio probabilistico è stato invece affrontato con marcatori AFLP (Negrini *et al.*, 2003). L'utilizzo degli AFLP, oltre ad avere prodotto dati interessanti, ha permesso di valutare la performance di un numero elevato di marcatori biallelici nell'attribuzione di razza con metodo probabilistico. In questo senso gli AFLP, dominanti, hanno rappresentato una prova di fattibilità dell'uso degli SNP, codominanti e quindi più informativi.

Il dataset utilizzato in questo approccio è rappresentato da 132 marcatori AFLP analizzati su 416 individui appartenenti a 16 razze bovine, completato da informazioni supplementari sull'origine geografica dei campioni. Per l'assegnazione è stato utilizzato l'approccio Bayesiano implementato nel software *structure* (Pritchard *et al.*, 2000).

In totale il sistema è stato in grado di assegnare alle rispettive popolazioni di appartenenza il 91% degli individui con una probabilità superiore al 99%, il 6% con una probabilità compresa tra 90 e 98% e solo il 3% non è stato assegnato correttamente (tabella 1).

I risultati positivi ottenuti hanno permesso poi di proseguire le analisi eseguendo un test di assegnazione su un campione di 44 Romagnole utilizzate come "prova di campo". Gli animali sono stati tipizzati con le stesse combinazioni di primer utilizzate sugli animali di riferimento per creare un dataset compatibile con il precedente, ma senza inserire informazioni aggiuntive sulla provenienza dei campioni.

Il test di assegnazione ha fornito i seguenti risultati: 36 individui su 44 (82%) identificati con probabilità superiore al 99%; 4 individui (9%) identificati con una probabilità compresa tra il 90 e il 98% e 4 individui (9%) non assegnati.

In conclusione, i risultati indicano che i marcatori molecolari AFLP, ed a maggior ragione gli SNP, possono essere utilizzati come sistema diagnostico per la tracciabilità con un approccio probabilistico, in attesa della individuazione di marcatori che permettano di tracciare in modo deterministico i prodotti di origine animale.

CONCLUSIONI

Numerosi progetti sono stati recentemente lanciati sia a livello europeo sia a livello locale per la messa a punto di sistemi di tracciabilità basati sull'utilizzo dei marcatori molecolari. In questa sede verrà presentato il progetto: tracciabilità molecolare dei prodotti agro alimentari di origine animale nella regione Lombardia che prevede lo sviluppo di marcatori SNP per l'analisi di paternità, l'identificazione individuale, di razza ed eventualmente geografica nei bovini e negli ovi-caprini lombardi.

La messa a punto di un sistema efficiente di tracciabilità dei prodotti animali garantita dalle analisi molecolari conferirà un valore aggiunto, garantendo una "firma biologica", ai prodotti di origine animale contribuendo a favorirne l'espansione del mercato. Non solo, la disponibilità di test diagnostici accurati e di costo sostenibile fornirà a consumatori e ad Enti preposti al controllo uno strumento in più per garantire la sicurezza degli alimenti di origine animale. La creazione di una sinergia tra l'affermazione delle biotecnologie e la valorizzazione dei prodotti di origine animale tradizionali offrirà in ultima analisi maggiori garanzie di tracciabilità dei prodotti ai diversi soggetti della filiera produttiva, salvaguardando e valorizzando il patrimonio genetico delle realtà zootecniche di qualità.

RINGRAZIAMENTI

Le ricerche qui descritte sono state finanziate da MIUR-RBNE01SFXEY, dal Progetto regione Emilia Romagna: "Valorizzazione della razza bovina Romagnola attraverso la certificazione della carne per via molecolare" e da Fondazione Cariplo-2001.2489/11.8094; N° 2003.0721/11.80.

Tabella 1 - Numero di individui assegnati a diversi livelli di probabilità e non assegnati alle razze di appartenenza attraverso un'analisi Bayesiana di 132 marcatori AFLP.

Table 1 - Number of animals assigned to different levels of probability and not assigned to their breed by means of Bayesian analysis of 132 AFLP markers.

Razza <i>Breed</i>	Animali analizzati (n.) <i>Animals analysed (n.)</i>	p ≥ 99%	p 90-98%	Non Assegnati Not assigned
Limousine italiana <i>Italian Limousine</i>	19	18	1	0
Marchigiana	20	17	3	0
Bruna Alpina <i>Italian Brown</i>	29	27	0	2
Frisona <i>Holstein</i>	43	39	4	0
Maremmana	37	37	0	0
Chianina	19	19	0	0
Romagnola	19	18	1	0
Mucca Pisana	40	39	1	0
Calvana	39	39	0	0
Grigio Alpina <i>Grey Alpine</i>	20	16	2	2
Valdostana Pezzata Rossa <i>Valdostana Red Spotted</i>	21	19	2	1
Pezzata rossa italiana <i>Italian Red Spotted</i>	22	21	1	0
Piemontese <i>Piedmontese</i>	21	16	4	1
Podolica	20	15	3	2
Podolic				
Cabannina	22	18	2	2
Rendena	24	22	1	1

BIBLIOGRAFIA- REFERENCES

- Crepaldi P., Marilli M., Meggiolaro D., Fornarelli F., Renieri C., Milanese E., Ajmone-Marsan P. 2003a Pigment Cell Research 16:578.

- Crepaldi P., Marilli M., Gorni C., Meggiolaro D., Cicogna M., Renieri C. 2003b Proc. 15th ASPA Congress, Parma, 13-15.
- Chung E.R., Kim W.T., Kim Y.S., Han S.K. 2000, Korean J.An. Sci., 42:379-390.
- Klungland H., Vage D.I., Gomez-Raya L., Adalsteinsson S., Lien S. 1995, Mamm. Gen. 6(9):636-9.
- McKean J.D. 2001, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20 (2): 363-71.
- Maudet C., Taberlet P. 2002, J Dairy Sci., 85:707-715.
- Nardelli- Costa J., Panzitta F., Lazzari B., Stella, A., Mariani P., Caetano A.R. 2004, 50^o Congresso Brasileiro de Genética, Florianópolis, Brasil.
- Negrini R., Milanesi E., Chegdani F., Bernardi J., Filippini F., Valentini A., Ajmone-Marsan P. 2003, Proceedings of the 54th Annual Meeting of European Association for Animal Production, Rome, Italy.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000, Genetics 155:945-59.
- Russo V., Fontanesi L., Scotti E., Tazzoli M., Dall'Olio S., Davoli R. 2004, EAAP-55th Annual meeting, Bled, Slovenia, p.62.
- Syvänen A-C. 2001, Nature 2:930-942.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Van der Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995, Nucleic Acids Res. 23(21):4407-14.

MOLECULAR PROTOCOLS FOR LIVESTOCK PRODUCT TRACEABILITY

Mariani P. (1), Panzitta F. (1), Nardelli Costa J. (1), Lazzari B. (1), Crepaldi P. (2), Marilli M. (2), Fornarelli F. (2), Fusi M. (2), Milanesi E. (3), Negrini R. (3), Silveri R. (3), Filippini F. (4), Ajmone Marsan P. (3)

ABSTRACT - Diagnostic tests for molecular traceability which make it possible to establish species, breed, individual and, when possible, the geographic area of origin of livestock products, could be of great consequence in food safety and in exploiting important sectors of national livestock production. Diagnostic tests for traceability based on molecular assays offer a considerable improvement to the current diagnostic methods based on ear tags and paper documentation that follow the animal through the production chain. Indeed the former represents an indelible and permanent mark. This paper reviews and presents molecular techniques which have already been established and in progress, as possible efficient traceability assays. Also projects aiming at the establishment of new molecular traceability assays, to which Authors are Partners are described.

KEYWORDS: Traceability, Animal products, Molecular markers (AFLPs, SNPs), Candidate genes

INTRODUCTION

The term traceability indicates the possibility of keeping track of product origin and animal identity all the way through the food chain from farm to retail (McKean, 2001).

The importance of traceability of animals and animal products has grown as food production and marketing have been industrialized and globalized, thus making direct consumer control impossible. The need for a reliable diagnostic test for traceability is also due to new market condition owing to the entry into EU of countries characterized by low-cost agricultural production, the cut in National and European financial aid to farmers, the EU policy aimed at the valorization of local agricultural products, not to mention food safety issues such as BSE, dioxin, hormones and salmonellosis. Furthermore, the possibility of verifying the origin of animal products would allow, not only the assessment of product quality but also the valorization of the local products of specific breeds. The recent development of molecular biology techniques, with special regard to the direct analysis of DNA, has made diagnostic tests for genetic identification of animals simpler, more cost effective and suitable for automation. The implementation of DNA based tests for tracing animals and animal products is a tracking system that could be usefully and easily integrated with traditional animal identification systems. The latter have drawbacks mainly represented by the complex informatic system required, possible recording errors at the farm and possible frauds.

DNA, in fact, represents a permanent and indelible mark that allows different levels of identification: individual fingerprinting (polymorphic neutral markers among animals), breed identification (neutral markers of specific breeds, allelic variations in candidate genes), species identification (neutral markers such as AFLP, mitochondrial DNA, interspersed repeat sequences such as bovine SINE), higher taxa identification (e.g. MIR, Mammalian Interspersed Repeat).

Different molecular marker classes are currently used in animal genetics, genomic diagnostics and research. These span from hypervariable microsatellites to medium-throughput AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.*, 1995), to SNPs (Single Nucleotide Polymorphism; Syvänen, 2001).

Microsatellites are the most popular markers for the identification and tracing of single animals. Microsatellites are short sequences repeated in tandem, their polymorphism depends on the variation in the number of repeats. They are highly informative hypervariable markers widely used in livestock paternity testing. The application of alternative technologies, such as AFLPs and more recently SNPs, to trace the origin of animal products is still under evaluation in the animal field.

AFLPs detect polymorphism in restriction fragments. The advantage of this technology lies in its efficiency in generating large numbers of markers in any species, regardless the availability of sequencing information.

SNPs are codominant biallelic markers that detect point mutations spread throughout the genome in coding and non-coding sequences. SNPs in genes divergently selected in different breeds may, therefore, aid the discovery of breed-specific markers of particular value for traceability purposes. In addition, these markers are suited to highly automatic detection, a characteristic quite favourable to enhance accuracy and to decrease costs. SNPs have been already employed for species identification in animal products, exploiting sequence information collected in the MHC (Major Histocompatibility Complex) region of the main avian species. This research led to the identification of two clusters of nucleotides univocally identifying chicken, turkey and pheasant (Sironi *et al.*, in preparation).

The problem of tracing individual animals by molecular markers is basically solved. Any of the previously described markers can accomplish this task, and the technology of the future will be the least expensive and most reliable one. Conversely, the assessment of strategies and protocols for the fork-to-breed tracing of animal products is the present challenge. Breed assignment may in theory be based on two strategies. The *deterministic approach* aims at identifying markers having fixed breed-specific allelic variants. These markers, actively searched for in different species, would permit the setting up of diagnostic protocols that do not require the use of statistic inference. The *probabilistic approach* exploits a panel of markers having allelic variants that are neither unique nor fixed but have different frequencies in different breeds. In this case, breed assignment is possible only on a probabilistic base.

MATERIALS AND METHODS

Among candidate genes, the gene coding for growth hormone (GH) has been studied in cattle and goat. The analyses on eight cattle breeds (Holstein, Chianina, Piemontese, Marchigiana, Maremmana, Limousine and Romagnola) did not lead to the identification of specific allelic variants to this locus. By analysing 10 goat breeds raised in or autochthonous of the Alpine area (Trentina, Lariana, Orobica, Bionda, Saanen, Ciavenasca, Val Passiria, Valdostana, Alpine and Frisa) putative breed specific haplotypes were identified in three breeds of the Alps (Lariana, Orobica and Valdostana; Nardelli –Costa *et al.*, 2004). None of these haplotypes proved to be fixed within the breeds (Table 1). On the contrary, the study of the melanocortin-1 receptor (MC1R) gene led to the identification of allelic variants fixed in some cattle breeds and linked to different pigmentation patterns. The MC1R gene plays a fundamental role in the regulation of melanogenesis and it shows two principal polymorphisms, the G310 deletion (e allele) and the T296C substitution (E^d allele) responsible respectively for the pheomelanin pigmentation and black eumelanin pigmentation (Klungland *et al.*, 1995). These two alleles proved to be fixed in some breeds raised in Italy (Crepaldi *et al.*, 2003a). In fact the G310 deletion in the Italian Red Spotted and in the Limousine are fixed, whereas the T296C substitution is present in the Holstein breed. The e allele is also fixed in the Reggiana breed (Russo *et*

al., 2004). In the other breeds where the wild E⁺ allele is present (Cabannina, Chianina, Marchigiana, Grey Alpine, Piedmontese and Romagnola), together with the E¹ allele in some animals, the coat colour undergoes the action of other genes affecting coat pigmentation. In the latter above mentioned breeds the Authors found different pigmentation patterns some characterized by eumelanic brown and others by pheomelanic with eumelanic extremities (Crepaldi *et al.*, 2003b). The polymorphisms of this gene can be used to trace the products of some cattle breeds as reported by several Authors (Maudet and Taberlet 2002; Chung *et al.*, 2000; Crepaldi *et al.* 2003a,b; Russo *et al.*, 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

The “probabilistic” approach was tested using AFLP markers (Negri *et al.*, 2003). This technology produced interesting results and tested the performance of a large number of biallelic markers in the breed assignment of multilocus genotypes. Hence dominant AFLP markers also represented a stringent pilot test on the use of the codominant and more informative SNP markers.

The AFLP dataset comprised 132 AFLP markers analysed on 416 reference animals from 16 bovine breeds. Additional information on the origin of samples was also integrated in the analysis. The Bayesian approach, as implemented in the software *structure* (Pritchard *et al.*, 2000) was used for breed assignment.

Overall, 91% of animals were correctly assigned at a probability higher than 99%, 6% at a probability comprised between 90% and 98%, while 3% remained unassigned (Table 2).

After these positive results, a field trial was run testing 44 Romagnola animals genotyped with the same marker panel. No information on their origin other than that contained in their DNA profiles were provided.

The assignment test correctly assigned 36 out of 44 (82%) Romagnola at a probability higher than 99%; 4 individuals (9%) at a probability comprised between 90% and 98%, while 4 individuals remained unassigned.

In summary, AFLP performances suggest that the more informative SNP markers have the full potential to become an efficient diagnostic tool for the traceability of breed origin through a probabilistic approach, awaiting the discovery of marker variants that will permit the deterministic traceability of animal products.

CONCLUSIONS

Several projects have recently been launched both at European and local level to establish traceability systems based on molecular markers. In this session we will present the project Molecular Traceability of Animal Food Products in the Lombardy Region. This project means to develop SNP markers for paternity test, individual animal, breed and, if possible the geographical identification in cattle, sheep and goat of the Lombardy region.

The implementation of an efficient system to trace animal products by molecular analyses will provide animal products with a major value guaranteed by a “biological signature”, helping in the marker expansion. Furthermore, the availability of accurate and cost effective diagnostic tests will provide consumers and the institutions in charge of control with a further tool to guarantee the safety of animal food products. Finally, the synergy between biotechnology achievements and appreciation of traditional animal food products will most likely guarantee product traceability to the people involved in the food chain thus protecting and safeguarding the high quality livestock genetic resources.

ACKNOWLEDGMENTS

The studies here described were supported by grants from MIUR-RBNE01SFX Y; from Regione Emilia Romagna Project: "Molecular traceability of Romagnola beef breed as a tool for its valorization" and from Fondazione Cariplo-2001.2489/11.8094; N° 2003.0721/11.8094.

