

RICERCA DI ASSOCIAZIONI TRA MARCATORI MICROSATELLITI E CONTENUTO DI COLLAGENE NEL MUSCOLO LONGISSIMUS DORSI DI SOGGETTI DI RAZZA CHIANINA: RISULTATI PRELIMINARI

Ciampolini R. (1), Cecchi F. (1), Mazzanti E. (1), Ciani E. (1), Cetica V. (1), Failla S. (2),
Cianci D. (3)

(1) Dipartimento di Produzioni Animali – Università di Pisa - Viale delle Piagge, 2 - 56124
Pisa, Italia

(2) C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Zootecnia – Via Salaria, 31 – 00016 Monterotondo
Scalo, Roma, Italia

(3) Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale – Università di Bari – Via
Amendola 165/A – 70126 Bari, Italia

RIASSUNTO - Il presente lavoro costituisce un'indagine preliminare volta a verificare la possibilità di identificare associazioni tra marcatori microsatelliti del DNA e collagene muscolare. La prova è stata sviluppata sul muscolo Longissimus dorsi di 24 vitelloni di razza Chianina ed ha evidenziato che il contenuto di collagene totale è significativamente e positivamente correlato con la frazione solubile, dal quale è condizionato quindi il suo livello quantitativo. La percentuale di collagene insolubile, meno variabile, ha mostrato, invece, una interessante e significativa associazione con alleli di alcuni microsatelliti.

PAROLE CHIAVE: Microsatellite, STR, Collagene, Chianina.

INTRODUZIONE

La tessitura è uno dei fattori più importanti nel determinismo della qualità della carne così come essa viene percepita dal consumatore (Dransfield *et al.*, 1984). Il collagene, mediante la quantità di legami crociati della sua frazione termostabile (Aberle *et al.*, 1981; Light *et al.*, 1985; Bosselmann *et al.*, 1995), il diametro delle fibre e la distribuzione delle sue diverse tipologie, è uno dei fattori che influiscono su questa caratteristica della carne. Il presente lavoro ha lo scopo di evidenziare associazioni statisticamente significative tra microsatelliti e caratteristiche del collagene analizzate sul muscolo *Longissimus dorsi* di vitelloni di Chianina, una razza allevata con tecniche tradizionali che mirano ad una produzione di qualità.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 24 vitelloni di razza Chianina allevati in Toscana. Sugli animali in vivo sono stati raccolti 20 ml di sangue periferico e sono stati prelevati campioni di muscolo *Longissimus dorsi* (Ld) dopo 19 giorni dalla macellazione.

Il contenuto di collagene totale è stato determinato mediante la seguente procedura: i campioni di muscolo sono stati digeriti con acido solforico (100°C per 14 h); dopo aggiunta di p-dimetilaminobenzaldeide e di una soluzione ossidante è stata determinata spettrofotometricamente la quantità di idrossiprolina, poi convertita in contenuto di collagene mediante un fattore 8 (ISO3496, 1978; AOAC, 1975). Le quantità di collagene solubile e insolubile, espresse anche come percentuale sulla quantità di collagene totale, sono state determinate con il metodo Sørensen (1981).

Il DNA è stato estratto con il metodo di Jeanpierre (1987), 25 microsatelliti sono stati amplificati per PCR secondo Vaiman *et al.* (1994), e separati con un sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). I dati sono stati analizzati utilizzando i software dedicati GENESCAN 2.0 e GENOTYPER 2.0.

Il numero di alleli ad ogni locus è stato determinato attraverso conteggio diretto; le frequenze alleliche, l'eterozigosità attesa e osservata e il linkage disequilibrium tra coppie di loci sono stati valutati utilizzando il software ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000). Per ogni locus, i 24

soggetti sono stati suddivisi nelle due sottopopolazioni di portatori o non portatori di ciascun allele. Le due sottopopolazioni sono state poi confrontate mediante analisi della varianza (JMP, 2002) per ogni parametro del collagene. Sono state inoltre effettuate le correlazioni semplici tra i parametri.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

I valori medi del collagene e delle sue frazioni sono riportati in tabella 1. Il contenuto di collagene totale è coerente con i dati riportati sullo stesso muscolo da Koohmaraie *et al.* (1991) e da Rhee *et al.* (2004). La percentuale di collagene solubile (25,15%), mostra invece valori superiori rispetto ai dati riportati da altri sullo stesso muscolo (Koohmaraie *et al.*, 1991; Ludwig *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1999). Il contenuto di collagene totale è risultato significativamente correlato con la frazione solubile ($r = 0,79$; $P < 0,01$) e, in misura più limitata, con la percentuale di collagene insolubile ($r = -0,41$; $P < 0,05$); tra le due frazioni si evidenzia una correlazione negativa statisticamente significativa ($r = -0,91$; $P < 0,01$).

Malgrado il limitato numero di soggetti, l'analisi molecolare ha rivelato un alto livello di polimorfismo (tabella 2), con numero di alleli da 2 a 7 (valore medio 4,96) e valori di eterozigotità attesa compresa tra 0,457 (INRA013) e 0,822 (ILSTS050). Tutti i marcatori sono risultati in equilibrio di Hardy-Weinberg. Nella valutazione del linkage disequilibrium, 16 test sui 300 realizzati (5,3%) sono risultati significativi ($P < 0,05$), in accordo con il valore atteso del 5%.

L'analisi ANOVA ha evidenziato diversi microsatelliti con alleli significativamente associati con le caratteristiche del collagene (tabella 3). Per l'INRA053 e il BMS2724, infatti, i soggetti che portavano ad entrambi i loci l'allele 2 hanno presentato maggiori percentuali di collagene insolubile, rispetto a quelli che non portavano l'allele. La percentuale di collagene insolubile è anche risultata significativamente associata ($P < 0,001$) con l'allele 1 (associazione negativa) e 4 (associazione positiva) del marcatore TEXAN2. Considerando gli altri parametri, associazioni altamente significative sono state ritrovate tra il contenuto di collagene totale e l'allele 1 del BMS2724 e tra il collagene insolubile e l'allele 1 del TEXAN2. La maggior parte di questi loci interessanti è localizzata su cromosomi (BTA2, BTA4, BTA7 e BTA12) in cui sono mappati geni che codificano per il collagene di tipo I, III, IV e V.

Nessuno dei microsatelliti significativamente associati con le caratteristiche del collagene mostrava anche un'associazione significativa con altre caratteristiche del *Longissimus dorsi* che sono state investigate in un precedente lavoro (Cianci *et al.*, 2004).

CONCLUSIONI

Il presente studio, pur con le limitazioni dovute al fatto che il lavoro non ha preteso di essere risolutivo delle problematiche ma che avrà bisogno di ulteriori e ampie verifiche, ha evidenziato la presenza di alcuni marcatori microsatelliti significativamente associati con le caratteristiche del collagene, molti dei quali localizzati su cromosomi su cui mappano geni che codificano per il collagene.

La più stretta relazione tra collagene totale e frazione solubile lascia intravedere una maggiore dipendenza di questa frazione da fattori extragenetici. La parte più stabile del collagene, presumibilmente più controllata geneticamente, sembra perciò legata più alla quota insolubile, che difatti ha dimostrato una interessante presenza di associazioni con alleli di microsatelliti, molti dei quali localizzati su cromosomi su cui mappano geni che codificano per il collagene. Dal momento che la distribuzione delle diverse forme di collagene gioca un ruolo importante nel determinismo della tessitura della carne, un nostro prossimo obiettivo di lavoro è quello di estendere lo studio ad un maggior numero di soggetti, allo scopo di confermare la significatività delle associazioni trovate.

Tabella 1 – Valori medi riscontrati per ogni tipo di collagene analizzato.
 Table 1 – Mean values of collagen traits.

		Media	d.s.
		Mean	s.d.
Collagene totale (mg/g) /	Total collagen (mg/g)	3.13	0.98
Collagene insolubile (mg/g) /	Insoluble collagen (mg/g)	2.29	0.70
Collagene solubile (mg/g) /	Soluble collagen (mg/g)	0.84	0.60
Collagene solubile (%) /	Soluble collagen (%)	25.15	13.83
Collagene insolubile (%) /	Insoluble collagen (%)	74.84	13.75

Tabella 2 – Caratteristiche dei microsatelliti studiati (numero di alleli, Eterozigotità osservata e attesa).

Table 2 – Characteristics of the studied microsatellites (number of alleles, observed and expected Heterozygosity).

Cromosoma	Marcatore	Na	Et.oss	Et.att	P	d.s.
Chrom.	Marker	N _a	H _{Obs}	H _{Exp}	P-value	s.d.
1	INRA11	3	0.45833	0.47872	0.82314	0.00121
2	BM2113	7	0.79167	0.75443	0.80414	0.00115
2	BM3627	5	0.70833	0.62589	0.64417	0.00114
2	BMS1300	2	0.50000	0.49645	1.00000	0.00000
2	BMS1866	6	0.58333	0.65071	0.09648	0.00090
2	ILSTS030	3	0.50000	0.65603	0.36636	0.00141
2	ILSTS050	7	0.83333	0.82181	0.65179	0.00113
2	TEXAN2	5	0.41667	0.5461	0.26817	0.00146
4	BM1500	3	0.58333	0.56826	0.32331	0.00131
4	INRA72	6	0.66667	0.70745	0.37282	0.00131
5	ETH152	5	0.66667	0.75709	0.31956	0.00113
7	INRA53	6	0.58333	0.61082	0.28758	0.00111
9	ETH225	7	0.83333	0.73316	0.40731	0.00115
10	INRA37	6	0.70833	0.63209	0.65454	0.00159
12	BMS2724	6	0.70833	0.58688	0.25209	0.00073
12	ILSTS033	4	0.87500	0.63032	0.08116	0.00070
12	INRA5	3	0.87500	0.67465	0.16532	0.00118
12	RM113	4	0.75000	0.6055	0.55695	0.00178
16	INRA013	5	0.45833	0.45745	0.44047	0.00148
18	INRA063	4	0.62500	0.67908	0.97406	0.00056
21	ETH131	7	0.70833	0.75709	0.65324	0.00148
27	BMS2137	3	0.45833	0.55762	0.57849	0.00154
27	INRA16	7	0.66667	0.63298	0.30251	0.00086
27	INRA27	5	0.87500	0.78546	0.80511	0.00122
27	RM209	5	0.66667	0.58688	0.44914	0.00130

Tabella 3 – Associazioni significative tra marcatori microsatelliti e caratteristiche del collagene.
 Table 3 - Significant associations between microsatellite markers and meat collagen values.

Marcatori Markers	Allele Allele	Collagene - Collagen											
		Totale Total			Insolubile <i>Insoluble</i>			Solubile <i>Soluble</i>			% Insolubile <i>% Insoluble</i>		
		Allele	Altri <i>Others</i>	P	Allele	Altri <i>Others</i>	P	Allele	Altri <i>Others</i>	P	Allele	Altri <i>Others</i>	P
INRA53	Allele 2						0.50	1.18	***	82.93	66.76	***	
	Allele 4						0.50	1.01	*	83.58	70.47	**	
INRA63	Allele 2	3.92	2.93	*	2.77	2.17	*						
INRA72	Allele 2	2.54	3.29	*									
TEXAN2	Allele 1				1.86	2.60	***			66.43	80.86	***	
	Allele 4									83.89	71.12	***	
BM3627	Allele 1						1.27	0.70	*				
BM1300	Allele 1				2.00	2.58	*						
BMS2724	Allele 1	3.69	2.67	***	2.61	2.02	*						
	Allele 2	2.42	3.43	*			0.30	1.03	***	87.40	69.67	***	

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

BIBLIOGRAFIA- REFERENCES

- Aberle E. D., Reeves E. S., Judge M. D., Hunsley R. E., Perry T. W., 1981. J. Anim. Sci. 52: 757-763.
- AOAC - Official Methods of the Analysis of Association of Official Analytical Chemists, Alington (USA), 1995, 39:13-16 ed 39.1.27
- Bosselmann A., Moller C., Steinhart H., Kirchgessner M., Schwarz, J., 1995. J. Food Sci. 60:953.
- Cianci D., Ciampolini R., Cecchi F., Mazzanti E., Ciani E., Cetica V., 2004. CD LVIII Convegno Nazionale SISVET pag.257.
- Dransfield E., Barge M. T., 1984. Meat Sci. 10:1-20.
- Light N., Champion A. E., Voyle C., Bailey A. J., 1985. Meat Sci. 13:137-149.
- ISO 3496 – 1978. Lebensmittelchemiel e gerichtliche Chemie.
- Jeanpierre, M. 1987. Nucl. Ac. Res. 15: 9611.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L., 2000. Arlequin Ver 2.000: a software for population genetics data analysis.
- J.M.P. user's guide ver. 5.0. S.A.S. Institute Inc. 2002. Ed. Cary (NC), U.S.A.
- Koohmaraie M., Whipple G., Kretchmar D. H., Crouse J. D., Mersmann H. J., 1991. J. Anim. Sci. 69:617-624.
- Ludwig C. J., Claus J. R., Marriott N. G., Johnson J., Wang H., 1997. Anim. Sci. 75:2404–2410.
- Nishimura T., Hattori A., Takahashi K., 1999. J. Anim. Sci. 77:93–104.
- Rhee, M. S., Wheeler T. L., Shackelford S. D., Koohmaraie M., 2004. J Anim Sci. 82(2):534-50.
- Sørensen S.E., 1981. Relationship between collagen properties and meat tenderness in young bulls of different genotype, weight and feeding intensity. Phd. Thesis in meat science and technology. The Royal Veterinary and Agricultural University, Dept. of Meat Science and Technology, Copenhagen.
- Vaiman D., Mercier D., Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lepingale A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio S.L., Martin P., Leveziel H., Guerin G., 1994. Mamm. Genome 5 (5):288-97.

DETECTION OF DNA MICROSATELLITE MARKERS ASSOCIATED WITH COLLAGEN CONTENT OF LONGISSIMUS DORSI MUSCLE IN CHIANTINA BULLS: PRELIMINARY RESULTS

Ciampolini R. (1), Cecchi F. (1), Mazzanti E. (1), Ciani E. (1), Cetica V. (1), Failla S. (2),
Cianci D. (3)

ABSTRACT - Analysis of association between microsatellite markers and *Longissimus dorsi* collagen traits, in 24 Chianina young bulls, were carried out. Single pair correlations were considered in order to point out the relationships among collagen parameters (total collagen, soluble and insoluble collagen). Total collagen resulted to be significantly correlated with soluble fraction (positive correlation) and with insoluble percentage (negative correlation). Molecular analysis highlighted some microsatellites with alleles significantly ($P < 0.001$) linked to collagen content traits, mainly for the percentage of insoluble collagen.

KEYWORDS: Microsatellite, STR, Collagen, Chianina.

INTRODUCTION

Texture is one of the most important factors in determining the eating quality of meat from the consumer's point of view (Dransfield *et al.*, 1984). The intramuscular connective tissue plays a significant part in determining meat texture, that is greatly influenced by the quantity of heat-stable collagen crosslinks (Aberle *et al.*, 1981; Light *et al.*, 1985; Bosselmann *et al.*, 1995), the diameter of fibers and the distribution of genetic forms of collagen. The present work aims to find out statistical associations between DNA microsatellites and collagen traits in *Longissimus dorsi* muscle of Chianina, a breed reared with a high-quality traditional production system.

MATERIALS AND METHODS

A total of twentyfour Chianina young bulls raised in one farm of Tuscany were considered; 20ml of blood samples were collected and at 19 days of ageing after slaughtering the *Longissimus dorsi* muscle was excised from the hindquarters

Total amount of collagen was determined with the following procedures: meat samples were digested with sulfuric acid (100°C for 14 h); after p-dimethylaminobenzaldehyde and an oxidant solution were added, the amount of hydroxyproline was determined spectrophotometrically and then converted to collagen content with a factor of 8 (ISO3496, 1978; AOAC, 1975). The amount of heat-soluble and insoluble collagen was determined by Sørensen method (1981) and also expressed as percentage of the total amount of collagen.

DNA was purified from 20-ml samples of peripheral blood using the method described by Jeanpierre (1987), 25 microsatellites were amplified by PCR according to the methodology described by Vaiman *et al.* (1994) and separated by capillary electrophoresis using an ABI PRISM 310 automated sequencer (Applied Biosystems). Data were analysed using GENESCAN 2.0 and GENOTYPER 2.0 softwares.

We determined the number of alleles at each locus by direct counting; allele frequencies, observed and expected heterozygosity and linkage disequilibrium between all pairs of loci were evaluated using the ARLEQUIN software (Schneider *et al.*, 2000). For each locus, the total sample was subdivided into two subpopulations, depending on presence or absence of a given allele. The two subpopulations were compared using a one-way analysis of variance (JMP, 2002) for each parameter. Single pair correlations were considered in order to point out the relationships among all collagen traits.

RESULTS AND DISCUSSION

The average values of each considered trait are showed in table 1. Total collagen content was consistent with data reported on *Longissimus dorsi* by Koohmaraie *et al.* (1991) and Rhee *et al.* (2004). Concerning the soluble collagen percentage (25.15%, data not shown), discrepancies were observed with data reported by others on the same muscle (Koohmaraie *et al.*, 1991; Ludwig *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1999), where usually a lower level of soluble fraction was detected (<0.16). As it was expected, total collagen content was significantly correlated with the insoluble fraction ($r = 0.79$; $P < 0.01$), with the soluble one ($r = 0.70$; $P < 0.01$) and with the percentage of insoluble collagen ($r = -0.41$; $P < 0.05$); this last parameter was also negatively and significantly ($P < 0.01$) correlated with soluble collagen content ($r = -0.91$).

Considering the small sample size, the molecular analysis revealed a high level of marker polymorphism (table 2), with a number of alleles ranging from 2 to 7 (mean value 4.96, data not shown) and Hexp ranging from 0.457 (INRA013) to 0.822 (ILSTS050). All the markers were in Hardy–Weinberg equilibrium. We tested all possible pairs of loci for linkage disequilibrium. A total of 300 pairwise tests were carried out, and 16 of them (5.3%) showed P-values < 0.05; this proportion was compared with that expected.

The one-way ANOVA highlighted several microsatellites with alleles significantly linked to collagen traits (table 3). For the INRA053 and BMS2724 microsatellite markers, in fact, subjects carrying at both loci the allele 2 showed lower values of soluble collagen content and higher values of insoluble collagen percentage with respect to those highlighted by the subjects not carrying the allele. Insoluble collagen percentage was also significantly ($P < 0.001$) associated with allele 1 and allele 4 of TEXAN2 marker with, respectively, lower and higher values of the trait for subjects carrying the two alleles. Considering the remaining parameters, highly significant associations ($P < 0.001$) of total collagen content with allele 1 of BMS2724 and, for insoluble collagen, with allele 1 of TEXAN2 were detected. Noteworthy, some interesting microsatellite maps to chromosomes (BTA2, BTA4, BTA7 and BTA12) where some genes encoding for collagen types I, III, IV and V are located.

None of the microsatellites significantly associated with collagen traits showed also significant association with other *Longissimus dorsi* quality traits, investigated in a previous work (Cianci *et al.*, 2004).

CONCLUSIONS

The present research, though needing further verifications, highlighted some microsatellite markers significantly associated with collagen traits, most of which located on the same chromosomes as collagen genes.

The closer relation between total collagen and soluble fraction may suggest a greater dependence of this fraction on extragenetic factors. The more stable part of collagen, presumably more influenced by genetic factors, seems closely linked to the insoluble part. In fact it has shown an interesting number of associations with microsatellites alleles, much of which are located on chromosomes on which collagen genes map.

Since the distribution of genetic forms of collagen plays an important role in determining meat texture, it could be interesting to extend this kind of study to a greater number of subjects in order to confirm molecular associations.