

LA BANCA DEL DNA DELLE RAZZE BOVINE ITALIANE DA CARNE

**Filippini F. (1), Sbarra F. (1), Palazzo R. (1), Panella F. (2), Lasagna E. (2), Valentini A. (3)
Ajmone Marsan P. (4)**

- (1) ANABIC – Via Visciolosa, 06070 S. Martino in Colle, Perugia, Italia
- (2) Dipartimento di Scienze Zootecniche – Università di Perugia – Borgo XX Giugno, 74 – 06121 Perugia, Italia
- (3) Dipartimento di Produzioni Animali - Università della Tuscia – Via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo, Italia
- (4) Istituto di Zootecnica - Università Cattolica del Sacro Cuore – Via Emilia Parmense, 29100 Piacenza, Italia

Progetto finanziato dalle regioni Abruzzo, Marche e Umbria.

RIASSUNTO - La “Banca del DNA” nasce con l’obiettivo di conservare i genomi dei riproduttori ed averne la disponibilità nel tempo anche dopo la loro morte per le indagini e le analisi utili alla selezione e alla valorizzazione delle cinque razze bovine italiane da carne Chianina, Marchigiana, Romagnola Maremmana e Podolica. Il tessuto d’elezione per lo stoccaggio dei campioni è il sangue, che fornisce maggior quantità e miglior qualità del DNA rispetto ad altri tessuti presi in considerazione. Il metodo di conservazione adottato è quello basato su carte adsorbenti che consentono di mantenere indefinitamente i campioni essiccati a temperatura ambiente; questa soluzione coniuga efficienza, conservabilità e potenziabilità d’impiego (sia nello stoccaggio che nella fase operativa) con un’elevata conservabilità del campione biologico. I campioni stoccati sono e potranno essere utilizzati nei prossimi anni per gli impieghi già correntemente in uso nella filiera dei bovini da carne italiani e per nuove ricerche sui geni e sul genoma.

PAROLE CHIAVE: Banca del DNA, Genetica molecolare, Chianina, Marchigiana, Romagnola, Maremmana, Podolica.

INTRODUZIONE

I recenti sviluppi sulle conoscenze dei genomi di vari organismi, rendono possibili a breve acquisizioni di tutto rilievo sui genomi della specie bovina ed il loro impiego nella selezione e nella valorizzazione delle razze da carne. Ciò è dovuto alla vicinanza genetica delle specie - che rende possibile il trasferimento pressoché immediato di scoperte tra specie affini - nonché all’affinamento e alla scoperta di potenti mezzi di indagine a livello molecolare. Rimane ancora aperto il problema di conoscere la funzione di molti geni, della loro regolazione ed in particolare delle variazioni entro geni o regioni regolatrici che siano causa di fenotipi diversi. Quest’ultimo aspetto è di particolare importanza nella selezione genetica, che direttamente fonda la sua essenza sulla presenza di variazioni (mutazioni) a livello di DNA. Parallelamente anche la scoperta della funzione di un gene spesso passa per la scoperta di fenotipi varianti che risultano da modificazioni a livello del DNA. La “Banca del DNA” nasce da un’idea e da riflessioni maturate dall’ANABIC congiuntamente con alcune Università Italiane.

SCOPI

La banca del DNA delle razze bovine italiane da carne è l’insieme del materiale biologico e dei genomi dei principali riproduttori e degli animali di particolare interesse delle cinque razze da carne. Materiale raccolto in campo, opportunamente conservato e catalogato. I campioni di tessuto ed il DNA sono disponibili per le seguenti applicazioni: a) corretta ed univoca identificazione degli animali e dei prodotti alimentari derivati (tracciabilità); b) accertamento della razza di origine con opportune analisi molecolari; c) accertamenti di paternità e maternità per aumentare la

sicurezza dei pedigree e degli indici genetici dei riproduttori; d) stima della parentela tra individui e sui livelli di inbreeding delle popolazioni per la salvaguardia della biodiversità e la conservazione della variabilità genetica; e) integrazione e miglioramento dei piani di accoppiamento in funzione delle indicazioni sulla somiglianza genetica degli individui (complementare alle informazioni genealogiche); f) studio di geni candidati, di EST e di marcatori di geni interessati alla produzione della carne (quantità-qualitativa), anche impiegando analogie di sequenze note in altre specie (uomo, topo, maiale); g) studio delle anomalie genetiche anche sfruttando le conoscenze ottenute su altre specie (uomo, topo, maiale); h) applicazione delle informazioni ottenute dall'analisi dei geni individuati nei programmi di selezione: esclusione di individui portatori di geni indesiderati (geni letali o subletali, geni responsabili di anomalie gravi o che compromettono il valore riproduttivo o commerciale degli animali); i) scelta dei riproduttori anche in base alle informazioni genomiche che saranno disponibili); j) accelerazione del processo di selezione e di valorizzazione del prodotto.

Tutte queste applicazioni offrono strumenti concreti per aiutare gli allevatori a mantenere una competitività ed un valore aggiunto delle produzioni necessari ad affrontare le prossime ed inevitabili modifiche del mercato agricolo europeo.

REALIZZAZIONE DELLA BANCA DEL DNA

Scelta del tessuto e del metodo di conservazione dei campioni

Prima di avviare la costituzione della Banca del DNA si è ricercato il sistema che offrisse globalmente le migliori garanzie di conservazione e le maggiori possibilità di impiego nel tempo, valutando anche l'economicità complessiva del sistema.

Sono stati quindi studiati i tessuti biologici che è possibile prelevare nei bovini da carne con ragionevole semplicità, la loro possibilità di conservazione e di impiego per le successive analisi del DNA. Il tessuto ideale deve garantire: buona conservabilità del campione tal quale in attesa di essere processato; quantità di DNA elevate ottenibili da singole estrazioni, e quindi un elevato numero di analisi molecolari; buona qualità del DNA estratto, intesa come integrità della doppia elica; stabilità anche in caso di conservazione per lunghi periodi. Dei vari tessuti che in teoria è possibile campionare dai bovini vivi, tre sono quelli su cui si è indagato: *sangue intero*, *bulbi piliferi*, *porzione dell'orecchio* (cartilagine e cute). Per questi è stata verificata la possibilità di raccogliere i campioni in routine su un ampio numero di animali senza eccessive complicazioni organizzative. Sono stati anche analizzati vari metodi di prelievo e di conservazione dei campioni, al fine di soddisfare complessivamente le esigenze di: quantità e qualità del DNA ottenibile dal campione; semplicità ed economia del prelievo; sicurezza ed economia del sistema di conservazione; stabilità del campione nel tempo anche prevedendo molteplici estrazioni nel corso degli anni; semplicità ed economia della estrazione del DNA dal campione.

Inoltre tre laboratori di genetica molecolare che da tempo collaborano con ANABIC, anche sulla base di loro esperienze precedenti, hanno fornito informazioni relative a: quantità e qualità di DNA che si può estrarre e utilizzare da sangue, bulbi piliferi e porzione di orecchio; semplicità operativa legata all'utilizzo delle differenti fonti tissutali; conservabilità dei tessuti, anche in funzione della necessità di effettuare estrazioni distanziate nel tempo. Sono stati utilizzati anche i risultati di uno studio sulla quantità e la qualità di DNA che è possibile estrarre da questi tre tessuti. Lo studio è stato condotto dal Dipartimento di Scienze Zootecniche dell'Università degli Studi di Perugia e viene presentato in questo congresso (Lasagna *et al.* 2005).

Il DNA ottenibile dai *bulbi piliferi* è risultato di qualità scarsa (tendenzialmente frammentato) e in quantità modesta; è presente il rischio di contaminazione da parte di peli di altri animali. Il prelievo e la conservazione dei peli presentano indubbi vantaggi nella semplicità ed economicità consentono estrazioni ripetute nel tempo senza dover scongelare e ricongelare il tessuto.

La porzione di orecchio (prelevabile con una pinza apposita che la ingloba in una capsula di materiale plastico) presenta maggiore complessità di estrazione del DNA, in quanto bisogna effettuare una vera e propria digestione enzimatica della cartilagine e del derma per far fuoriuscire il

DNA dalle cellule. La qualità del DNA è buona, la quantità è medio-bassa anche se non sempre costante. Dopo l'estrazione il DNA va conservato in congelatore a -20°C e scongelato ogni volta che si vuole prelevarne una aliquota. La prova di conservazione della porzione di orecchio su una carta adsorbente studiata per conservare il DNA da sangue ha dato risultati non soddisfacenti, in quanto la porzione di tessuto va estratta dalla capsula e spalmata con un'altra pinza sulla carta (operazione non semplicissima). La carta mantiene il tessuto che si adsorbe, ma la quantità di cellule utili, e quindi di DNA, che si può ricavare successivamente è modesta.

Il *sangue* infine è il tessuto che fornisce i risultati di gran lunga migliori per quantità e qualità del DNA che si ottiene, anche se è quello che comporta minor semplicità e maggiori costi nella fase di prelievo (non è sufficiente "pungere" l'animale ma bisogna prelevare sangue da una vena). La sua conservazione può essere fatta in vari modi: conservandolo a 4°C per brevi periodi, congelandolo -20°C in provette di plastica (il vetro si rompe facilmente), liofilizzandolo, oppure su carta adsorbente, a temperatura ambiente. Le cartine adsorbenti sono impregnate di sostanze che lisano le membrane cellulari e le sostanze proteiche in modo da preservare il DNA da qualsiasi degradazione enzimatica, e anche da agenti batterici o virali: in tal modo ne viene garantita la conservazione nel tempo. Per questi motivi tale sistema è stato adottato da tempo anche per le banche del DNA umano anche da numerose forze dell'ordine di vari Paesi. La conservazione in congelatore (come soluzione esclusiva) espone al rischio di perdere il DNA in caso di guasti tecnici dei congelatori o di prolungate interruzioni di corrente; la liofilizzazione comporta operatività e costi di preparazione assai elevati; la conservazione su carta adsorbente consente una notevole facilità e duttilità di stoccaggio ad un costo accettabile e con grande resa in termini di numero di analisi possibili, con costi e mano d'opera estremamente contenuti. Tale sistema di conservazione inoltre permette, all'atto dell'utilizzo, di saltare la fase di estrazione e purificazione dell'acido nucleico passando direttamente a quella di amplificazione in PCR (reazione a catena della polimerasi) permettendo così un ulteriore rientro economico. Delle fonti tissutali il *sangue* ha fornito quindi i migliori risultati per quantità e qualità del DNA ottenibile, sia in termini di purezza che di integrità della molecola. Per quanto riguarda il metodo di conservazione, le carte adsorbenti sono risultate il sistema che coniuga efficienza, e potenzialità di impiego (sia nello stoccaggio che nella fase operativa) con un'elevata conservabilità del campione biologico a temperatura ambiente a costi assai bassi.

Realizzazione

A partire dal 2003 sono stati attrezzati i locali che ospitano la banca del DNA e sono state acquistate le attrezzature di base per raccogliere, catalogare, stoccare e conservare i campioni. Dal 1999 vengono prelevati campioni di sangue ai soggetti testati in prova di performance; dal 2004 tali campioni sono depositati anche presso la BANCA del DNA dell'ANABIC. I campioni saranno costituiti da sangue e verranno conservati prevalentemente su carta adsorbente, ma anche come sangue congelato o come DNA estratto.

Il progetto per la realizzazione è stato proposto alle diverse Regioni interessate, che lo hanno accolto positivamente. Ad oggi hanno già aderito e finanziato l'iniziativa Abruzzo, Marche e Umbria. Per l'Abruzzo la Banca è stata realizzata con oltre 1800 campioni di DNA prelevati e depositati. Per l'Umbria è stato avviato nel 2001 e sono in corso i prelievi e le estrazioni di DNA, per un totale previsto di circa 5000 campioni. Per le Marche si stanno avviando i prelievi (previsti oltre 6200 capi). Toscana ed Emilia Romagna hanno dato la loro disponibilità. Grazie a questa iniziativa sono e saranno disponibili per gli allevatori gli strumenti per fruire delle applicazioni di genetica molecolare che la ricerca ha messo a disposizione per i sistemi di selezione e valorizzazione delle nostre razze. I campioni stoccati sono e potranno essere utilizzati nei prossimi anni per gli impieghi già correntemente in uso nella filiera dei bovini da carne italiani e per nuove ricerche e/o diagnosi sui geni e sul genoma. Ricordiamo ad esempio l'accertamento di paternità e maternità obbligatori per l'iscrizione dei tori al Registro Tori del Libro Genealogico e il deposito di DNA necessario per le vacche madri di toro. Altra applicazione di routine è l'impiego per le verifiche di tracciabilità della carne a tutela dei consumatori e a garanzia della specificità del

carne commercializzata con il marchio IGP Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale; la garanzia che il sistema fornisce rappresenta lo strumento di supporto per la trasparenza di mercato che contraddistingue questo tipo di filiera ed è strategico alla valorizzazione e alla tutela delle produzioni di qualità. Altra analisi già implementata ed in uso corrente è quella per la tipizzazione del genotipo al locus *mh* che codifica per la miostatina. Quest'analisi consente agli allevatori di poter conoscere se i propri riproduttori sono o meno portatori del carattere dell'ipertrofia muscolare e scegliere di conseguenza se e come utilizzarli. Ancora è di recente introduzione l'analisi del gene MC1R (Crepaldi *et al.*, 2005) per il colore del mantello, che nella Romagnola ha manifestato un polimorfismo che induce negli adulti mantello con peli rossi e che comporta l'esclusione dal L.G. e ha creato problemi anche per l'iscrizione all'IGP. In base alle analisi di tale gene vengono ora scartati i candidati alla prova di performance che presentano la mutazione (e) rispetto all'allele selvatico (E). La banca del DNA costituisce la cassaforte in cui custodire il materiale genetico di queste razze anche per poter studiare le anomalie genetiche che compaiono in tutte le popolazioni e poter impostare piani per la loro eradicazione. Ciò concorrerà a rendere ancora più efficiente l'allevamento dei bovini delle razze italiane da carne, in grado di supportare azioni di valorizzazione per stabilizzare gli eccellenti livelli di prezzo raggiunti e porre le basi per nuovi auspicati aumenti di produzione e di volumi di vendita.

BIBLIOGRAFIA - REFERENCES

- Lasagna E., Sarti F.M., Sorbolini S., De Martino F., Panella F. Proceedings of the 4th World Italian Beef Cattle Congress, Italy, April 29th - May 1st, 2005
-Marilli M., Fornarelli F., Casaleggi M., Milanesi E., Filippini F., Crepaldi P. Proceedings of the 4th World Italian Beef Cattle Congress, Italy, April 29th - May 1st, 2005

DNA BANK OF THE ITALIAN BEEF CATTLE BREEDS

**Filippini F. (1), Sbarra F. (1), Palazzo R. (1), Panella F. (2),
Lasagna E. (2), Valentini A. (3), Ajmone Marsan P. (4)**

Project financed by Region of Abruzzo, Region of Marches and Region of Umbria

ABSTRACT - The DNA Bank was initiated with the objective of conserving the genomes of reproducers and to have them available, also after their death, for study and analyses useful for the selection and promotion of the five Italian beef cattle breeds (Chianina, Marchigiana, Romagnola, Maremmana and Podolica). The tissue selected for storage is blood which gives greater quantity and better quality of DNA with respect to other tissues examined. The method of conservation adopted is that based on adsorbent paper that allows the dried samples to be maintained indefinitely at room temperature. This solution combines efficiency, conservability and potential of use (both in storage and in the operating phase) with a high conservation of the sample. The stored samples are and can be utilized in the next years for the use in Italian beef cattle production and for new research on genes and the genome.

KEYWORDS: DNA Bank, Molecular genetics, Chianina, Marchigiana, Romagnola, Maremmana, Podolica.

INTRODUCTION

Recent developments about the genomes of various organisms has made possible some important finds about the genomes of the bovine species and their use in the selection and promotion of the meat breeds. This is due to the genetic similarity of the species that makes transfer possible almost as soon as similar species are discovered and to the perfection and discovery of powerful

ways of investigation at the molecular level. There is still the problem of understanding the function of many genes, of their regulation and in particular, of the variations within genes or regulating regions that could be the cause of different phenotypes. This last aspect is of particular importance in genetic selection, which is directly based on the presence of variations (mutations) at the DNA level. At the same time, the discovery of the function of a gene frequently happens through the discovery of varying phenotypes that result from modifications at the DNA level. The “DNA Bank” initiated from an idea and discussions at ANABIC together with some Italian Universities.

AIMS

The DNA Bank of the Italian beef cattle breeds is the entire biological material and the genomes of the principal reproducers and of the animals of particular interest of the five beef breeds. The material was collected in the field and stored and catalogued. The tissue samples and the DNA are available for the following uses: a) correct and specific identification of the animals and of the food products derived from them (traceability); b) verification of the breed of origin with appropriate molecular analyses; c) verification of paternity and maternity to increase the safeguarding of the pedigree and of the genetic indexes of the reproducers; d) estimation of the relationship between individuals and the levels of inbreeding of the populations to safeguard the biodiversity and the conservation of genetic variability; e) integration and improvement of the mating programs in relationship to the indications of the genetic similarity of the individuals (complement to the genealogical information); f) study of candidate genes, of EST and of gene markers interesting for meat production (quantitative- qualitative), also using sequence analogies noted in other species (man, mouse, pig); g) study of the genetic anomalies also taking advantage of the knowledge obtained in other species (man, mouse, pig); h) application of the information obtained from the analyses of genes specified in the selection programs: exclusion of individuals that are carriers of undesirable genes (lethal and sublethal genes, genes responsible for serious anomalies or that compromise the reproductive or commercial value of the animals); i) choose the reproducers also based on genomic information that is available; j) acceleration of the selection process and promotion of the product. All of these applications offer concrete instruments to help the breeders maintain a competitive edge and an added value to the product necessary to confront the future and inevitable European agricultural market changes.

ESTABLISHMENT OF THE DNA BANK

Choice of tissue and of sample storage method

Before starting the DNA Bank, the system that offers the best overall guarantee of conservation and the best use of time as well as the total economics of the system was investigated. Therefore, the biological tissues that could be sampled from the beef cattle with reasonable simplicity, the possibility of storing them and using them for successive DNA analyses were studied. The ideal tissue should guarantee: good sample conservation while it is waiting to be processed; a high quantity of DNA able to be obtained from a single extraction and therefore a high number of molecular analyses; good quality of extracted DNA, meaning integrity of the double helix; stability also in case of long term storage. Of the various tissues which in theory can be sampled from live cattle, there are three that can be studied: *whole blood*; *hair follicles*, *part of the ear* (cartilage and skin). For these, the possibility of collecting samples routinely on a large number of animals without excessive organizational complications was studied. Various methods of sampling and storing the samples were analyzed to satisfy the needs of: obtaining samples with quantity and quality of DNA; simple and economic sampling; safety and an economic system of conservation; stability of the sample over time also providing for multiple extractions during the years; simple and economic extraction of DNA from the sample. Three molecular genetic laboratories have collaborated with ANABIC for some time; on the basis of their experience, they have supplied information on: the quantity and quality of DNA that can be extracted and used from blood, hair follicles and ear; simplified procedures linked to the use of the three different tissue sources;

storage of the tissues, also regarding the need to carry out extractions over time. Results of a study on the quantity and quality of DNA that is possible to be extracted from these three tissues was used. The study was conducted by the Department of Animal Sciences of the University of Perugia and will be presented at this Conference (Lasagna *et al.*). The DNA obtained from hair follicles was of poor quality (tended to be fragmented) and modest quantity; it risks being contaminated by the skin of other animals. The sampling and conservation of skin is without doubt advantageous in terms of simplicity and economics and allows repetitive extractions to be carried out over time without needing to thaw and refreeze the tissue. Extracting DNA from *the portion of ear* (sampled with a suitable pincers and put into a plastic capsule) is more complex in that it is necessary to enzymatically digest the cartilage and skin to release the DNA from the cells. The quality of the DNA is good and the quantity is medium-low even if not constant. The DNA is then stored in a freezer at -20°C and thawed each time that an aliquot is taken. Conservation trials carried out on ear portions put on adsorbent paper, studied for blood conservation, did not give satisfactory results in that the tissue is taken from the capsule and spread with another pincers on paper (not an easy procedure). The adsorbent paper maintains the tissue, but the amount of useful cells, and therefore the DNA, that is then extracted is modest. *Blood* is the tissue that by far gives the best quantity and quality of DNA, even though it is simple, the sampling costs are greater (it is not enough to prick the animal but blood needs to be taken from a vein). It can be stored in various ways: storing it at 4°C for brief periods of time, freezing it at -20°C in plastic vials (glass breaks too easily), freeze drying it, or putting it on adsorbent paper at room temperature. The adsorbent paper is impregnated with substances that break the cell membranes and the proteic substances in such a way that the DNA is preserved from any type of enzymatic degradation as well as bacteria or viruses: in this way, conservation over time is guaranteed. For these reasons, this system has been used for some time for human DNA banks, also by numerous police forces in various countries. Storing in a freezer (as an exclusive solution) presents the risk of losing DNA in case of technical problems with the freezer or prolonged interruptions of electricity. Lyophilisation requires costly handling and preparation. Adsorbent paper allows quite easy and manageable storage at an acceptable cost and with high yield in terms of the number of possible analyses, with good man hours and costs. This system of conservation allows the steps of extraction and purification of nucleic acid to be skipped, going directly to PCR amplification (polymerase chain reaction), giving further economic savings. From the tissue sources, *blood* gave the best results for the quantity and quality of the DNA obtained, both in terms of purity and molecular integrity. Regarding the method of conservation, adsorbent paper was the most efficient and useful (for both storage and procedure) with high storage capability of the sample at room temperature at rather low costs.

Establishment

In 2003 the DNA bank sites were furnished and the base equipment to collect, store and conserve the samples was purchased. Since 1999 blood samples have been taken from subjects tested in performance trials; since 2004 these samples have also been deposited in the ANABIC DNA Bank. The blood samples are conserved primarily on adsorbent paper, but also frozen or as extracted DNA. The establishment of the project was proposed to various Regions which responded positively. To date, Abruzzo, Marche and Umbria have joined and financed the project. For the Abruzzo, the bank was established with more than 1800 DNA samples, taken and deposited. In Umbria, the project started in 2001 and the samples and DNA extractions are in progress, for a total of 5000 samples. For the Marche, samples are being taken (more than 6200 head expected). Tuscany and Emilia Romagna have said they are available. Thanks to this initiative, there are and will be the tools for the breeders to enjoy the applications of molecular genetics which research has made available for systems of selection and promotion of our breeds. The stored samples are and could be useful in the next years for use in the Italian beef breeds already currently in use and for new research and or diagnoses of genes and the genome. For example, the ascertainment of mandatory paternity and maternity for enrolling in the Sire Registry of the Herdbook and the DNA deposit necessary for the sire's mother. Other routine applications are verification of trace-

ability of the meat to protect the consumer and to guarantee the identity of the meat marketed with the IGP mark White Beef of the Central Appennines; the guarantee that the system supplies is an instrument of support for market transparency that earmarks this type of line and is strategic for the promotion and the protection of quality production. Another analysis already implemented and in current use is that for typing the genotype at the locus *mh* that codifies for myostatin. These analyses allow the producers to be able to know if their reproducers are or are not carriers of the muscular hypertrophy character and as a consequence choose if and how to use them. The analyses for the gene MC1R (Crepaldi *et al.*, 2005) is recent; it is responsible for the color of the coat for which the Romagnola has shown polymorphism which causes red coats in adults and exclusion from the Herdbook and has created problems also for IGP enrollment. Based on the analyses of this gene, candidates are removed from the performance test that have the mutation (e) with respect to the wild allele (E).

The DNA bank constitutes the safe deposit box in which the genetic material of these breeds is kept. It also enables the genetic anomalies that appear in all of the populations to be studied and to organize plans for their eradication. Hence, this will make rearing of Italian beef even more efficient, able to support promotion programs to establish excellent prices and lay the foundation for new increases of production and sales volume.

