

## INDICE GENERALE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1. La tracciabilità dei prodotti di origine animale: alcuni elementi.....	3
1.2. Elementi di genetica molecolare.....	4
1.2.1. I marcatori genetici.....	4
1.2.2. Lo stato di avanzamento nello studio del genoma degli animali di interesse zootecnico.....	6
1.3. Tracciabilità dei prodotti di origine animale e genetica molecolare.....	8
1.4. I prodotti “monorazza”.....	10
1.5. Genetica e biochimica del colore del mantello: alcuni elementi.....	16
1.6. Genetica molecolare e colore del mantello.....	19
1.6.1. Il gene MC1R nella specie bovina.....	21
1.6.2. Il gene MC1R nella specie suina.....	26
1.6.3. Il gene KIT nella specie bovina.....	26
1.6.4. Il gene KIT nella specie suina.....	27
2. PRINCIPALI RAZZE BOVINE OGGETTO DI STUDIO.....	29
2.1. Razza Frisona.....	29
2.2. Razza Bruna.....	31
2.3. Razza Pezzata Rossa Italiana.....	32
2.4. Razza Reggiana.....	33
2.5. Razza Bianca Val Padana.....	34
2.6. Razza Rendena.....	35
2.7. Razza Jersey.....	37
3. ALTRE RAZZE BOVINE OGGETTO DI STUDIO.....	39
3.1. Razza Chianina.....	39
3.2. Razza Grigio Alpina.....	40
3.3. Razza Marchigiana.....	41
3.4. Razza Piemontese.....	43
3.5. Razza Romagnola.....	44
3.6. Razza Valdostana Castana.....	45
3.7. Razza Valdostana Pezzata Nera.....	46
3.8. Razza Valdostana Pezzata Rossa.....	47
3.9. Razza Pezzata Rossa Oropa o Razzetta d’Oropa.....	48

3.10. Razza Swedish Red and White.....	49
3.11. Razza Red Danish.....	50
3.12. Razza Charolaise.....	51
3.13. Razza Salers.....	51
3.14. Razza Aberdeen Angus.....	52
3.15. Razza Hereford.....	52
4. RAZZE SUINE OGGETTO DI STUDIO.....	54
4.1. Razza Cinta Senese.....	54
4.2. Razza Large White.....	54
4.3. Razza Duroc.....	55
4.4. Razza Landrace.....	56
4.5. Razza Hampshire.....	56
4.6. Razza Pietrain.....	57
4.7. Razza Meishan.....	58
5. RAZZE CUNICOLE OGGETTO DI STUDIO.....	59
6. OBIETTIVI DELLA TESI.....	66
7. CONCLUSIONI.....	130
8. BIBLIOGRAFIA.....	132
9. RINGRAZIAMENTI.....	146

# 1. INTRODUZIONE

Uno dei punti di forza del sistema produttivo italiano è costituito dalla straordinaria gamma e varietà di prodotti agroalimentari. Tra questi, i prodotti tipici e tradizionali costituiscono un settore portante e addirittura vitale, non tanto per quanto riguarda numero di aziende e di addetti, ma soprattutto perché ciascun prodotto, sviluppatosi e affermato in rapporto a precisi ambiti territoriali e contesti sociali, economici e culturali, rappresenta di per sé un valore.

Nell'elenco nazionale previsto dal DM 350/1999 risultano inseriti al momento 1.424 prodotti tradizionali riferiti ad alimenti di origine animale (il 58% del totale), 689 dei quali derivati da carni, 585 da latte e 98 ittici. Alcuni di questi prodotti di origine animale sono prodotti “monorazza” cioè ottenuti dalle produzioni di animali appartenenti alla stessa razza e rappresentano importanti elementi per la salvaguardia e la valorizzazione di queste popolazioni animali, dei territori, a volte marginali, e delle tradizioni.

La trasparenza circa l'origine dei prodotti alimentari, ed in particolare dei prodotti animali, è ormai considerata una componente importante della qualità e della sicurezza, così come viene percepita dai consumatori. Inoltre, rappresenta un importante elemento per la competitività e la valorizzazione di questi prodotti nei mercati sia a livello locale, che a livello nazionale e internazionale oltre che per la difesa degli stessi produttori da imitazioni e contraffazioni che potrebbero danneggiare dal punto di vista economico l'intera filiera e minare la fiducia dei consumatori.

In questo quadro generale si inserisce la presente tesi che mira a sviluppare metodologie innovative di tracciabilità per i prodotti carnei e dei prodotti lattiero-caseari “monorazza” che possano essere eventualmente introdotte nei vari disciplinari di produzione a tutela degli allevatori e di tutta la filiera e che abbiano come riflesso positivo la valorizzazione di alcune razze di interesse zootecnico allevate in Italia e all'estero.

## 1.1. La tracciabilità dei prodotti di origine animale: alcuni elementi

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

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

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

La tracciabilità, oltre a fornire un sistema di controllo per l'igiene e la sicurezza degli alimenti, permette di garantire il consumatore da possibili frodi, salvaguardare categorie a rischio (come ad esempio persone che soffrono di allergie o di intolleranza a particolari alimenti o additivi) e tutelare scelte alimentari individuali per motivi religiosi o salutistici. Inoltre, la possibilità di verificare con sistemi oggettivi l'origine dei prodotti animali accresce il valore della certificazione di qualità, come ad esempio i prodotti IGP o DOP, favorendo lo sviluppo di aree ad economia marginale attraverso la valorizzazione di prodotti tipici e di nicchia e fornendo incentivi alla conservazione di razze locali mantenendo la biodiversità.

Per far fronte alla difficile situazione venutasi a creare a seguito della crisi BSE, il Parlamento Europeo ha emanato il Regolamento CE 1760/2000 riguardante il sistema d'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carne, al fine di identificare la carcassa, il quarto, i tagli di carne, il singolo animale oppure il gruppo di animali.

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

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

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

## **1.2. Elementi di genetica molecolare**

### **1.2.1. I marcatori genetici**

Le prime ricerche applicative relative ai marcatori genetici negli animali di interesse zootecnico furono effettuate con marcatori biochimici e immunologici. Ad esempio, Neimann-Sorensen e Robertson (1961) studiarono l'associazione tra gruppi sanguigni e diversi caratteri produttivi nei bovini da latte. Tuttavia, questi studi non ebbero molto successo soprattutto per il limitato numero di marcatori disponibili e per l'utilizzo di popolazioni animali senza un appropriato

disegno sperimentale.

Solo con l'utilizzazione dei marcatori a livello del DNA i limiti dei marcatori biochimici vennero superati. Lo sviluppo delle tecnologie di analisi dei marcatori a livello del DNA ha permesso un notevole progresso nel settore della genetica animale.

I primi marcatori ad essere utilizzati furono gli RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (Kan e Dozy, 1978). Subito si intuì che gli RFLP dovevano essere molto frequenti e davano la possibilità di coprire l'intero genoma animale (Botstein et al., 1980) e, quindi, potevano essere utilizzati per costruire mappe genetiche nelle specie di interesse zootecnico (Beckmann e Soller, 1983) e per identificare *loci* responsabili della variabilità genetica quantitativa (*Quantitative Trait Loci*: QTL). Gli RFLP, tuttavia, non hanno trovato larga applicazione perché il metodo di identificazione, basato sulla tecnica del Southern *blotting*, è lungo e laborioso ed inoltre perché, in genere, presentano solo due alleli. Successivamente venne identificato un altro tipo di marcatori, i minisatelliti o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Nakamura et al., 1987) che sebbene dal punto di vista dell'analisi di laboratorio hanno le stesse difficoltà degli RFLP, presentano un alto numero di alleli.

RFLP e VNTR sono stati utilizzati nelle prime fasi della costruzione delle mappe genetiche, ma attualmente sono stati sostituiti da altri marcatori, quali i microsatelliti, che possono essere facilmente analizzati utilizzando la tecnica della PCR. Lo sviluppo dei microsatelliti ha consentito un notevole progresso nel modo di analizzare il genoma. Questi marcatori sono caratterizzati da un numero variabile di ripetizioni di sequenze di 1-5 nucleotidi e sono altamente informativi grazie al loro elevato numero di alleli (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989). In genere i microsatelliti si trovano in regioni anonime del DNA, cioè in regioni che non hanno una funzione nota. L'utilizzo di sequenziatori automatici per la loro analisi e l'impiego di software per la conservazione e l'interpretazione dei dati ha contribuito a fare dei microsatelliti i marcatori più utilizzati per la costruzione delle mappe genetiche e per l'analisi di QTL.

Altri tipi di marcatori sono i RAPD e gli AFLP. I RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990; Welsh e McClelland, 1991) identificano marcatori per mezzo di corti oligonucleotidi come inneschi nella PCR. I RAPD sono marcatori dominanti, a differenza degli RFLP e dei microsatelliti che sono in genere codominanti, e non presentano un'altissima riproducibilità perché influenzati dalle condizioni di analisi. Gli AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Vos et al., 1995) combinano l'analisi di restrizione del DNA con la PCR e permettono, utilizzando diverse combinazioni di enzimi e di primer, di analizzare contemporaneamente un elevato numero di *loci*.

Altri metodi di analisi consentono di identificare in modo più efficace i polimorfismi causati

da mutazioni puntiformi, che sono quelle più diffuse nel genoma animale (una ogni 500-3000 nucleotidi). Molte sono le varianti dei metodi di analisi delle mutazioni puntiformi, le quali nel complesso, sono indicate come SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Fra questi, il metodo SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphisms*) (Orita et al., 1989) permette di identificare mutazioni puntiformi in frammenti di DNA amplificati di 100-400 nucleotidi. Più recentemente, sono stati sviluppati diversi metodi di analisi detti di *high-throughput*, che permettono un'alta efficienza e velocità nella tipizzazione di SNP. Fra questi possiamo ricordare i metodi basati sui principi di *minisequencing primer extension*, sviluppati su diversi supporti di analisi (Syvänen, 1999), quelli che si basano sui principi cromatografici quali il metodo DHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*) (Huber et al., 1993) e quelli che sfruttano le tecniche di spettrometria di massa come ad esempio MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) (Griffin e Smith, 2000). Altri metodi si basano sull'utilizzo di supporti solidi (*microarray*) su cui sono fissati oligonucleotidi ad alta densità (Chee et al., 1996), che permettono di analizzare contemporaneamente centinaia di SNP (Wang et al., 1998). Tutte queste nuove tecnologie mettono a disposizione dei genetisti la possibilità di analizzare un gran numero di marcatori quasi in tempo reale. Le applicazioni pratiche di queste tecnologie si sono avute principalmente in genetica umana, anche se recentemente alcune di queste nuove tecniche di analisi sono state utilizzate per la tipizzazione di polimorfismi in animali di interesse zootecnico.

### **1.2.2. Lo stato di avanzamento nello studio del genoma degli animali di interesse zootecnico.**

Il genoma degli animali di interesse zootecnico è costituito tipicamente da un diverso numero di paia di autosomi e da un paio di cromosomi sessuali (nel bovino il numero di cromosomi  $2n$  è uguale a 60) con un contenuto di DNA che si aggira intorno ai 3 miliardi di nucleotidi nel caso dei mammiferi e a circa 1,2 miliardi per le specie avicole. Sulla base delle ultime stime disponibili per il genoma umano (Wright et al., 2001), questo DNA anche nelle altre specie animali dovrebbe codificare per circa 65.000-75.000 geni, i quali rappresentano solo una piccola parte del DNA contenuto nel genoma (~4%). Quindi i geni sono dispersi in regioni del DNA che non hanno una funzione codificante e che apparentemente non sembrano avere alcun ruolo.

L'impiego dei marcatori del DNA e lo sviluppo delle tecnologie per la loro analisi hanno permesso di costruire mappe genetiche per tutte le principali specie di interesse zootecnico. Le prime mappe genetiche costruite utilizzando marcatori genetici sono state prodotte tra il 1992 e il

1998 nei bovini (Barendse et al., 1994; Bishop et al., 1994), nei suini (Ellegren et al., 1994; Rohrer et al., 1994; Archibald et al., 1995), negli ovini (Crawford et al., 1995), nei caprini (Vaiman et al., 1996), negli equini (Lindgren et al., 1998) e nei polli (Bumstead e Palyga, 1992; Levin et al., 1994). Mappe genetiche di seconda generazione, contenenti una maggiore densità di marcatori, sono state prodotte successivamente sulla base delle prime (Rohrer et al., 1996; Marklund et al., 1996; Barendse et al., 1997; Kappes et al., 1997; de Gotardi et al., 1998; Groenen et al., 1998; Groenen et al., 2000; Swinburne et al., 2000; Maddox et al., 2001).

Attualmente il numero di marcatori disponibili nelle diverse specie zootecniche è abbastanza elevato, e aumenta di giorno in giorno grazie all'intensa attività di ricerca in corso in tutto il mondo.

L'utilizzo della tecnica della ibridazione *in situ* e del mappaggio mediante pannelli di ibridi di cellule somatiche ha permesso di costruire le mappe citogenetiche e di integrare queste con le mappe genetiche. Le informazioni riguardanti le mappe genetiche e citogenetiche delle principali specie di interesse zootecnico sono disponibili in diverse banche dati accessibili via internet.

Lo sviluppo di strumenti di mappaggio innovativi ad alta risoluzione, quali i *radiation hybrid panel*, che accoppiano le potenzialità dei pannelli di ibridi di cellule somatiche con la maggiore risoluzione dovuta alla frammentazione del DNA causata da diverse dosi di radiazione, rappresentano l'ultima evoluzione nel campo del mappaggio. Sono già state costruite le prime *radiation hybrid map (RH map)* nel bovino (Womack et al., 1997; Rexoad et al., 2000), nel suino (Hawken et al., 1999) e nel cavallo (Kiguwa et al., 2000) che permettono una più precisa stima della distanza tra marcatori.

Grazie al mappaggio di geni a funzione nota è emerso che durante l'evoluzione alcuni gruppi di geni, anche se presenti in cromosomi diversi, hanno conservato la sintenia tra diverse specie (O'Brien et al., 1999). Vi sono infatti regioni cromosomiche in cui l'ordine dei geni ortologi è lo stesso nelle diverse specie di mammiferi; perfino tra mammiferi ed uccelli si possono identificare regioni conservate. Ciò ha permesso di sviluppare il mappaggio comparativo tra le diverse specie, che può essere utile per individuare geni in una specie sulla base dei dati di un'altra.

Un metodo alternativo di mappaggio comparativo, detto *Zoo-FISH* o *chromosome painting* (Chowdhary et al., 1998) prevede l'ibridazione di cromosomi di una specie al cariotipo di un'altra e ciò permette, anche in assenza di geni mappati, di individuare regioni cromosomiche in cui vi è conservazione di sintenia. I cromosomi umani sono stati in genere utilizzati come riferimento per ottenere informazioni sulla conservazione di sintenia nelle specie di interesse zootecnico.

La mappa genetica completa di ciascuna specie si può ottenere soltanto con il sequenziamento di tutto il genoma e l'identificazione di tutti i geni. Per quanto riguarda gli animali il sequenziamento completo del genoma è stato fino ad ora effettuato nell'uomo, nel topo, nel ratto,

nel pollo e recentemente nel bovino per il quale è disponibile in banca dati il primo tentativo di assemblaggio.

Come primo passaggio nel sequenziamento del genoma delle principali specie di interesse zootecnico, sull'esempio di quanto è stato fatto per l'uomo (Adams et al., 1995), sono state identificate o è ancora in corso l'analisi delle regioni trascritte grazie alla caratterizzazione di *expressed sequence tags* (EST). Le EST sono brevi sequenze di cDNA che rappresentano l'attività trascrizionale dei geni nei diversi tessuti.

### **1.3. Tracciabilità dei prodotti di origine animale e genetica molecolare**

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

La genetica molecolare permette di effettuare abbastanza facilmente, almeno in linea teorica, una tracciabilità individuale degli animali per mezzo di marcatori del DNA altamente polimorfi come i microsatelliti o molto diffusi nel genoma come gli SNP (*single nucleotide polymorphisms*).

I principi generali su cui si basa la tracciabilità individuale possono essere ricondotti ai principi dell'analisi di parentela. Per l'identificazione degli animali attualmente i marcatori per i quali vi sono le prime applicazioni sono i microsatelliti. Per questo tipo di analisi, una serie di microsatelliti (di solito 9-12 microsatelliti) è amplificata in multiplex utilizzando il DNA estratto dagli animali. Il numero di alleli per questi microsatelliti e il livello di eterozigosità permette di calcolare la probabilità (probabilità di uguaglianza, *probability of identity*:  $P_i$ ) che due animali (non gemelli identici) scelti a caso nella popolazione possano presentare lo stesso genotipo per tutti i marcatori microsatelliti che costituiscono un particolare set o pannello utilizzato per l'analisi. Più marcatori sono utilizzati e maggiore è l'eterozigosità di questi marcatori nella popolazione oggetto di studio, minore è la probabilità che due animali presi a caso presentino lo stesso profilo per i loci analizzati. Su questi principi si basa anche la tracciabilità della carne e dei prodotti di origine animale in generale (SanCristobal-Gaudy et al., 2000; Cunningham e Meghen, 2001; Arana et al., 2002). Utilizzando questi concetti, è possibile ritenere che, se diversi campioni biologici prelevati in momenti differenti su un gruppo di animali, ad esempio in allevamento sugli animali vivi e al supermercato dopo la sezionatura dei vari tagli, presentano lo stesso identico profilo per il pannello di marcatori microsatelliti utilizzato nelle analisi, questi campioni appartengono allo stesso animale che può così essere identificato in modo praticamente sicuro. Questa procedura, basata sull'analisi



di microsatelliti, è stata per la prima volta utilizzata commercialmente per la tracciabilità della carne bovina in Irlanda (Menghen et al., 1998) e viene comunemente proposta da alcune società che offrono servizi commerciali di tracciabilità della carne bovina basata sull'analisi del DNA.

Tuttavia, i marcatori del DNA che sono utilizzati per l'identificazione degli animali e la diagnosi di parentela sono, come già detto, principalmente i microsatelliti. Questi marcatori, sebbene presentino in generale una elevata eterozigosità e possano essere tipizzati velocizzando l'identificazione degli alleli mediante sequenziatori automatici, presentano come già accennato alcune caratteristiche che non permettono di ottenere una elevata affidabilità (a causa dell'alto tasso di mutazioni di questi marcatori) e una completa automazione dell'intero processo, con costi di analisi dell'ordine di 20-40 euro per campione. Questi costi risultano proibitivi se applicati su larga scala, come, ad esempio, in un sistema di tracciabilità che preveda l'analisi di tutti gli animali allevati e macellati in un particolare territorio o sistema.

Per questi motivi, per l'identificazione degli animali da applicare ad un sistema di tracciabilità, ci si sta orientando sull'impiego degli SNP (Heaton et al., 2002) che hanno caratteristiche che possono essere sfruttate per una completa automazione dell'analisi del DNA che punta ad ottenere, oltre che le stesse potenzialità discriminatorie dei microsatelliti, una notevole riduzione dei costi di analisi.

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

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

L'assegnazione di un soggetto ad una razza utilizzando metodi molecolari può essere effettuata essenzialmente attraverso due strategie: 1) *l'approccio probabilistico* e 2) *l'approccio deterministico*. Il primo prevede la creazione, per ciascuna razza tipizzata con marcatori altamente polimorfi, come i microsatelliti e gli AFLP, di un database con informazione sugli alleli presenti e sulla loro frequenza. L'individuo da assegnare viene analizzato con i marcatori sopra indicati e l'attribuzione viene effettuata in maniera probabilistica, partendo o dalle frequenze alleliche di ciascuna razza o dalle distanze genetiche tra le razze. L'approccio deterministico prevede la ricerca di marcatori molecolari specifici di una razza e/o di geni con specifiche varianti alleliche fissate in diverse razze. La tipizzazione di questi marcatori permetterebbe l'assegnazione di un animale direttamente ad una razza di appartenenza senza la necessità di operare alcun calcolo probabilistico.

Nel caso dei prodotti lattiero-caseari “monorazza”, dei salumi e altri prodotti carnei, ottenuti con latte e carne proveniente da diversi animali non è possibile l'utilizzo dell'approccio probabilistico nell'assegnazione o nel controllo della razza di origine del prodotto. Questo perché dall'analisi dei microsatelliti, ad esempio, si otterrebbero tracciati con molti alleli per ciascun marcatore e l'altezza dei vari picchi viene influenzata dal contenuto di cellule somatiche dei diversi soggetti e non è in relazione all'effettiva frequenza allelica dei soggetti che determinano quella particolare produzione.

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

#### **1.4. I prodotti “monorazza”**

In Italia esistono innumerevoli esempi concreti, e molti altri in fase di ottimizzazione, di prodotti tipici di una particolare razza.

Tra i maggiori esponenti di queste tipologie produttive è d'obbligo ricordare la produzione del Parmigiano Reggiano di sola Reggiana nella zona dell'Emilia Romagna delimitata dall'Enza, il Secchia, il Po e l'Appennino dove si alleva tuttora questa razza autoctona.

Così nel 1991 un gruppo di allevatori e produttori, ha deciso di riunirsi e di fondare il C.V.P.A.R.R. (Consorzio Valorizzazione Prodotti Antica Razza Reggiana) dove conferire il proprio latte da destinare alla caseificazione e di istituire un marchio di qualità riconoscibile dal consumatore. Il C.V.P.A.R.R. si propone così di valorizzare il formaggio Parmigiano Reggiano prodotto con la sola razza Reggiana, e di conseguenza favorirne l'allevamento, facendosi garante dell'approvvigionamento e della vendita, per conto dei soci, degli animali e dei loro prodotti.

Inoltre, il Consorzio si prefigge di tutelare e garantire ai consumatori l'effettivo utilizzo del latte di sola razza Reggiana, e un'alimentazione soggetta a rigide restrizioni.



**Figura 1: Marchi del Consorzio che produce Parmigiano Reggiano con latte di sole vacche di razza Reggiana.**

Accanto a questa realtà ne stanno pian piano nascendo altre, come ad esempio la linea di prodotti “*disolabruna*”, patrocinata dall’A.N.A.R.B. (Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna), la quale si è posta l’obiettivo di ottimizzare e valorizzare il legame intercorrente tra gli animali ed il latte prodotto dagli stessi, attraverso la promozione e la certificazione della tracciabilità dei prodotti ottenuti. Per la tutela e la qualificazione dei prodotti caseari a base di latte di sola Bruna, si è giunti così all’istituzione di un marchio che verrà posto sui prodotti e che sarà facilmente riconoscibile dal consumatore.

Tra i formaggi possibili oggetto di identificazione “*disolabruna*” possiamo citare il Monte Veronese, che peraltro ha già ottenuto anche il marchio DOP, e che viene prodotto nella parte settentrionale della provincia di Verona, nell’area montana della Lessinia e del Monte Baldo.

Altri prodotti possibili candidati all’ottenimento del cosiddetto marchio “monorazza” sono rappresentati dal formaggio Bagòss e dal Garda di Tremosine.

Per il Bagòss, prodotto nelle vallate del comune di Bagolino in provincia di Brescia, oltre ad essere stato istituito un marchio di garanzia a tutela della provenienza e della qualità in relazione alla razza Bruna, si è in attesa dell’acquisizione anche del marchio DOP.

Il formaggio Garda di Tremosine, invece viene prodotto sull’altopiano omonimo, nel cuore del Parco Alto Garda Bresciano e prevede una certificazione volontaria del requisito “razza bovina produttrice del latte”, riferendosi ovviamente alla razza Bruna.



**Figura 2: Marchio dei prodotti caseari “disolabruna”.**

Nelle malghe, del comune di Magasa, precisamente negli alpeggi di Cima Rest e Tombea tra il lago d’Idro e il lago di Garda, al confine con il Trentino, si produce il Tombea, un formaggio tipico realizzato con il latte crudo delle vacche di razza Bruna. Il Tombea risulta però difficilmente reperibile sul mercato, e poco conosciuto fuori regione tanto da rischiare seriamente di perdere, nei prossimi anni, questa produzione tipica.

L’azienda agricola Adelaide dei fratelli Zen, in provincia di Vicenza, produce e lavora separatamente il latte di sole vacche di razza Jersey, creando una linea di prodotti quali latte intero UHT, yogurt, crescenza, caciotta e mozzarella “monorazza”, arricchiti in CLA e omega 3 derivanti dalla razione fornita alle bovine.



**Figura 3: Marchio dei prodotti lattiero-caseari Zen di sola razza Jersey.**

Anche l’A.N.A.R.E. (Associazione Nazionale Allevatori Razza Rendena) ed i suoi allevatori si sono mobilitati nella produzione di formaggi definiti “monorazza”. Tra i prodotti che si possono trovare in commercio possiamo citare il formaggio Vascara prodotto in provincia di Trento, o una linea di prodotti aziendali che prevede la produzione di yogurt biologico derivante esclusivamente dalla razza Rendena. Il formaggio "Razza Rendena", prodotto in Val Rendena in provincia di Trento, è il prodotto di spicco legato alla razza per il quale è stato istituito un marchio di tutela e di

facile rintracciabilità da parte del consumatore.



**Figura 4: Marchio del formaggio prodotto con latte di sola razza Rendena.**

In Valle d’Aosta, nella produzione della fontina, viene utilizzato solamente il latte della razza Valdostana, sia Pezzata Rossa che Pezzata Nera nonché Castana.



**Figura 5: Marchio della fontina, prodotta con latte di sola razza Valdostana.**

Accanto a queste affermate realtà, poi ne stanno nascendo di nuove come la produzione di una linea di formaggi di sola Pezzata Rossa Italiana, tramite l’istituzione di un marchio e la gestione da parte dell’Associazione Nazionale Allevatori Razza Pezzata Rossa Italiana (S. Dal Mas, comunicazione personale, A.N.A.P.R.I.).

Il Casizolu è un altro rarissimo formaggio vaccino a pasta filata, prodotto nel Montiferru, la terra montuosa a nord di Oristano, con il latte di vacche Sardo-Modicane allevate allo stato brado sui pascoli locali.

Altro esempio è fornito dal Caciocavallo Podolico, formaggio prodotto in Basilicata con il latte delle bovine di razza Podalica, e la cui tutela è affidata all’ANFOSC, un’associazione che si prefigge l’organizzazione della filiera produttiva di questo formaggio, nonché l’allevamento della razza Podalica, oggi in declino.

Accanto alle produzioni lattiero-casearie bovine, definite “monorazza”, esiste anche un

mercato legato all'allevamento di animali destinati alla produzione e commercializzazione della carne "monorazza".

Per la tutela della razza Piemontese è nato da alcuni anni il CO.AL.VI., con il compito di valorizzare il patrimonio zootecnico di una delle più importanti razze bovine da carne allevate in Italia. A tale scopo, anche in questo caso, è stato istituito un marchio a tutela dei prodotti della razza Piemontese.



**Figura 6: Marchio del Consorzio di Tutela della Razza Piemontese.**

Anche il C.C.B.I. (Consorzio Produttori Carne Bovina Pregiata delle Razze Italiane) è nato per tutelare la produzione degli allevatori bovini delle razze pregiate italiane da carne (Chianina, Marchigiana, Romagnola, Maremmana e Podolica), e per controllarne la distribuzione attraverso macellerie convenzionate.

In questo ambito, si è successivamente creata la produzione tipica del "Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale". In particolare la carne è prodotta da bovini, maschi e femmine, di razza Chianina, Marchigiana e Romagnola di età compresa tra i 12 e i 24 mesi. Inoltre i soggetti devono essere nati in Italia, in allevamenti iscritti al Libro Genealogico Nazionale al fine di consentire la verifica della purezza della razza. La zona di produzione è rappresentata dai territori delle province di Bologna, Ravenna, Forlì, Rimini, Pesaro, Ancona, Macerata, Ascoli Piceno, Teramo, Pescara, Chieti, L'Aquila, Campobasso, Isernia, Benevento, Avellino, Frosinone, Rieti, Viterbo, Terni, Perugia, Grosseto, Siena, Arezzo, Firenze, Prato, Livorno, Pisa.

Oltre al marchio del consorzio C.C.B.I., la carne prodotta con queste razze viene marchiata con il marchio della produzione tipica del "Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale" e dal marchio IGP (Indicazione Geografica Protetta) rilasciato dalla CE.



**Figura 7: Marchio della produzione tipica del “Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale”, Marchio del consorzio C.C.B.I. e Marchio IGP.**

Per quanto riguarda la specie suina, in Italia, stanno nascendo o sono state create da poco, alcune associazioni atte a tutelare i prodotti tipici derivanti da una sola razza. In particolare va ricordato il Consorzio per la Tutela della Cinta Senese, costituito il 21 novembre 2000, tutelato dall'Associazione Senese Allevatori e dall'Amministrazione Provinciale di Siena, Assessorato all'Agricoltura. Tale consorzio, è anche il promotore della D.O.P. “Suino Cinto Toscano”.



**Figura 8: Marchio del Consorzio per la tutela della Cinta Senese.**

Accanto a questa realtà già affermata, anche in Emilia Romagna si sta assistendo alla nascita di un Consorzio con il preciso scopo di tutelare i prodotti “monorazza” ottenuti da una razza suina autoctona, ovvero la Mora Romagnola.



**Figura 9: Marchio del Consorzio per la tutela del suina di razza Mora Romagnola.**

### **1.5. Genetica e biochimica del colore del mantello: alcuni elementi**

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

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

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

L'enzima chiave in questo processo è la tirosinasi, che catalizza i primi due passaggi metabolici che partono dall'idrossilazione della tirosina a diidrossifenilalanina (DOPA) e la successiva ossidazione di questo metabolita a DOPAcinone. Le eumelanine derivano poi dai metaboliti del DOPAcromo mentre le feomelanine sono prodotte dai metaboliti del 5-S-cisteinilDOPA.



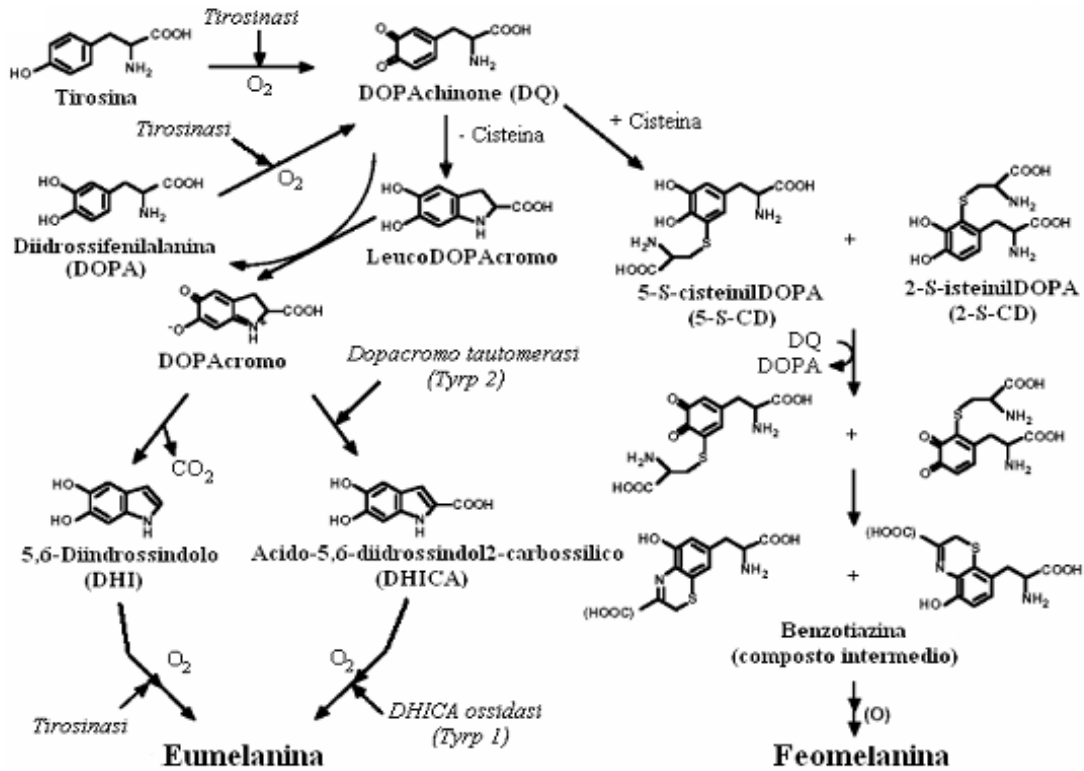
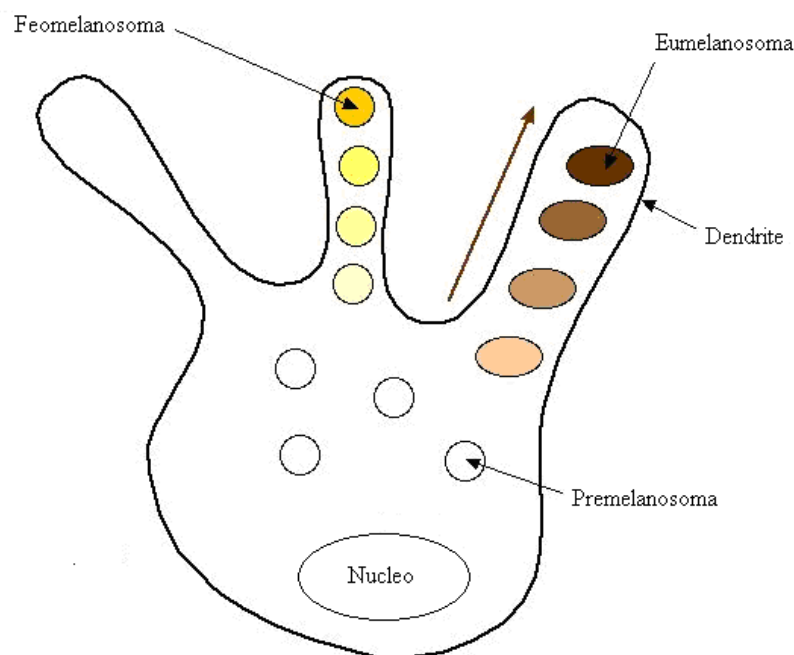


Figura 10: Chimismo della formazione della molecola di Eumelanina e Feomelanina.

Le melanine sono sintetizzate e accumulate nei melanosomi che sono particolari organelli del citoplasma di cellule specializzate, i melanociti, che risiedono fra il derma e l'epiderma.

I melanosomi trasferiti successivamente nei peli durante la loro crescita tramite un processo di esocitosi. Durante lo sviluppo embrionale i melanociti, partendo dalla cresta neurale, migrano nelle diverse parti del corpo conferendo alle aree in cui sono presenti la pigmentazione.

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



**Figura 11: Melanocita con premelanosomi e maturazione degli stessi in feomelanina e in eumelanina.**

I primi studi sulla genetica del colore del mantello, effettuati all'inizio del 1900, sono appena successivi alla riscoperta delle leggi di Mendel (Barrington e Pearson, 1906). A queste ricerche seguirono altri studi che stabilirono analogie di colorazione tra i diversi mammiferi e da allora questi schemi sono stati utilizzati per descrivere il colore del mantello nelle varie specie (Wright, 1917; Lauvergne, 1966; Searle, 1968). I principali loci, identificati mediante diversi incroci e analisi della segregazione dei vari colori sono:

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

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

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

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

Altri loci determinano l'estensione della pigmentazione e l'intensità della pigmentazione. Fra questi, il locus *W* (*White Spotting*), che secondo alcuni studi è riferibile al locus *S* (*Spotted*), agisce sull'estensione della pezzatura, il locus *Roan* (*R*) determina l'omonimo colore, il locus *Dilute* agisce diluendo la pigmentazione, il locus *Silver* determina la perdita dei melanociti follicolari con conseguente ingrignimento del mantello, il locus *Brown* determina il colore marrone, ecc. Un elenco più completo dei loci che influenzano il colore del mantello nei mammiferi si può trovare in Searle (1968).

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

## 1.6. Genetica molecolare e colore del mantello

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

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

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

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

4) Geni che influenzano la morfologia dei melanociti: ad esempio il locus *Dilute* (*D*) che

codifica per una miosina di tipo V (*MYO5A*).

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

Il locus *Extension* è stato inizialmente caratterizzato a livello molecolare nel topo. Questo locus codifica per *Melanocortin receptor 1* (*MC1R*) indicato anche come *Melanocyte stimulating hormone receptor* (Robbins et al., 1993) che è una proteina transmembrana della famiglia dei *G-protein-coupled receptors*. Oltre che nel topo, anche nell'uomo (Valverde et al., 1995), nel cavallo (Marklund et al., 1996), nella pecora (Våge et al., 1999), nel pollo (Takeuchi et al., 1997), nel suino (Kijas et al., 1998) diverse mutazioni nel gene *MC1R* sono state associate a differenti colori del mantello.

Il locus *W* (*white spotting*) è caratterizzato nel topo da mutazioni nel gene *c-kit receptor* (*KIT*; Chabot et al., 1988). Nel suino mutazioni nel gene *KIT* causano il colore del mantello bianco e cinghiato (Marklund et al., 1998). Nel bovino il locus "*Spotted*" con l'allele *white face* caratteristico della razza Hereford, è stato mappato sul cromosoma 6 dove mappa il gene *KIT* (Grosz e MacNeil, 1999). Nella stessa regione è stato mappato un QTL per l'estensione della pezzatura nelle razze Frisona e Simmental (Reinsch et al., 1999). Da questi studi si è ipotizzata quindi l'esistenza di più alleli del gene *KIT* con diverso effetto fenotipico. Tuttavia, fino ad ora non sono state identificate mutazioni del gene *KIT* che causano il fenotipo *white spotting* nel bovino. Per questo gene, in un introne, è stato identificato un polimorfismo biallelico (Olsen et al., 2000) che è stato utilizzato come marcatore in un primo studio di associazione con il colore del mantello nei bovini, evidenziando *linkage disequilibrium* tra questo locus e la pezzatura (Klungland et al., 2000).

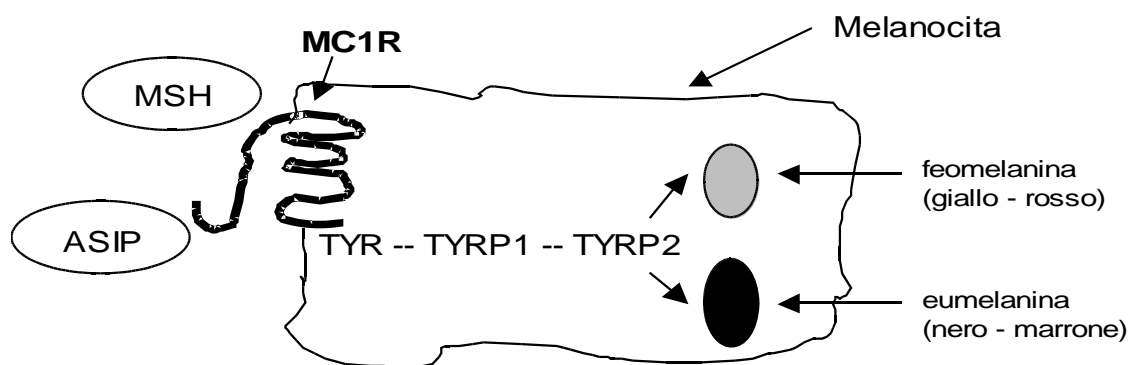
Il locus *Roan* (Roano, *R*) è stato recentemente mappato sul cromosoma 5 di bovino e lo studio di un gene candidato (*mast cell growth factor*, *MGF*) ha evidenziato una mutazione puntiforme nell'esone 7 del gene *MGF* che determina il cambio di un aminoacido (Ala\_Asp) negli animali di razza Blue Belga e Shorthorn (Seitz et al., 1999). Questa mutazione dell'aminoacido 193 probabilmente altera la struttura ad  $\alpha$ -elica del suo dominio ed è stata indicata come la causa del caratteristico colore roano in queste due razze.

Nel gene *TYRPI* (locus *Brown*) di bovino sono state identificate tre mutazioni non conservative. Una di queste (H424Y) sembrerebbe interagire con il locus *MC1R* determinando la colorazione bruna solo nella razza Dexter (Berryere et al., 2003).

Oltre ai geni sopra descritti, ve ne sono molti altri che, secondo ricerche effettuate in animali da laboratorio, influenzerebbero il colore del mantello nei mammiferi. Ad oggi, però, non sono ancora stati fatti studi di associazione tra questi geni e la colorazione del mantello nelle specie bovina, suina e cunicola.

### 1.6.1. Il gene *MC1R* nella specie bovina

Nella specie bovina il gene *MC1R* è stato mappato sul cromosoma 18. È costituito da un unico esone di circa 950 bp e codifica per una proteina di 45 kDa che appartiene alla famiglia delle *G-protein coupled receptor*. Questa proteina, che contiene sette domini transmembrana, si trova integrata nella membrana cellulare dei melanociti e si lega esternamente all'ormone MSH (*melanocyte stimulating hormone*) e al prodotto del gene *agouti* (*ASIP*), in modo da regolare la catena metabolica che porta alla formazione di eumelanina e feomelanina (Figura 10).



**Figura 12: Rappresentazione schematica delle interazioni biochimiche controllate da *MC1R* che portano alla formazione dei due tipi di melanina.**

Nella specie bovina sono stati identificati diversi alleli al locus *MC1R* (Klungland et al., 1995; Joerg et al., 1996; Rouzaud et al., 2000; Kriegesmann et al., 2001; Graphodatskaya et al., 2002; Maudet e Taberlet, 2002). Di questi, tre sono i principali: l'allele "*wild type*"  $E^+$  (che, in verità è riconducibile a più di una mutazione e quindi a vari alleli) che produce diverse colorazioni; l'allele dominante  $E^p$  (caratterizzato da una mutazione puntiforme che cambia l'aminoacido in posizione 99 della sequenza proteica, Leu>Pro) che determina il colore nero del mantello; l'allele  $e$ , caratterizzato da una delezione puntiforme che causa uno slittamento nella lettura dei codoni e quindi una proteina non funzionale e, in condizioni omozigoti determina il colore rosso del mantello. Fra gli alleli di questo locus, il cui effetto sulla colorazione del mantello non è ancora ben chiarito e, che nei primi studi sono stati assimilati all'allele "*wild type*"  $E^+$ , si possono ricordare l'allele  $E^l$ , l'allele  $E^{Dl}$  e l'allele  $e^f$ . Il primo è caratterizzato da una inserzione di 12 bp che crea una duplicazione di 4

aminoacidi (Gly, Ile, Ala, Arg) in posizione 224 della sequenza aminoacidica (Rouzaud et al., 2000; Maudet e Taberlet, 2002). L'allele  $E^{Dl}$  è determinato da una mutazione puntiforme (C>T) in posizione 667 della sequenza nucleotidica (GenBank Accession Number: U39469) che causa il cambiamento di un aminoacido (Arg>Trp) in posizione 223 della sequenza aminoacidica (Maudet e Taberlet, 2002; Graphodatskaya et al., 2002). L'allele  $e^f$ , trovato solamente in pochi soggetti di razza Simmental, è determinato da una mutazione puntiforme in posizione 890 della sequenza nucleotidica (C>T), che causa un cambiamento di un aminoacido (Thr>Ile) in posizione 297 della sequenza proteica (Graphodatskaya et al., 2002).

Le Figure 11, 12, 13 14 15 e 16 mostrano le strutture secondarie per i diversi alleli della proteina codificata dal gene *MC1R* con l'indicazione delle rispettive mutazioni.

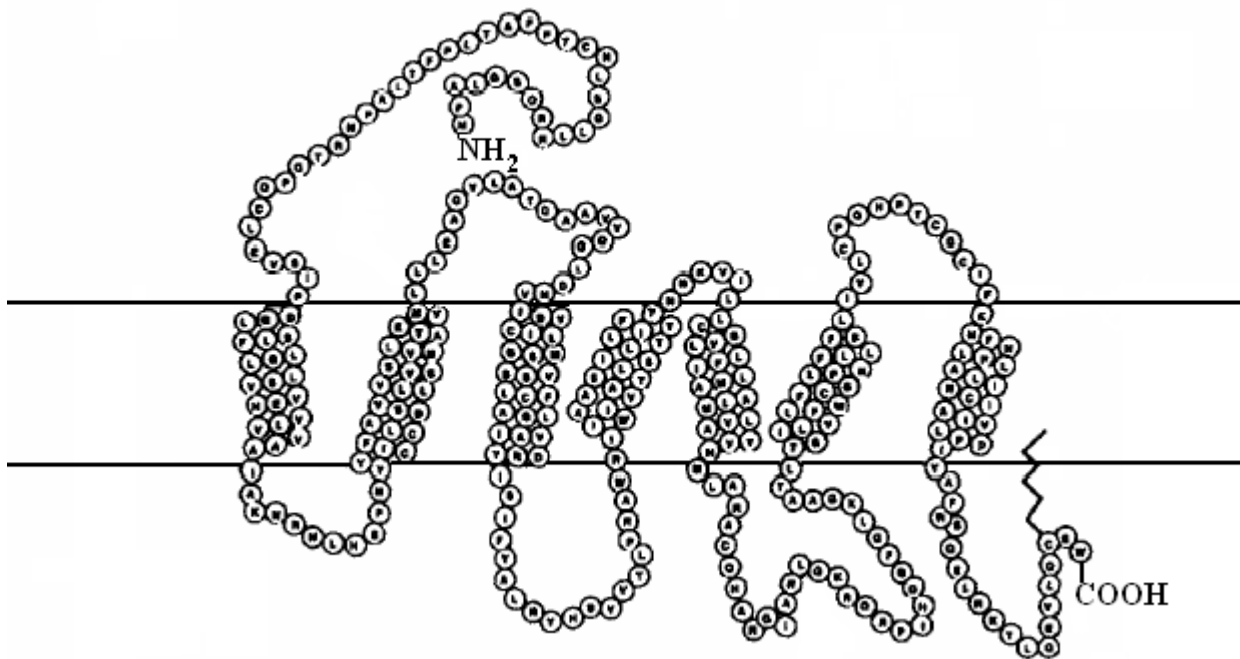


Figura 13: Rappresentazione schematica della struttura secondaria aminoacidica dell'allele  $E^+$  di *MC1R* (modificato da Rouzaud et al., 2000).

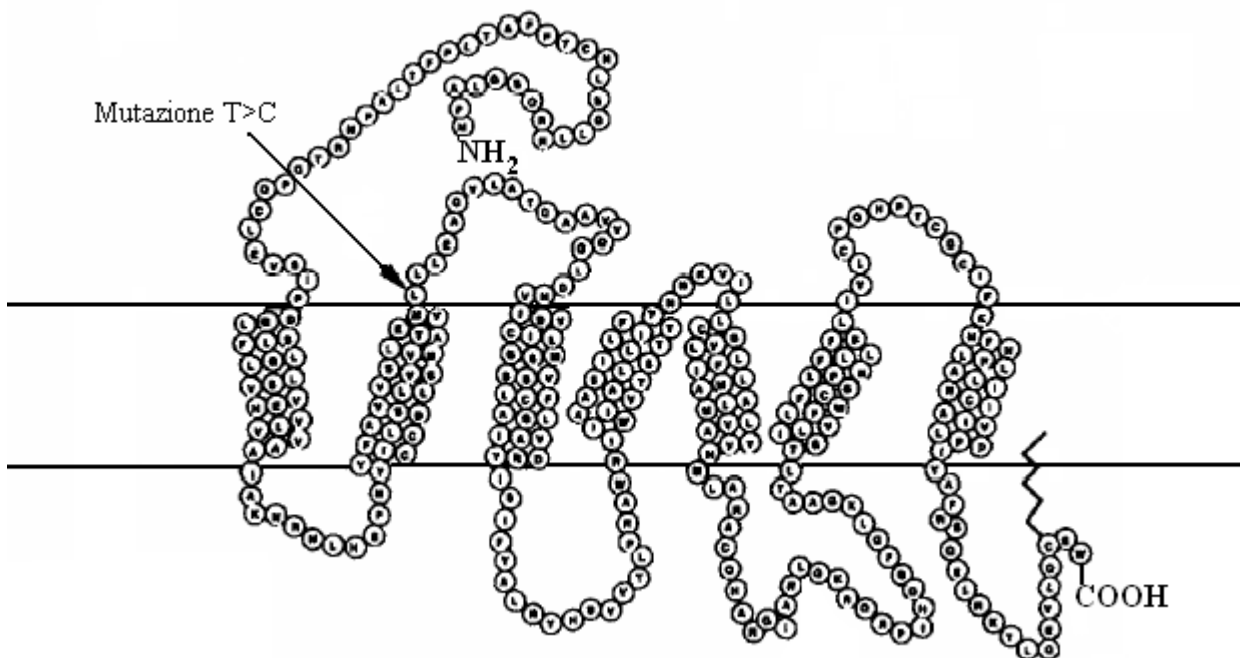


Figura 14: Rappresentazione schematica della struttura secondaria aminoacidica dell'allele  $E^p$  di *MC1R* (modificato da Rouzaud et al., 2000).

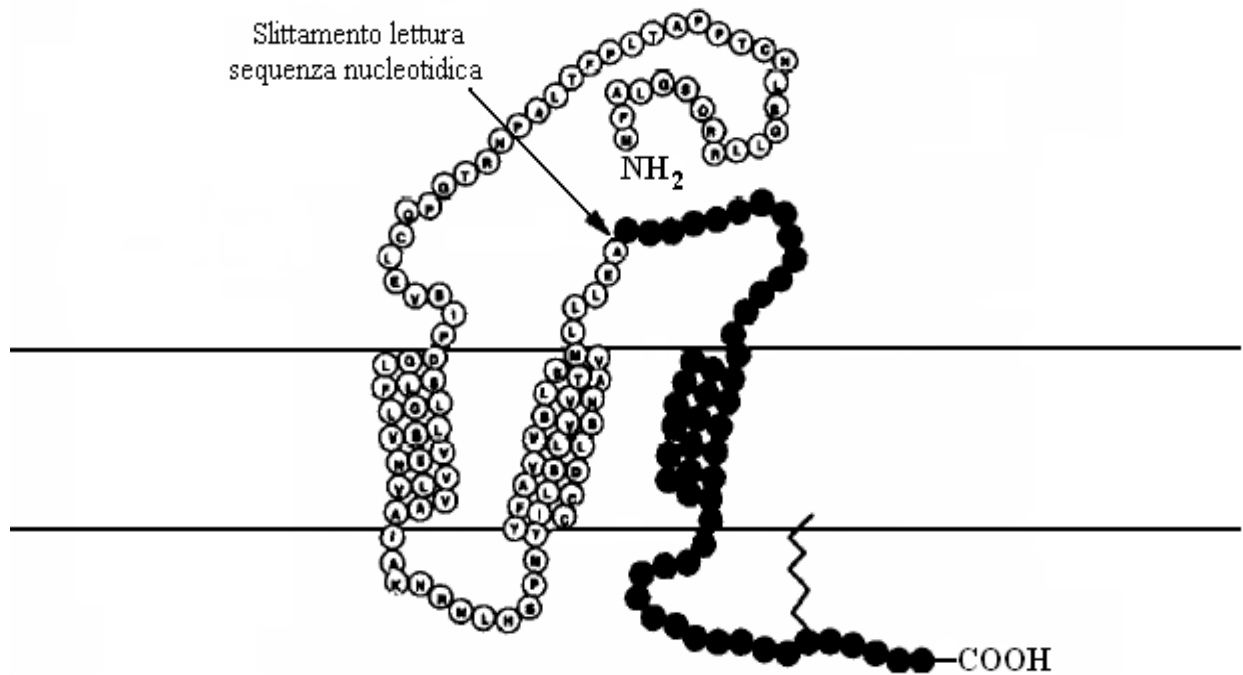


Figura 15: Rappresentazione schematica della struttura secondaria aminoacidica dell'allele *e* di *MC1R* (modificato da Rouzaud et al., 2000).

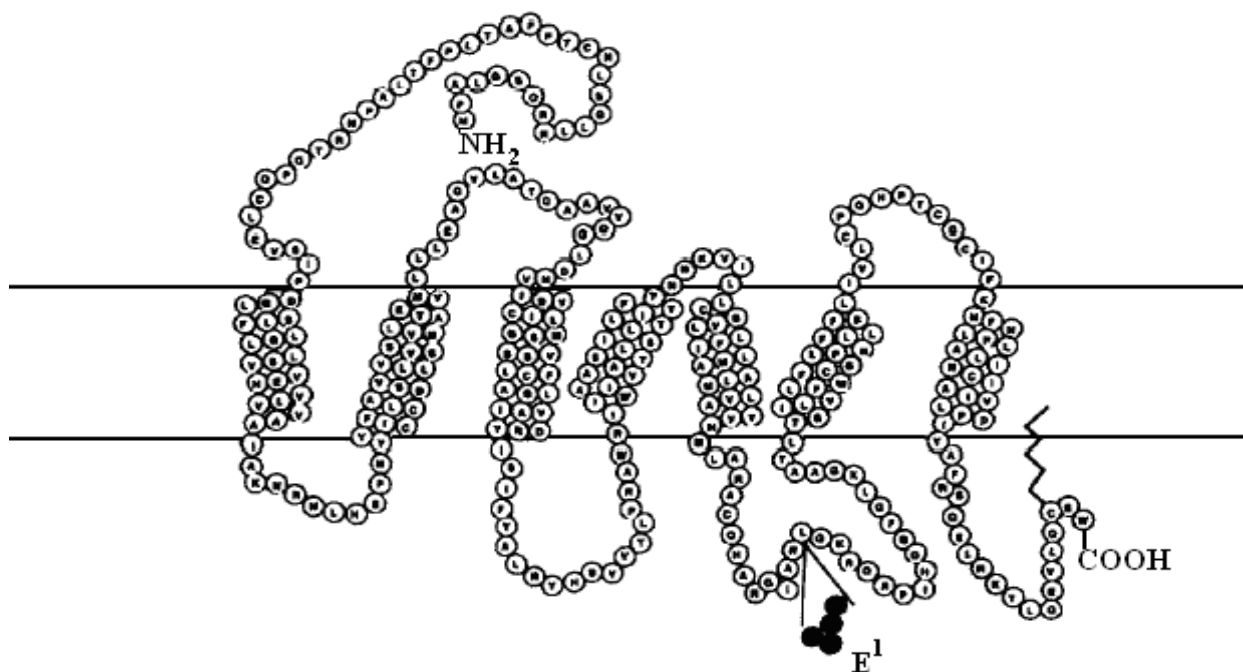


Figura 16: Rappresentazione schematica della struttura secondaria aminoacidica dell'allele *E<sup>1</sup>* o *E<sup>2</sup>* di *MC1R* (modificato da Rouzaud et al., 2000).



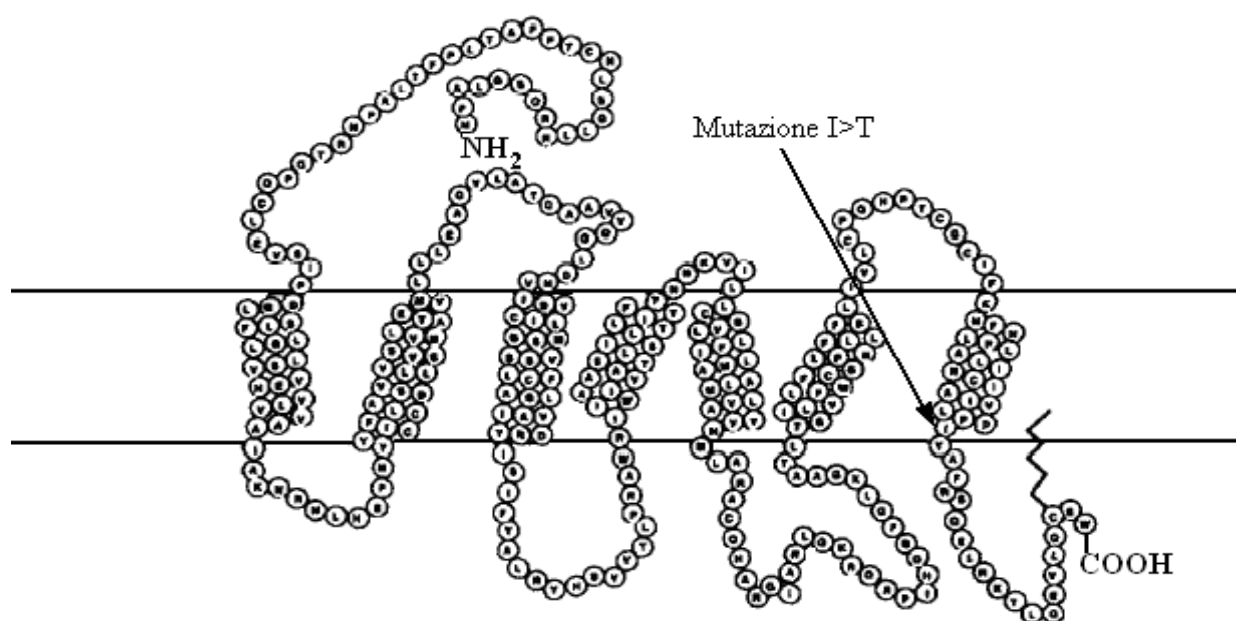


Figura 17: Rappresentazione schematica della struttura secondaria aminoacidica dell'allele *e'* di *MC1R* (modificato da Rouzaud et al., 2000).

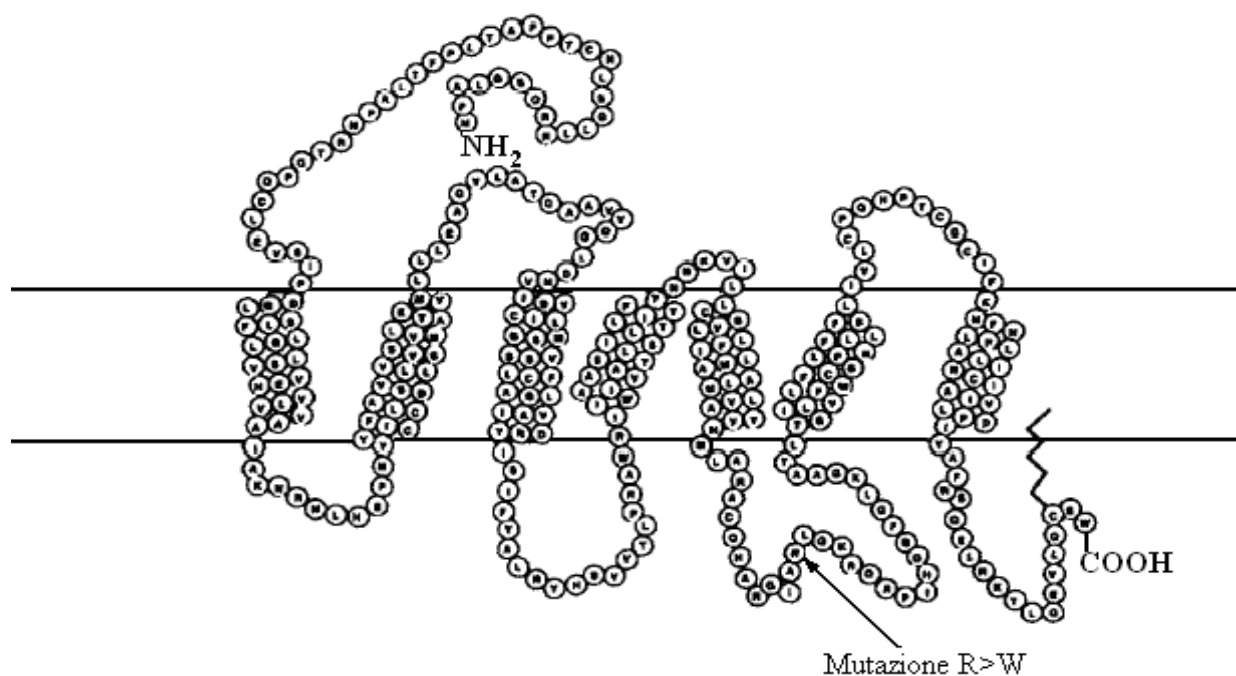


Figura 18: Rappresentazione schematica della struttura secondaria aminoacidica dell'allele *E<sup>dl</sup>* di *MC1R* (modificato da Rouzaud et al., 2000).

### 1.6.2. Il gene *MC1R* nella specie suina

Nella specie suina, il gene *MC1R* è stato mappato sul cromosoma 6. Anche in questa specie il gene è costituito da un unico esone con la parte codificante di circa 950 bp. Da studi effettuati al locus *Extension* è stato possibile identificare cinque diversi alleli quali gli alleli  $E^+$ ,  $E^D$  (nelle varianti  $E^{D1}$  ed  $E^{D2}$ ),  $E^P$  ed  $e$ . (Kijas ed al., 1998; Kijas ed al., 2001).

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

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

Il terzo allele, ovvero l'allele  $e$ , conferisce nel suino una colorazione feomelanica (rossa) del mantello. Le mutazioni presenti in questo allele sono due, entrambe modificano l'aminoacido codificato e si trovano in posizione 161 e 240 del gene *MC1R* (Ala>Val e Ala>Thr). La prima delle due mutazioni non sembra avere un effetto diretto sul fenotipo, mentre la seconda mutazione altera la struttura del sesto dominio transmembrana del gene *MC1R*, impedendone così l'attività di recettore con effetto a cascata sul colore del mantello.

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

### 1.6.3. Il gene *KIT* nella specie bovina

Nel bovino il locus "Spotted" è stato mappato sul cromosoma 6 dove mappa il gene *KIT* (Grosz and MacNeil, 1999). Nella stessa regione è stato mappato un QTL per l'estensione della pezzatura nelle razze Frisone e Simmental (Reinsch et al., 1999). Da questi studi si è ipotizzata quindi l'esistenza di più alleli del gene *KIT* con diverso effetto fenotipico. Tuttavia, fino ad ora non sono state identificate mutazioni del gene *KIT* che causano il fenotipo white spotting nel bovino. Per questo gene, in un introne, è stato identificato un polimorfismo biallelico (Olsen et al., 2000) che è

stato utilizzato come marcatore in un primo studio di associazione con il colore del mantello nei bovini, evidenziando linkage disequilibrium tra questo locus e la pezzatura (Klungland et al., 2000).

Fino ad ora, si sono potuti identificare quattro alleli differenti per questo gene attraverso incroci tra varie razze.

Il primo allele, definito anche “non-spotted” o “wild type”, viene indicato con  $S^+$ , e conferisce agli animali un mantello di tipo uniforme cioè senza pezzature o macchie di colore, come accade nelle razze Aberdeen Angus, Bruna, Reggiana, etc. Successivamente troviamo l'allele  $S^H$ , tipico della razza Hereford, che presenta la testa, la parte ventrale, le zampe e la coda, di colore bianco. Questo allele presenta una dominanza incompleta nei confronti dell'allele  $S^+$ , infatti soggetti con genotipo  $S^+/S^H$ , presentano zone bianche solamente nella zona della testa, mentre le restanti parti del corpo saranno tutte di un solo colore.

Successivamente possiamo riscontrare l'allele  $S^P$  presente nella razza Pinzgauer, Longhorn e Florida Cracker. Queste razze presentano una tipica fascia bianca che circonda longitudinalmente il corpo dell'animale dalla giogaia al garrese.

Infine troviamo l'allele recessivo  $s$  che fenotipicamente si esprime con l'alternanza di pezzature irregolari bianche alternate ad altre colorate.

#### 1.6.4. Il gene *KIT* nella specie suina

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

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

L'allele “wild type”  $i$ , è l'allele recessivo che permette una piena espressione della colorazione del mantello. L'allele  $I^P$ , determina un fenotipo con pezzature più o meno estese di colore bianco, mentre l'allele  $I^{Be}$  è il responsabile della caratteristica “cinghiatura” tipica di alcune razze. Infine sono stati identificati gli alleli definiti anche “Dominant White Alleles” responsabili della colorazione bianca uniforme del mantello nei suini, questi alleli sono stati denominati rispettivamente  $I^1$ ,  $I^2$ ,  $I^3$  ed  $I^L$  (Johansson Moller et al., 1996; Giuffra et al., 2002; Pielberg et al., 2002, 2003).

Come già detto prima l'allele  $i$  permette una piena espressione del fenotipo dell'animale ed in questo studio verrà preso in considerazione come allele di riferimento. L'allele  $i$  assieme agli alleli  $I^{Be}$  e  $I^L$ , possiede un'unica copia del gene *KIT*, contrariamente a quanto accade negli alleli  $I$

(riconducibili agli alleli  $I^1$ ,  $I^2$ ,  $I^3$ ) e all'allele  $I^P$ .

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

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

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

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

## 2. PRINCIPALI RAZZE BOVINE OGGETTO DI STUDIO

Nello svolgimento di questa ricerca sono state studiate le principali razze bovine da latte allevate in Italia e alcune razze autoctone. L'attenzione è stata rivolta principalmente a quelle più consistenti e alcune di quelle per le quali vi sono già esempi di commercializzazione di prodotti lattiero caseari "monorazza" o vi sono programmi in tal senso.

### 2.1. Razza Frisona

E' la più celebre razza originaria della Frisia e dell'Olanda settentrionale, da cui si è diffusa in tutto il mondo dando origine a differenti "ceppi" nei diversi Paesi, dove l'allevamento è stato condotto con particolari e distinti criteri selettivi e dove generalmente ha mantenuto il nome di "Frisona" nelle rispettive traduzioni linguistiche.

La storia di questa razza sembra risalire al 1200-1300, ma il suo miglioramento (così come l'orientamento verso i soggetti a mantello pezzato nero tra le varie colorazioni esistenti) ha inizio nei primi anni del 1800, quando con la realizzazione dei polders, l'Olanda, (caratterizzata da condizioni naturali favorevoli alla produzione di foraggi, per il clima influenzato dalla "corrente del golfo" con estati fresche ed inverni non rigidi, nonché da una piovosità ben distribuita e da rari venti asciutti), è nelle condizioni di poter utilizzare pascoli naturali molto rigogliosi e nutritivi, nei quali, generalmente, primeggiano le graminacee, (soprattutto *Lolium perenne*), frammiste a trifoglio bianco, (*Trifolium repens*).

La razza Frisona deve le sue particolari caratteristiche lattifere all'intensa azione selettiva iniziata nel 1874 con l'istituzione del Libro Genealogico, nonché alle cure cui gli allevatori olandesi hanno sottoposto la razza evitandone l'inquinamento con altre razze, e mantenendola in purezza secondo uno standard di razza rigoroso che prevedeva spiccate attitudini lattifere non disgiunte però da una discreta produzione di carne.

Ben presto, però, grazie alle sue eccellenti performance lattifere e alla sua ottima capacità di adattamento, la razza si è diffusa nei vari Paesi del Nord Europa, (Germania, Danimarca, Svezia, Inghilterra, Francia ed Italia), e del Nord America: U.S.A. e Canada, dove si sono costituiti così dei "ceppi" ben precisi con peculiari caratteristiche morfologiche e tipologiche.

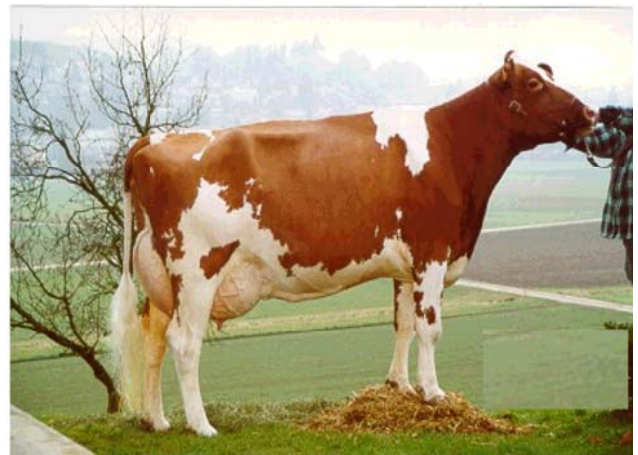
Un carattere etnico di particolare rilevanza nella razza Frisona, è costituito dal colore del mantello di questi bovini che generalmente si presenta pezzato nero con prevalenze più o meno marcate di uno dei due colori sull'altro. Nonostante ciò, va ricordato che nella razza è ravvisabile anche la variante cromatica pezzata rossa dovuta alla presenza, allo stato di omozigosi, del gene

recessivo che codifica per il colore del mantello. Indicativamente la presenza di questi soggetti è stimata attorno al 0.5-1% della popolazione.

Infine è utile ricordare che in alcuni allevamenti si assiste, sporadicamente, alla nascita di soggetti pezzati rossi, che a circa tre mesi di età mutano la colorazione delle parti rosse in nere. Questi soggetti presentano comunque, in età adulta, alcune peculiarità che rimangono rosse, come la riga mulina dorsale, che eventualmente può estendersi fino alla regione del costato, le orecchie ed il muso in generale.



**Figura 19: Toro e vacca di razza Frisona pezzata nera.**



**Figura 20: Toro e vacca di razza Frisona pezzata rossa.**



**Figura 21: Vacca di razza Frisona “tre colori”.**

## **2.2. Razza Bruna**

L'origine della razza è prettamente svizzera, e si fa risalire all'era delle palafitte avendo trovato reperti paleontologici di un piccolo bovino dalle estremità sottili e dalla testa simile a quella del cervo che si suppone essere il progenitore della razza Bruna.

I primi bovini del massiccio centrale elvetico, negli attuali cantoni dei Grigioni, di Svitto, dell'Argovia, e dell'Uri ecc., sono pervenuti dal Caucaso e dall'Asia Minore, successivamente negli anni sono andati incrociandosi con soggetti di provenienza celtico-germanica ed italiana.

È solo a partire dal 1000 che i monasteri, le corporazioni religiose e le cosiddette “Allmeinden” (corporazioni composte da tutta la popolazione di singoli paesi, dedita all'agricoltura e all'allevamento), e, soprattutto, l'Abazia di Insielden (nell'odierno cantone di Schwyz) diedero inizio alla formazione e al miglioramento dell'attuale razza.

Successivamente, considerata razza a triplice attitudine dotata di resistenza fisica, di produttività e di facile adattamento alle più svariate condizioni ambientali, la Bruna si è diffusa in tutto il mondo.

Col tempo nei vari Paesi dove è stata introdotta la razza si sono costituiti particolari “ceppi” adatti alle esigenze dell'allevamento, tra cui i più importanti sono quello canadese e quello americano (Brown Swiss) e quello italiano (Bruna Italiana).

Nel 1957 è stata fondata l'Associazione Nazionale Allevatori di Razza Bruna A.N.A.R.B., e dopo il 1981 la Razza perde il suffisso di “Alpina” rimanendo solo Razza Bruna.

Oggi questa razza è la seconda allevata in Italia, seconda solo alla Frisona, con buone produzioni di latte, ottimo per la caseificazione, grazie all'elevata presenza dell'allele B delle k-caseine che influenzano positivamente la resa del latte in formaggio.



Il colore del mantello in questi bovini è uniforme, con gradazioni che vanno dal marrone scuro o cioccolato, al sorcino. Si possono presentare, a volte, anche macchie bianche ventrali non molto estese e non debordanti dai fianchi.

Il vitello in genere nasce grigio per assumere attorno ai tre mesi di età la colorazione caratteristica dell'adulto.

I soggetti iscritti al Libro Genealogico dal 1957 al 1999 sono stati:

Anno	1957	1970	1980	1983	1990	1995	1999
Numerosità	77.928	212.705	163.669	191.861	224.595	215.234	203.001

Tabella 1: Consistenze bovini di razza Bruna Italiana.



Figura 22: Toro e vacca di razza Bruna Italiana.

### 2.3. Razza Pezzata Rossa Italiana

La razza Pezzata Rossa si è diffusa dalle Alpi Bernesi in molti Paesi europei, specialmente in quelli orientali, quali C.S.I., Polonia, Ungheria e Repubblica Ceca, nonché in numerose zone d'oltremare come Africa, Giappone, Argentina, Brasile, Cile, Perù e Stati Uniti.

In ciascuna zona di allevamento la razza poi si è distinta in ceppi aventi peculiari caratteristiche di adattamento all'ambiente, finalizzate all'ottimizzazione delle rese.

L'allevamento in Italia ha avuto inizio nel Friuli, attraverso incroci di sostituzione sulle popolazioni bovine locali, e per questo la razza è stata a lungo denominata "Pezzata Rossa Friulana", fino al 1986 anno in cui, per effetto di un decreto presidenziale (DPR n° 1134/86), la denominazione precedente venne sostituita con l'ancora attuale "Pezzata rossa Italiana".

Un tempo razza a triplice attitudine, oggi viene allevata sia per la produzione del latte che per



la produzione della carne. In particolare, in Alto Adige, nel Friuli e nel Cremonese la Pezzata Rossa Italiana trova impiego soprattutto per la produzione di latte, mentre nel Centro e nel Sud Italia, soprattutto nella zona appenninica, è utilizzata per l'allevamento della "linea vacca-vitello".

Il colore del mantello della Pezzata Rossa Italiana è ovviamente rosso con pezzature bianche più o meno estese. Alcune particolarità a sede fissa che risultano generalmente bianche, sono rappresentate dalla testa, dalla parte inferiore del ventre, dalle regioni distali degli arti, e dal fiocco della coda.

La pigmentazione del musello, della lingua e delle aperture naturali è rosa mentre le corna sono di colore giallognolo.



**Figura 23: Toro e vacca di razza Pezzata Rossa Italiana.**

## **2.4. Razza Reggiana**

Secondo alcune fonti storiche, l'origine della razza è ascrivibile all'invasione dell'Italia, nell'anno 568, da parte del popolo Longobardo.

L'orda barbarica ha contribuito in modo rilevante all'importazione, ed al successivo meticciamiento, delle razze autoctone locali con quelle depredate nelle grandi pianure della Russia meridionale e della Pannonia e scortate in Italia.

La zona di allevamento della razza Reggiana si può ascrivere ai territori siti in destra Po, in particolare nelle province di Reggio Emilia e Parma. Questi bovini morfologicamente sono caratterizzati dal mantello di colore rosso fromentino (dal colore della cariossido di frumento) più o meno intenso, attenuato nelle parti interne ed inferiori degli arti, sul contorno degli occhi e attorno al musello. Le mucose e le aperture naturali risultano rosa.

La Reggiana si è trasformata nel tempo da razza a triplice attitudine, con spiccata

predisposizione al lavoro, in una bovina con prevalente attitudine lattifera. In particolare il latte prodotto da questi animali denota elevati parametri qualitativi, con il 3,53% di grasso ed il 3,40% di proteine, nonché il 54,8% dei soggetti omozigoti per la k-caseina B, quindi molto adatto alla caseificazione e alla trasformazione in formaggio Parmigiano Reggiano.

Per quanto riguarda la consistenza anche questa razza ha subito drastiche riduzioni della popolazione. Fino agli anni '50 la razza era notevolmente diffusa nelle province di Parma, Reggio Emilia e Modena, rappresentando il 45,3% di tutti i bovini allevati in provincia di Reggio Emilia, il 30% in quella di Parma e il 35 % nel piacentino. Nel 1954 raggiunse una consistenza di 139.695 capi. Il 1960 segnò il declino della razza, passando da 60.000 a poco più di 3.000 capi in un decennio, il minimo storico venne raggiunto nel 1981 con 985 capi.

Al giorno d'oggi si sta assistendo ad un lento e progressivo recupero della razza Reggiana che nell'anno 2003 ha stimato 1.138 capi allevati, e questo fenomeno è ascrivibile allo svilupparsi di produzioni tipiche quali il Parmigiano Reggiano di sole vacche rosse.

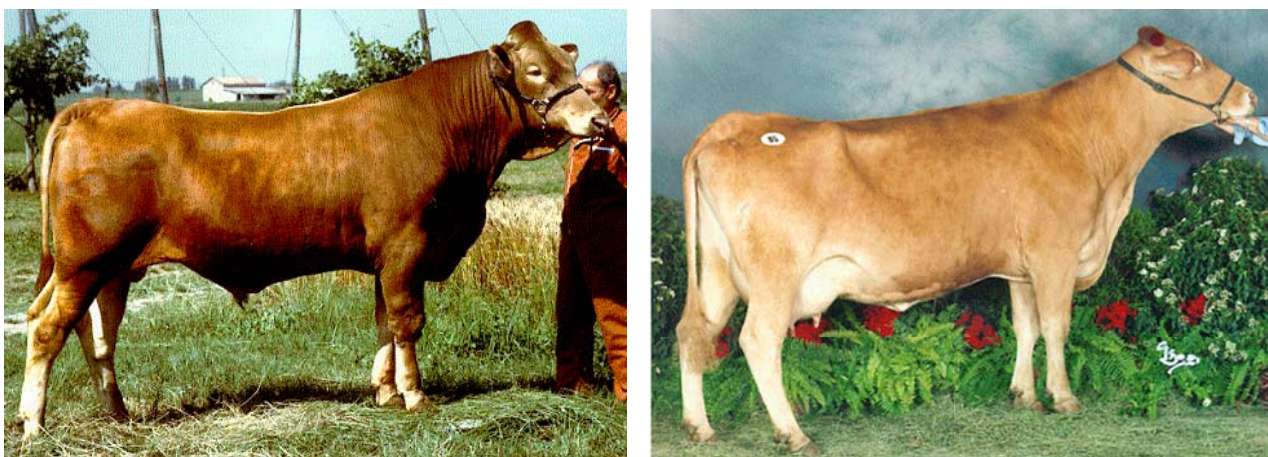


Figura 24: Toro e vacca di razza Reggiana.

## 2.5. Razza Bianca Val Padana

La Bianca Val Padana, prima ancora denominata Carpigiana e/o Modenese, era originariamente una razza a triplice attitudine diffusa principalmente nella zona di Carpi (Reggio Emilia), e della quale le prime notizie sono documentate verso la metà del 1800.

Nei primi anni del secolo i Consorzi Zootecnici Comunali avevano iscritto e controllavano circa 52.000 bovini di razza Bianca Val Padana, ma è nel periodo compreso tra il 1927 e il 1940 che si ha la massima espansione della razza, seguita da un'espansione anche geografica, nelle province limitrofe quali la zona di Correggio e d'Oltrepò Mantovano. Dopo la Seconda Guerra Mondiale,

però, ha inizio il graduale declino della razza Bianca Val Padana, in quanto gli allevatori si orientano verso razze con una più spiccata attitudine lattifera, quali la razza Bruna prima, e la razza Frisona successivamente.

La consistenza della razza è così andata riducendosi negli anni, in particolare nel 1983 si contavano 1.416 soggetti, per poi passare a 418 vacche controllate nel 2000, a 358 del 2002 e solamente a 261 nel 2003.

Il mantello di questa razza è di colore bianco nelle vacche mentre nei tori può assumere gradazioni di grigio nelle regioni del collo, delle spalle, dell'avambraccio e delle cosce. Peculiarità della razza è il caratteristico musello a "V" o "spaccato". I vitelli di questa razza alla nascita presentano già la colorazione del mantello tipica dei soggetti adulti.

Oggi la Bianca Val Padana è ormai da considerarsi razza da latte, il quale risulta particolarmente idoneo e specifico per la trasformazione in formaggio.



**Figura 25: Toro e vacca di razza Bianca Val Padana.**

## **2.6. Razza Rendena**

Le origini della razza Rendena sono antichissime e risalgono all'inizio del 1700; esse vanno correlate principalmente alla popolazione delle Giudicarie e della Val Rendena, localizzate nella provincia di Trento. Sono momenti storici, quelli risalenti agli inizi del 1700, in cui si è assistito ad una epidemia di peste bovina, presumibilmente originaria da Paesi dell'est europeo, che hanno provocato la quasi totale scomparsa della popolazione bovina che era presente in quelle aree geografiche di montagna.

A causa di tale epidemia, nel 1712 documenti storici testimoniano della prima significativa importazione di bovini in Val Rendena: tale bestiame venne acquistato in prevalenza in alcune



vallate della Svizzera.

Si creò così la razza Rendena che già all' inizio del secolo era considerata, nelle Prealpi Lombarde e Venete una razza da latte per eccellenza; di fronte alla presenza di tante altre razze bovine, la Rendena ha attraversato nel corso della storia (precisamente dalla fine del 1700 agli anni 1970) un lungo periodo non troppo favorevole, che però ha avuto una svolta alla fine degli anni' 70.

I soggetti di questa razza presentano un mantello di colore castano scuro, quasi nero nei maschi, con ciuffo, nella regione frontale, e linea dorso lombare di colore rossiccio, mentre il pelo all'interno dei padiglioni auricolari risulta bianco avorio.

I vitelli della razza Rendena, alla nascita, si presentano di colore crema, destinati ad assumere gradualmente la colorazione tipica degli adulti all'età di tre mesi.

Dal 1977, per l' iniziativa delle Associazioni Provinciali degli allevatori di Padova, Vicenza e Trento, i contatti, prima limitati quasi alla sola commercializzazione, cominciarono ad estendersi anche ai programmi di miglioramento genetico e nell' anno successivo vennero finalmente istituite le selezioni del Libro Genealogico e vennero iniziati i controlli funzionali, anche a Padova e Vicenza.

Le due province si collegarono quindi con il centro meccanografico della Associazione Italiana Allevatori avente sede a Roma. Tutte le norme ed i regolamenti da allora hanno fatto capo al Libro Genealogico di Trento, che non aveva mai cessato di funzionare e che è nel frattempo diventato "Libro Genealogico Nazionale". Nel 1979 le sezioni di razza delle Associazioni Allevatori delle tre province conclusero la stesura del nuovo regolamento del Libro Genealogico Nazionale della razza Rendena e nel 1981 si istituì l'Associazione Nazionale degli Allevatori della Razza Rendena.



**Figura 26: Toro e vacca di razza Rendena.**



**Figura 27: Vitello di razza Rendena. Si noti la colorazione chiara del mantello, che assumerà tonalità più scure con il raggiungimento dell'età adulta dell'animale.**

## **2.7. Razza Jersey**

La razza Jersey prende il suo nome dall'isola omonima, che si trova nel canale della Manica, a poca distanza dalle coste francesi della Normandia. Anticamente questa zona era una penisola, perciò si suppone che l'origine di questa razza derivi da un insediamento neolitico di bovini, successivamente incrociato con animali delle province di Bretagna e Normandia, prima del 1.100.

Le condizioni dell'isola, con suolo roccioso, clima mite e ventoso e i numerosi pascoli, hanno evidentemente contribuito allo sviluppo del tipo morfologico attuale di mole ridotta, ciò coadiuvato ad una forte consanguineità tra gli animali. I tori di razza Jersey, infatti, presentano un'altezza al garrese di 120cm per 550Kg peso mentre, le femmine, misurano 110cm d'altezza e pesano all'incirca 400kg. Questi animali presentano una esasperata attitudine lattifera, con produzioni medie di 50q di latte per anno, con un titolo in proteina del 4.03%, ed un tenore in grasso pari al 5.67%. Il mantello, nella razza Jersey, è generalmente di colore fromentino, con variazioni dal quasi giallo al bruno, al rosso e a volte può presentare delle macchie più o meno estese di colore bianco.



**Figura 28: Toro e vacca di razza Jersey.**

### 3. ALTRE RAZZE BOVINE OGGETTO DI STUDIO

#### 3.1. Razza Chianina

Di origine umbro-etrusca, i bovini di razza Chianina sono allevati da almeno 2200 anni nella media valle del Tevere e nella Valdichiana, da dove si sono successivamente diffusi anche nelle limitrofe province toscane di Arezzo, Firenze, Livorno, Pisa, Siena, e Perugia.

Considerata a duplice attitudine (lavoro e carne), è divenuta oggi soprattutto da carne ed il processo selettivo è orientato verso la precocità e il maggior rendimento dei tagli più pregiati.

L'interesse per questa razza toscana è cresciuto anche, e soprattutto, all'estero dove si sono costituite numerose associazioni di allevatori (Sud America, Argentina, USA, Canada, Australia, ecc.) per l'importazione di riproduttori e di seme congelato, per la creazione di nuovi "ceppi", e per la produzione di "incroci" su razze bovine e zebuine locali.

I caratteri etnici principali sono il gigantismo somatico, è infatti, la razza bovina più grande conosciuta al mondo, e il mantello bianco porcellana con cute colore ardesia e completa pigmentazione del musello, della lingua, del palato e delle aperture naturali che conferisce a questi animali notevole tolleranza alle temperature elevate ed alla forte insolazione.

Essendo una razza derivante dal ceppo podolico, alla nascita i vitelli si presentano di colore fromentino e cominciano a cambiare colore intorno ai tre mesi di età. La testa è leggera ed elegante con corna brevi, il tronco lungo e cilindrico con dorso e lombi larghi, la groppa ampia ed orizzontale, la coscia e la natica lunghe e spesse con profilo posteriore ben convesso, gli arti più lunghi che nelle altre razze da carne ma con appiombi perfetti.

Per quanto concerne la consistenza della razza Chianina, secondo il Libro Genealogico si ha:

<i>Anno</i>	<i>1983</i>	<i>1997</i>	<i>1998</i>	<i>1999</i>	<i>2000</i>	<i>2001</i>	<i>2002</i>
<i>Numerosità</i>	22.744	29.539	30.809	29.340	28.455	30.411	32.296

**Tabella 2: Consistenze bovini di razza Chianina.**

Questa razza insieme alla Podolica, alla Maremmana, alla Marchigiana e alla Romagnola è tutelata dal marchio "5R", marchio di qualità gestito dal Consorzio produttori di Carne Bovina pregiata delle razze italiane (C.C.B.I.), di cui al Decreto del Ministero dell'Agricoltura e Foreste del 5.07.84. Il Consorzio ha istituito, per la tutela di tre razze presenti nell'Italia centrale, la Chianina, la Marchigiana e la Romagnola, il disciplinare di produzione dell' Indicazione Geografica

Protetta "Vitellone bianco dell' Appennino centrale", ai sensi del regolamento Comunitario 2081/92.

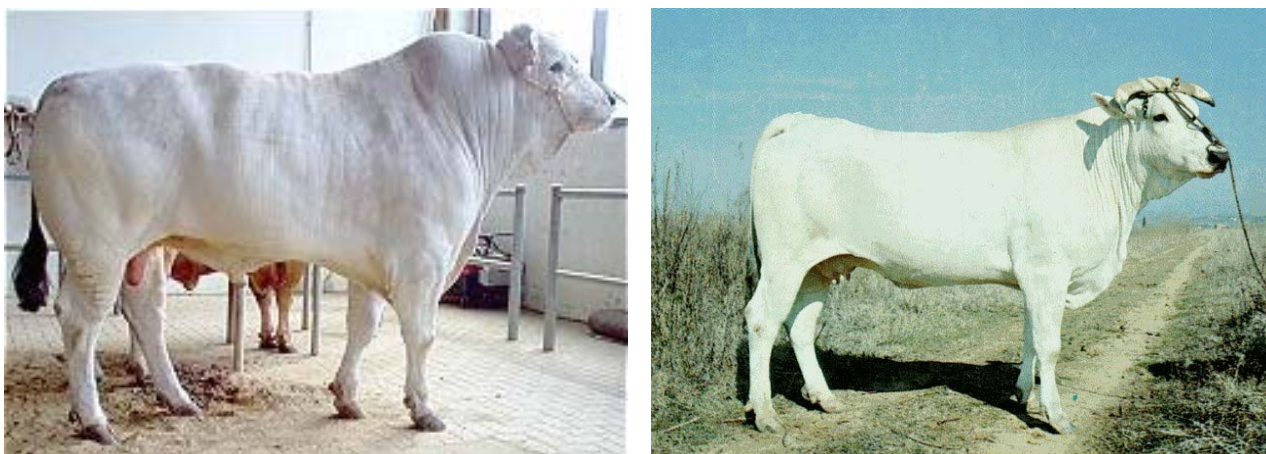


Figura 29: Toro e vacca di razza Chianina.

### 3.2. Razza Grigio Alpina

Appartenente al gruppo delle "grigie" dell'arco alpino, si è modificata in rapporto alle condizioni ambientali e di allevamento, nonché per gli incroci avvenuti con le varie razze di transito dal Brennero. La zona di maggior diffusione è la parte centrale dell'Arco Alpino, in particolare l'Alto Adige, alcune vallate della provincia di Trento, e anche nelle zone montane difficili di Vicenza, Treviso e Belluno, dove questa razza è allevata in purezza.

Nel 1985 è stata fondata L'Associazione Nazionale Allevatori Bovini Razza Grigio Alpina A.N.A.G.A. È una delle 11 razze che aderiscono alla Federazione Europea delle razze del Sistema Alpino (Abondance-Francia; Grigio Alpina-Italia; Herens-Svizzera; Hinterwälder-Germania; Pinzgauer-Austria; Rendena-Italia; Tarentaise-Francia; Tiroler Grauvieh-Austria; Valdostana-Italia; Vordelwälder-Germania; Vosgienne-Francia).

Il colore tipico del mantello di questi bovini è chiaro, argento, con sfumature più scure intorno agli occhi, sul collo, sulla spalla e sui fianchi, mentre i tori presentano colorazioni più scure a causa di un marcato dimorfismo sessuale. Le mucose e le aperture naturali sono nere così come il musello, circondato da un caratteristico alone bianco, mentre le corna si presentano chiare alla base e vanno inscurendosi fino a diventare nere verso le estremità distali.

Sono animali armonici, di taglia e statura medio-piccola, razza a duplice attitudine, con una leggera prevalenza nella produzione di latte pur fornendo discrete rese alla macellazione. I bovini di razza Grigio Alpina si adattano alle condizioni più difficili di pascolamento e, in confronto al peso e alle condizioni di allevamento non spinto cui vengono sottoposte, la produzione quali-quantitativa



di latte è ottima.

Grazie alle buone peculiarità produttive ed alle caratteristiche morfo-funzionali (rusticità, facilità al parto, longevità, buona mungibilità), la Grigio Alpina contribuisce efficacemente alla redditività degli allevamenti dimontagna.

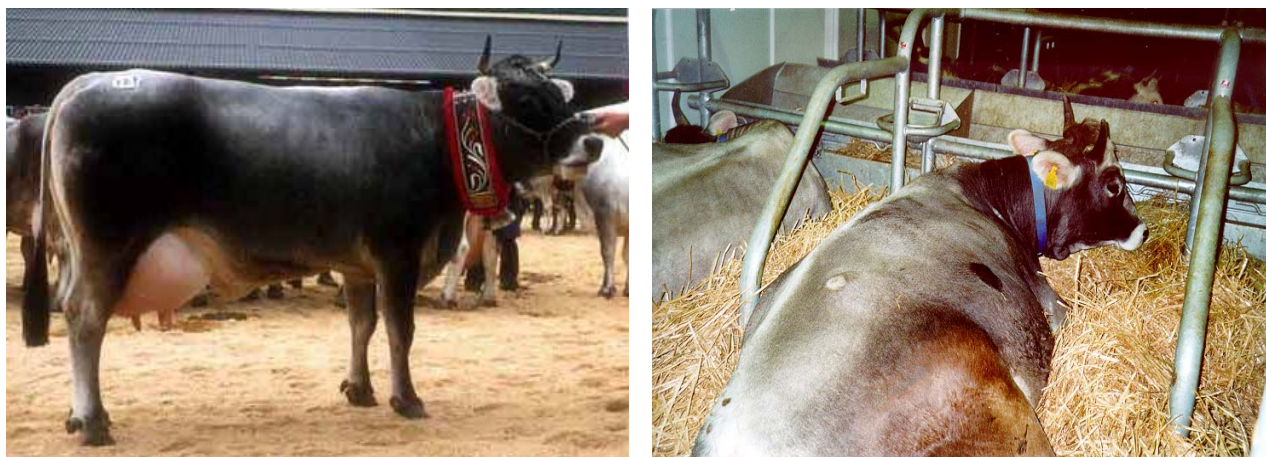


Figura 30: Vacche di razza Grigio Alpina.

### 3.3. Razza Marchigiana

Il progenitore della razza Marchigiana fù il “bovino dalle grandi corna” (di ceppo podolico) giunto in Italia, e più precisamente nella parte centro-meridionale della penisola, attorno al VI secolo d.c.

Nella seconda metà del XIX secolo, poi, gli allevatori marchigiani fecero coprire le loro vacche con tori Chianini per ottenere, oltre ad un'attitudine al lavoro, anche buone rese in carne, e come risultato si ottenne, oltre ad un netto miglioramento dello sviluppo muscolare, anche un mantello più chiaro, corna più corte e testa più leggera.

In questi soggetti l'attitudine alla produzione della carne era notevolmente migliorata, tuttavia la statura elevata rendeva inadatti i buoi al lavoro sulle zone collinari e sub-montane delle Marche.

Intorno ai primi del XX secolo si decise di effettuare un ulteriore incrocio con la razza Romagnola, mirato a ridurre la statura e la conformazione della razza.

A questo punto, però, non ci si trovava più davanti ad una razza bovina ma ad un vero e proprio meticciamiento di più razze, tanto che nel 1932 fu interrotta qualsiasi forma di incrocio, decidendo di procedere al miglioramento della razza mediante un'accurata selezione e l'istituzione del Libro Genealogico della razza Marchigiana.

Oggi questi bovini vengono allevati prevalentemente per la produzione da carne e rientrano

anch'essi nel consorzio delle "5R" che mira alla tutela delle razze autoctone carne, quali Chianina, Romagnola, Maremmana, Podalica e la razza Marchigiana appunto.

Il colore del mantello nei bovini di razza Marchigiana risulta essere costituito da peli corti e bianchi, con sfumature grigie sul treno anteriore in particolare nei tori, mentre la cute, le mucose orali, e le aperture naturali si presentano intensamente pigmentate di nero. Il vitello nasce di colore fromentino e diventa bianco intorno al terzo mese di età.

La persistenza di peli rossi limitatamente alla regione del sincipite, la coda grigia e la depigmentazione parziale delle mucose orali sono tollerate solamente in soggetti aventi requisiti morfo-funzionali pregevoli.

Dai dati raccolti presso il Libro Genealogico della Razza Marchigiana, le numerosità in questi ultimi anni tendono a stabilizzarsi, segno di una riscoperta quali-quantitativa della carne di questa razza.

<i>Anno</i>	<i>1983</i>	<i>1997</i>	<i>1998</i>	<i>1999</i>	<i>2000</i>	<i>2001</i>	<i>2002</i>
<i>Numerosità</i>	23.510	47.402	45.598	44.044	42.320	41.930	45.327

**Tabella 3: Consistenze bovini di razza Marchigiana.**

Nel 1993 è stato individuato ed accertato nella razza, e precisamente in un individuo di sesso femminile, il carattere responsabile dell'ipertrofia muscolare, prima conosciuto solamente nella Razza Piemontese, che è ora oggetto di studio e di selezione per la fissazione in una linea "*Marchigiana 2M*" (doppia muscolatura).



**Figura 31: Toro e vacca di razza Marchigiana.**

### **3.4. Razza Piemontese**

La Razza Piemontese deriva da popolazioni zebuine, di origine pakistana, spostatesi 25-30.000 anni fa nella zona dell'attuale Piemonte.

Qui i bovini asiatici si sono insediati, trovando la barriera naturale dell'arco alpino che ne ha permesso l'integrazione con la popolazione autoctona, fino a giungere, nel tempo, alla formazione dell'attuale Razza Piemontese.

La razza è diffusa in quasi tutto il Piemonte, ma le principali zone di allevamento sono rappresentate dalle province di Asti, Cuneo e Torino.

Dal punto di vista morfologico, il colore del mantello nei tori è grigio o fromentino chiaro, con accentuazione dei peli neri sulla testa (specie intorno alle orbite), sul collo, sulle spalle e sulle regioni distali degli arti, talora anche sulle facce laterali del tronco e sugli arti posteriori.

Nelle vacche il mantello è bianco o fromentino chiaro, con una vasta gamma di sfumature, mentre i vitelli alla nascita sono di colore fromentino, e schiariscono, assumendo la colorazione tipica degli adulti, a circa tre mesi di età.

Inoltre, nella Razza Piemontese, la lingua, il palato e le mucose in genere sono pigmentati di nero.

Un tempo nella razza Piemontese si distinguevano due sottorazze, quella di Demonte e quella Albere. La prima presentava una mole ridotta ed una colorazione più intensa, mentre la seconda denotava un notevole sviluppo delle masse muscolari della groppa e della coscia (groppa doppia o di cavallo) soprattutto, ma anche delle spalle e delle regioni del piano dorsale.

In tempi recenti le tecniche della genetica molecolare hanno reso possibile l'individuazione del gene responsabile della mutazione, che è stato mappato sul cromosoma 2 diversamente da quanto riscontrato in altre razze.

La mutazione determina un notevole aumento delle masse muscolari, e conseguentemente della resa al macello dei soggetti, dovuto ad un incremento nel numero delle fibre muscolari. Alla maggiore muscolosità si accompagnano inoltre una diminuzione del grasso intramuscolare ed anche del tessuto connettivo, determinando una maggiore tenerezza della carne.

Come intuibile la Razza Piemontese ha un'attitudine prevalente per la produzione della carne, nonostante ciò, negli ultimi anni, la selezione tende a non trascurare anche le produzioni lattee, infatti il latte munto dalle bovine, viene utilizzato nella produzione di formaggi tipici locali e del cuneese, quali il raro e pregiato Castelmagno, il Bra e il Raschera.



Figura 32: Toro, vacca e vitello di razza Piemontese.

### 3.5. Razza Romagnola

La razza Romagnola ha origini antichissime essendo diretta discendente del "bos Taurus macroceros" (uro dalle grandi corna), originario delle steppe dell'Europa centro-orientale e giunto fino a noi, attraverso le invasioni barbariche dei Goti, intorno al IV secolo d.C.

Oggi, le principali zone di diffusione di questa razza sono ascrivibili alle province di Forlì, Pesaro, Ravenna e Bologna, dove un tempo veniva impiegata nei lavori agricoli assumendo poi, con il passare degli anni, un'attitudine prettamente indirizzata alla produzione della carne.

Il colore del mantello è un carattere etnico fondamentale nella razza Romagnola, infatti il pelame ha un colore bianco avorio con gradazioni di colore grigio, più intense sul treno anteriore in particolar modo nei tori.

Inoltre, a seconda delle stagioni, il colore del mantello nella razza Romagnola muta, pertanto, in inverno il pelame si infoltisce molto, assumendo un aspetto quasi lanoso ed un colore più scuro, mentre in estate il pelo diviene più corto e chiaro.

Il colore del mantello varia anche in funzione del tipo di allevamento cui il bestiame è soggetto, essendo solitamente più chiaro nei soggetti allevati in stalla rispetto a quelli liberi allo stato brado.

La pigmentazione della cavità orale, della zona perivulvare e perianale, del fiocco della coda e del pisciolare, del musello, degli unghioni, la punta delle corna e il fondo dello scroto è nera, mentre la presenza di peli rossi limitatamente alla regione del sincipite, la coda grigia e la depigmentazione parziale delle mucose orali sono tollerate in soggetti in possesso di requisiti morfo-funzionali pregevoli.

Come in tutte le razze derivate podoliche, anche nella Romagnola il vitello nasce fromentino



per diventare bianco verso i tre mesi di età.

L'evoluzione della razza nel nostro paese è riassumibile come segue, secondo i dati raccolti dall'A.N.A.B.I.C.:

<i>Anno</i>	<i>1983</i>	<i>1997</i>	<i>1998</i>	<i>1999</i>	<i>2000</i>	<i>2001</i>	<i>2002</i>
<i>Numerosità</i>	17.545	14.508	14.346	14.237	14.334	14.371	15.479

**Tabella 4: Consistenze bovini di razza Romagnola.**

La razza Romagnola, ha inoltre conosciuto un notevole utilizzo in paesi esteri quali Inghilterra, Irlanda, Canada, Stati Uniti, Nuova Zelanda, Australia, Argentina, Messico e Brasile dove viene allevata in purezza o utilizzata come razza incrociante per le spiccate attitudini alla produzione della carne e all'utilizzo del pascolo.



**Figura 33: Toro e vacca di razza Romagnola.**

### **3.6. Razza Valdostana Castana**

L'origine della razza risulta ancora oggi molto incerto, ma le ipotesi più accreditate sarebbero due. La prima ipotesi vede la razza Valdostana Castana come un residuo dell'antica popolazione originaria della zona selezionata, in Svizzera, per il mantello uniforme (razza di Hérens) e in Valle d'Aosta per il mantello pezzato nero (Valdostana Pezzata Nera); mentre la seconda ipotesi afferma che la Castana è una popolazione meticcica derivata dall'incrocio fra la Hérens e la Valdostana Pezzata nera. Comunque sia, il Libro Genealogico della razza Valdostana Castana e quello della razza Valdostana Pezzata nera sono riuniti in un unico registro.

In origine, questi bovini, erano allevati limitatamente nella valle del Gran San Bernardo, in

Valle d'Aosta, e successivamente si sono diffusi in tutta la regione principalmente sui due versanti della Dora Baltea e nel tratto tra Châtillon e Aosta nonché, da alcuni anni, si riscontra una parziale diffusione in zone limitrofe del Piemonte, nell'Alto Canavese e in Val di Lanzo.

La razza si caratterizza per un mantello completamente uniforme, di colore castano, derivante dalla mescolanza di peli rossi e neri. La cute, le aperture naturali, gli unghioni e le mucose in generale risultano pigmentate di nero, così come le corna.

L'interesse degli allevatori per questa razza bovina, non va tanto ricercato nelle produzioni ottenibili quanto nelle caratteristiche peculiari innate di combattività delle vacche. Partendo dalle leggi naturali che portano le vacche a lottare tra di loro per stabilire la gerarchia in alpeggio, gli allevatori valdostani hanno organizzato e fortemente sostenuto delle gare di combattimenti tra vacche gravide nelle cosiddette "Battailles de Reines" (Battaglie delle regine).



**Figura 34: Vacche di razza Valdostana Castana.**

### **3.7. Razza Valdostana Pezzata Nera**

L'origine della razza è ancora oggi molto discussa. L'ipotesi più attendibile sembra essere quella che vede l'introduzione dalla Svizzera di alcuni capi di razza Hérens pezzati, che successivamente hanno seguito linee di selezione diverse.

In Svizzera i bovini vennero selezionati per un mantello uniforme, mentre nella Valdostana Pezzata Nera si continuò la selezione di soggetti a mantello pezzato appunto.

La razza oggi è allevata quasi esclusivamente in Valle d'Aosta, ed in particolare in un'area molto limitata, comprendente la Valpelline, il vallone di St.Barthélemy e di Ollomont e i comuni posti sui due versanti della Dora Baltea nel tratto tra Aosta e Nus.

Morfologicamente la razza si presenta di taglia medio-piccola, con arti brevi e robusti. Il

mantello è pezzato nero ed esente da eventuali peli rossi, mentre la testa ed il musello sono neri e risulta piuttosto frequente la stella bianca in regione frontale.

Le corna sono generalmente nere e robuste, nelle vacche dirette in avanti e verso l'alto, mentre nei tori dirette lateralmente.

Numericamente la razza nel giro di circa mezzo secolo ha subito una drastica riduzione, infatti come si può notare dalla tabella:

<i>Anno</i>	<i>1946</i>	<i>1960</i>	<i>1983</i>	<i>2003</i>
<i>Consistenza</i>	30.000	17.000	7.120	3.300

**Tabella 5: Consistenze bovini di razza Valdostana Pezzata Nera.**

La Valdostana Pezzata Nera è una razza a duplice attitudine fornendo sia buone rese alla macellazione, che discrete quantità di latte soprattutto se si considerano le condizioni difficili in cui è allevata.



**Figura 35: Toro e vacca di razza Valdostana Pezzata Nera**

### **3.8. Razza Valdostana Pezzata Rossa**

Questa razza deriverebbe verosimilmente dalle bovine pezzate rosse di origine centro-europea introdotte dai Burgundi, nel corso delle loro migrazioni, verso la fine del V° secolo.

In passato, vi furono tentativi di incroci della razza Valdostana Pezzata Rossa con le razze Montbéliarde e Abondance e, sporadicamente, con la Simmental ma, il conseguente incremento di mole, rendeva questi bovini meno adatti all'ambiente montano e tali incroci furono rapidamente



abbandonati.

Attualmente questa razza viene allevata in molti comuni dell'area montana e pedemontana torinese, in particolare nella zona compresa tra lo sbocco della Val d'Aosta e il Canavese, in Val di Susa, valli Chisone e Pellice della provincia di Torino. Ancora la si può trovare nelle zone montane e nel tratto della provincia di Cuneo confinante con le province di Imperia, Savona e Genova, inoltre gruppi di bovini Valdostani Pezzati Rossi sono stati introdotti nell'Appennino centrale e meridionale.

Morfologicamente la razza presenta il mantello pezzato rosso con varie sfumature di colore, che vanno dal rosso mogano al rosso chiaro, mentre la testa, la regione addominale, la parte distale degli arti e la coda sono bianche. Le aperture naturali, il musello e la lingua sono rosee.

La Valdostana Pezzata Rossa è una razza a duplice attitudine, con una prevalente attitudine alla produzione di latte, il quale viene destinato quasi interamente alla trasformazione casearia, facilitata anche dalla notevole diffusione del genotipo BB della k-caseina (36%).

Come già detto, questi bovini possiedono anche un'interessante, seppur non prevalente, attitudine alla produzione di carne, confermata dalla buona capacità di accrescimento e di ingrassamento dell'animale, nonché dall'ottimale utilizzo del foraggio al pascolo.



Figura 36: Toro e vacca di razza Valdostana pezzata rossa.

### **3.9. Razza Pezzata Rossa Oropa o Razzetta d'Oropa**

La zona d'origine e diffusione di questa razza è la Valle Elvo in provincia di Biella.

L'analisi filogenetica dei marcatori genetici ematici, pone la Pezzata Rossa d'Oropa vicino alla razza Simmental, infatti, entrambe sembrano derivare dal bestiame pezzato dell'Europa settentrionale introdotto in Italia dai Burgundi e Borgognoni nel V secolo.



Etnicamente, invece, questi bovini possono considerarsi una variante della razza Valdostana Pezzata Rossa. Dal 1985 è stato istituito, in Italia, il Registro Anagrafico delle popolazioni bovine autoctone e gruppi etnici a limitata diffusione, con lo scopo di salvaguardare le razze bovine minacciate di estinzione e per preservare questi patrimoni genetici.

A tale Registro Anagrafico sono state ammesse le seguenti razze: Agerolese, Bianca Val Padana (Modenese), Burlina, Cabannina, Calvana, Cinisara, Garfagnina, Modicana, Mucca Pisana, Pezzata Rossa d'Oropa, Pinzgau, Pontremolese, Pustertaler, Reggiana, Sarda, Sardo-Modicana, Varzese.

La Razzetta d'Oropa è di tagli e statura piccola, presenta un mantello rosso pezzato, con arti, ventre e testa generalmente bianchi con orecchie rosse. Raramente si ha la presenza di macchie rosse sulla testa dell'animale. E' da considerarsi una razza a duplice attitudine, con prevalenza lattifera, che si adatta bene alle difficili condizioni ambientali del pascolo montano.

L'evoluzione della consistenza è stata nel 1940 di 8.000 capi per passare nel 1983 a 9.000, e scendere poi a circa 5.000 capi nel 2002. Dopo aver subito una notevole contrazione numerica negli anni, la Pezzata Rossa d'Oropa, ha raggiunto un'equilibrio numerico, e le prospettive per un suo consolidamento sono buone.



Figura 37: Vacche di razza Pezzata Rossa Oropoa.

### 3.10. Razza Swedish Red and White

Viene allevata quasi esclusivamente in Svezia dove rappresenta circa il 60% della popolazione bovina nazionale. L'attitudine prevalente è la produzione di latte, in quanto questa razza deriva dalle razze Red Pied Swedish e Swedish Ayrshire.

Il colore del mantello in questa razza è rosso pezzato, infatti la percentuale di porzioni

colorate di rosso, supera quella delle porzioni bianche.



**Figura 38:** Vacche di razza Swedish Red and White.

### 3.11. Razza Red Danish

Questa razza appartiene al gruppo delle cosiddette “razze bovine baltiche”, ed è stata selezionata nell'arcipelago danese, dove rappresentava la stragrande maggioranza della popolazione bovina del Paese, per poi diffondersi anche nei territori limitrofi.

Questi animali hanno un mantello di colore rosso-ciliegia, leggermente più scuro negli individui di sesso maschile. Considerata razza a duplice attitudine con prevalenza lattifera, è stata oggi sostituita in gran parte dalle razze Jersey e Frisona.

**Errore di lettura**

**Errore di lettura**

**Figura 39:** Toro e vacca di razza Red Danish.

### 3.12. Razza Charolaise

La culla di origine è la regione del Charolle, la regione più a sud della Francia. Per la sua rusticità, per la tendenza a produrre ottima carne e per la sua facile acclimatazione, è allevata in tantissimi altri Paesi, e soprattutto è utilizzata come razza incrociante.

In passato era razza a duplice attitudine (lavoro e carne), ma con il passare del tempo è stata selezionata essenzialmente per la produzione di carne. Razza precoce, prolifica e con un armonico sviluppo delle varie regioni del corpo, presenta una colorazione del mantello bianco crema o bianco sporco mentre le mucose sono depigmentate rosee.



Figura 40: Toro e vacca di razza Charolaise.

### 3.13. Razza Salers

Questa razza francese è di Alvernia nel Massiccio Centrale. Riconosciuta nel 1853, si è imposta all'inizio per le sue doti di razza a triplice attitudine, per poi venire selezionata esclusivamente per la produzione della carne. Il colore del mantello è uniforme rosso-bruno, con le mucose e le aperture naturali di colore rosso-carnicino. Le corna di questa razza sono a forma di “lira” e portate in alto.





**Figura 41: Toro e vacca di razza Salers.**

### **3.14. Razza Aberdeen Angus**

Questa razza ha origini antichissime e trova la sua culla di origine nel nord-est della Scozia, appunto nella contea di Aberdeen. È molto diffusa anche negli Stati Uniti e nel Sud America, dove rappresenta la razza più allevata per la produzione di carne.

È una razza acorne; il colore del mantello è nero a pelo raso, e con le mucose e la cute pigmentate anch'esse di nero.



**Figura 42: Toro e vacca di razza Aberdeen Angus.**

### **3.15. Razza Hereford**

Originaria della contea inglese dell'Herefordshire questa razza è stata importata negli Stati

Uniti per la prima volta nei primi anni dell'800. È molto diffusa in Argentina per le sue caratteristiche di rusticità, robustezza e resistenza a molte malattie infettive e parassitarie, doti essenziali per una razza pascolatrice.

Assieme all'Aberdeen Angus, è una delle razze da carne più allevate al mondo, mentre in Italia non viene allevata. Il mantello è di colore rosso più o meno carico con testa bianca. Può inoltre presentare pezzature bianche sulla gola, sulla giogaia, sul ventre, sul collo-garrese-dorso.



**Figura 43: Toro e vacca di razza Hereford.**

## 4. RAZZE SUINE OGGETTO DI STUDIO

Per quanto riguarda le razze suine prese in esame in questa tesi, si ricorda che molte di esse sono servite come verifica e conferma di alcune analisi di laboratorio, atte semplicemente ad avere un quadro generale più ampio possibile del comportamento di alcuni geni all'interno della popolazione suina.

### 4.1. Razza Cinta Senese

Razza italiana tra le più antiche, ha la sua culla di origine nella zona collinare ad occidente della città di Siena, da cui si è diffusa in tutta la Toscana per le sue ottime doti di pascolatrice.

La principale caratteristica etnica della razza è data dalla presenza di una larga fascia bianca che si estende dal garrese alle spalle e agli arti anteriori, mentre tutta la restante parte del corpo è di color bruno-ardesia con setole nere, corte e sottili. La testa ha un profilo rettilineo, piuttosto lunga e affusolata terminante in un grugno robusto ed appuntito. Le orecchie sono piccole e dirette in avanti e in basso. Il tronco si presenta non molto lungo, cilindrico e con addome cadente.



Figura 44: Scrofa di razza Cinta Senese.

### 4.2. Razza Large White

È forse la razza suina più conosciuta ed apprezzata nel mondo. La sua formazione risale al XVIII secolo e la sua culla si ebbe nella contea di York partendo da scrofe locali e verri importati dall'Oriente (cinesi, siamesi). Il mantello è di colore bianco, formato da cute depigmentata (rosea) e da setole bianche e lunghe. Le orecchie sono portate in alto leggermente inclinate in avanti. Questa

razza possiede cosce e spalle ben sviluppate, il tronco è lungo, cilindrico e leggermente depresso lateralmente. Le natiche sono convesse , con prosciutto spesso, muscoloso e disceso.

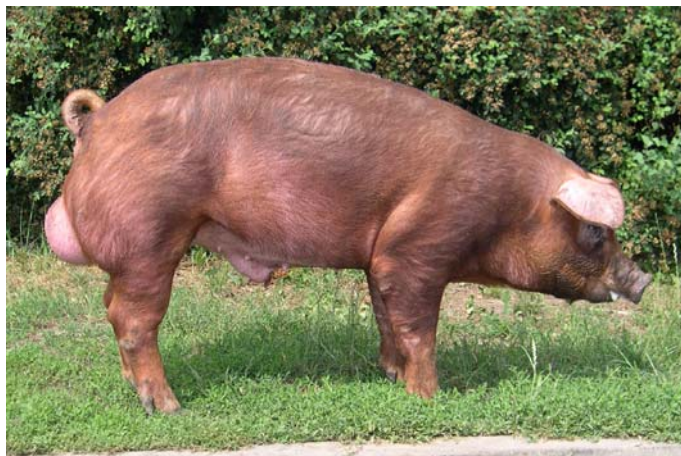


**Figura 45: Scrofetta di razza Large White.**

### **4.3. Razza Duroc**

La razza suina Duroc ha origini piuttosto incerte, risulta tuttavia che la sua evoluzione e il suo miglioramento siano iniziati in U.S.A. più di un secolo fa, esattamente nel New Jersey.

Sono animali di mole medio-grande, armonici, con cute color ardesia chiaro con tonalità più scure nel dorso, sui lombi, sulla superficie caudale degli arti posteriori al di sotto del garretto. La cute è rosea nel muso, nella gola, nel petto e nella superficie interna degli arti. Il grugno è nero ardesia. Il mantello è costituito da setole rosse e nere, dal sauro al marrone chiaro. Il profilo nasale è leggermente concavo e le orecchie sono piccole e pendule.



**Figura 46: Verro di razza Duroc.**



#### **4.4. Razza Landrace**

Razza originaria della Danimarca, dove è stata creata verso la fine del secolo scorso incrociando scrofe locali con verri di razza Large White importati dall'Inghilterra. Sono animali molto lunghi con sviluppo delle spalle non sempre ottimale.

La testa ha profilo rettilineo, e le orecchie si presentano relativamente lunghe dirette in avanti ed in basso. Il mantello in questa razza si presenta con pigmentazione rosea della pelle e con setole di colore bianco.



**Figura 47: Verro di razza Landrace.**

#### **4.5. Razza Hampshire**

Razza americana, di buona mole dotata di notevole rusticità ed attitudine al pascolo. Presenta un mantello di colore nero con la caratteristica cinghiatura bianca che passa su garrese, spalla, braccio, fino al piede. La testa presenta un profilo rettilineo con orecchie piccole ed erette. Il collo è corto e muscoloso mentre il tronco risulta relativamente corto.





**Figura 48: Verro di razza Hampshire.**

#### **4.6. Razza Pietrain**

Razza originaria del Belgio. È stata ottenuta dall'incrocio e successivo meticciamiento di suini di origine francese appartenenti ad una razza pomellata assai precoce, con suini Berkshire e Tamworth.

Suino ipertrofico, con masse muscolari molto pronunciate che forniscono altissime rese al macello, con carni chiare quasi prive di grasso. Questa razza è però caratterizzata da un'elevata suscettibilità allo stress, che determina alterazioni fisiologiche delle masse muscolari tali da compromettere l'attitudine alla trasformazione in prosciutti di qualità (sindrome mioessudativa PSE).

Altri difetti sono la scarsa velocità di accrescimento, l'indice di conversione alimentare sfavorevole e la bassa prolificità. Il mantello si presenta di colore bianco, con vistose pezzature nere tendenti alla forma ovale o rotondeggiante. La testa è leggera con profilo rettilineo, orecchie corte larghe e portate in avanti. Il collo è corto e muscoloso, tronco cilindrico e lungo, con linea dorso-lombare larga e muscolosa.

Caratteristica l'ipertrofia muscolare di origine genetica presente in questa razza.



**Figura 49: Verro di razza Pietrain.**

#### **4.7. Razza Meishan**

Razza Cinese, introdotta in Europa per essere utilizzata nell'incrocio con suini di razze occidentali, allo scopo di sfruttarne le numerose caratteristiche. Infatti questa razza risulta molto resistente alle malattie, è una buona sfruttatrice dei foraggi, ed inoltre è una tra le razze più prolifiche al mondo (15-17 suinetti nati e 13 svezzati). Per contro presenta difetti quali un accrescimento non molto rapido e un'eccessiva adiposità delle carni.

Morfologicamente si presenta di piccola mole, con numerose pliche cutanee. Le orecchie sono grandi, pendenti ed inclinate in avanti. Il mantello è di colore nero.



**Figura 50: Scrofa di razza Meishan.**

## 5. RAZZE CUNICOLE OGGETTO DI STUDIO

Visto le numerose razze cunicole esistenti ed analizzate in questa tesi, si è pensato di semplificare la descrizione delle varie razze citando solamente le caratteristiche principali degli animali, con richiami alle varie colorazioni del mantello presenti in ogni razza.

<i>Categoria razza</i>	<i>Razza</i>	<i>Colorazione</i>	<i>Foto</i>
<i>Razze Pesanti</i>	<i>Ariete</i>	Caratteristica della razza sono le orecchie cadenti ai lati della testa e incapaci di movimento. Sono ammesse tutte le colorazioni, eccetto l'argentata.	
	<i>Gigante</i>	I colori ammessi sono grigio selvatico, grigio lepre, grigio scuro, grigio ferro, grigio acciaio, nero, blu, lepre e fulvo. La colorazione bianca e quella bianca a macchie sono riservate alle razze Gigante Bianco e Gigante Pezzato.	
	<i>Gigante Bianco</i>	La pelliccia è folta, soffice e brillante e ha un colore bianco (e in questo caso gli occhi sono generalmente rossi), ma è ammessa anche la colorazione azzurra.	
	<i>Gigante Pezzato</i>	Pelliccia folta, soffice e brillante di colore bianco con presenza di macchie nere sui fianchi (da 6 a 8) e sulle guance, macchia a forma di farfalla sul naso, cerchi neri intorno agli occhi e striscia nera sulla schiena. Lo Standard ammette anche macchie di colore blu.	
<i>Razze Medie</i>	<i>Alaska</i>	Il sovracoloro è nero cupo ed intenso, molto lucido sul dorso, mentre il sottopelo è blu. Il ventre è leggermente più opaco. Gli occhi sono bruni.	
	<i>Argentata di Champagne</i>	Il colore di copertura è grigio-argento uniforme su tutto il corpo, mentre le estremità delle zampe, del muso e delle orecchie si presentano più scure. L'argentatura è determinata da due tipi di peli di giarra: peli neri e peli con estremità bianco-argento. Negli esemplari giovani si ha una predominanza della colorazione scura, mentre negli adulti si ha un progressivo aumento	

dei colori più chiari. Gli occhi sono bruni e le unghie scuro-nerastre.

***Ariete Inglese***

Le varietà di colore sono molto numerose e sono ammesse tutte le colorazioni eccetto quella argentata. Le orecchie sono cadenti ai lati della testa e incapaci di movimento. Lo standard prevede una lunghezza minima di 58 cm (record quasi 73 cm).



***Bianca di Nuova Zelanda***

La pelliccia è densa e folta, di colore bianco albino, con occhi depigmentati rossi. Presenta tre varietà: Bianca, Rossa e Nera.



***Bianca di Vienna***

Il colore è bianco candido intenso e gli occhi sono azzurri.



***Blu di Vienna***

Il colore è blu ardesia intenso con sottopelo leggermente più chiaro e gli occhi sono azzurri.



***Californiana***

Il pelo è corto e il colore del mantello è bianco con macchie nere su naso, orecchie, zampe e coda. La colorazione di queste macchie, più o meno accentuata, va dal nero al grigio scuro (ammesse anche macchie avana) e sfuma dolcemente sino a scomparire nel bianco candido della pelliccia. Gli occhi sono rosso-albino, le unghie color corno generalmente scuro. In Inghilterra sono accettate le estremità di colore cioccolato, blu o lilla.



***Cincillà Grande***

Il mantello (che ricorda quello del Cincillà, roditore sudamericano dalla pregiata pelliccia), lucente, è grigio con tonalità bluastre e piccole macchioline nere, più fitte sul dorso. La ticchiolatura è determinata da ciuffetti di peli neri. Il sovracoloro del mantello si estende sui fianchi. Petto e zampe sono egualmente colorati. Le orecchie sono orlate di nero. Il triangolo sulla nuca è piccolo e di color grigio-chiaro.





***Fulva di Borgogna***

La pelliccia è di colore rosso-fulvo uniforme, mentre la parte ventrale del corpo, il mento e i cerchi intorno agli occhi sono più chiari.



***Giapponese***

I due colori del disegno sono nero e giallo. Le tonalità del giallo, dall'arancione fino al fulvo, sono regolari, preferibilmente giallo-arancio. Il sottoventre è un po' sbiadito. Ventre, interno degli arti e sottocoda possono presentare macchie bianche. Il colore degli occhi è bruno.



***Hotot***

Il corpo è completamente bianco, eccetto un anello nero intorno agli occhi (i cosiddetti "occhiali") che deve avere uno spessore uniforme di 3-5 mm. Gli occhi sono di colore bruno-nerastro.



***Lepre***

Il mantello è di un bel colore rosso volpe, molto voluminoso, con sfumature ondulate focate e castane date da ciuffi di peli principali con la punta nerastra.



***Pezzata Tricolore***

Questa razza è caratterizzata dalla colorazione del mantello di tre colori diversi, di cui quello principale è il bianco con macchie nere e gialle ben definite e non sovrapposte. Dalla nuca fino alla punta della coda si estende una striscia colorata (anguilla) larga circa 2 cm. Le macchie sui fianchi, da 6 a 8, sono equamente distribuite sui due fianchi. Le orecchie possono essere completamente nere o macchiettate; la faccia ha una macchia a forma di farfalla, gli occhi sono cerchiati da un anello colorato e sulle guance sono presenti macchie di uno dei due colori.



***Rossa di Nuova Zelanda***

Presenta mantello rosso volpe brillante, occhi bruni e unghie color corno scuro. Il ventre, la parte inferiore della coda e l'interno delle zampe possono essere più chiare.



***Turingia***

Ha un mantello di colore giallo-bruno frammisto di peli principali blu-nerastri che gli conferiscono una sfumatura nero fumo. Presenta delle macchie color fuliggine che formano una maschera sul viso (non oltre l'altezza degli occhi), cerchi intorno agli occhi e un'orlatura su guance, orecchie, zampe, coda, fianchi e cosce. Il sottocolore è giallo-rosso sul dorso, mentre



nelle macchie e nelle parti scure del corpo è grigio-azzurrognolo sfumato.

**Razze Leggere**

**Ariete Nano**

Questa razza presenta orecchie cadenti ai lati della testa e incapaci di movimento. Le varietà di colore sono molto numerose e sono ammesse tutte le colorazioni eccetto quella argentata.



**Ariete Piccolo**

Le caratteristiche sono identiche a quelle della razza precedente. L'unica differenza si ha nel peso, maggiore in questa razza.



**Argentata Piccola**

Il mantello può essere nero-argento, giallo-argento, blu-argento, avana-argento o grigio lepre-argento. L'argentatura è provocata da abbondanti peli di giarra bianchi sulla punta, la cui densità forma sfumature più chiare o più scure, entrambe ammesse purché uniformi su tutto il corpo.



**Avana**

La colorazione è uniformemente bruno-castana lucente, mentre il sottocolore è blu con fondo più chiaro. Il nome le deriva dal colore del mantello somigliante alla tinta del sigaro Avana.



**Cincillà Piccolo**

mantello (che ricorda quello del Cincillà, roditore sudamericano dalla pregiata pelliccia), lucente, è grigio con tonalità bluastre e piccole macchioline nere, più fitte sul dorso. La ticchiolatura è determinata da ciuffetti di peli neri. Il sovracoloro del mantello si estende sui fianchi. Petto e zampe sono egualmente colorati. Le orecchie hanno orlo nero. Il triangolo sulla nuca è piccolo e di colore grigio-chiaro. La coda è nera macchiata con peli grigio-chiaro. Il ventre e il sottocoda sono bianchi. Le unghie sono di colore nerastro. Il sottocolore è blu scuro per tutto il corpo.



**Ermellino**

In Italia sono ammesse le colorazioni bianca con occhi blu e bianca con occhi rubino (albini).



***Fata di Marburgo***

Il colore di questa razza è grigio-blu chiaro con un leggero riflesso brunastro più evidente su teste e orecchie. Il ventre è più chiaro. La pelliccia è molto densa e setosa. Gli occhi sono blu grigio con riflessi rossi, le unghie sono color corno.



***Fata Perlata***

Ha un colore uniforme su tutto il corpo e sono ammesse tre sfumature: chiara, media (la più apprezzata) e scura. La pelliccia è folta, con la punta dei peli principali grigio chiaro e grigio scuro che le conferiscono il tipico aspetto grigio-blu. Sono presenti aree con colorazione molto più chiara intorno agli occhi, sotto la mandibola, sul petto e nella parte interna delle zampe. L'addome è bianco e il sotto pelo è grigio-blu. Una zona leggermente marroncina separa il colore dell'addome da quello del resto del corpo.



***Focata***

Razza con mantello, denso e lucente, caratterizzato da un contrasto di colore creato dalla sfumatura di colore più chiaro su ventre, coda, cerchi degli occhi e nuca. In Italia sono ammesse le varietà nero-fuoco (la più antica), blu-fuoco e avana-fuoco.



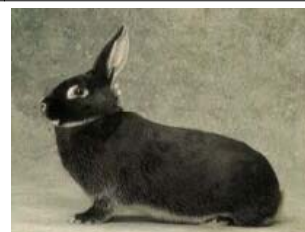
***Giarra Bianca***

Le macchie caratteristiche della razza sono: l'orlatura bianca alle narici, occhi e mascelle; macchiolina bianca alla radice delle orecchie; triangolo bianco o bianco-argento sulla nuca; bianche le dita delle zampe anteriori e la parte interna dei quattro arti.

La tipica colorazione, dalla quale deriva anche il nome della razza, è conferita da peli di giarra coronati di bianco.

Questi non debbono però essere in numero eccessivo e tali da creare una colorazione tendente all'argentato.

Lo Standard italiano ammette le varietà nera, blu e bruna.



***Lince***

I peli, blu-argento in superficie, rossicci nel mezzo e bianco candido alla base, conferiscono al mantello una colorazione violacea particolare. Gli occhi sono cerchiati di chiaro. La pelliccia è folta, morbida e dotata di una giarra uniforme.



***Martora***

Ha un mantello bruno o blu; la maschera (che raggiunge l'altezza degli occhi), le orecchie, le occhiaie, le zampe e la coda sono più scure, così come una striscia larga circa 8 cm che percorre tutta la linea del dorso.

Le due colorazioni ammesse, bruno e blu, si presentano fortemente brillanti e lucenti. Gli occhi sono rispettivamente bruni e blu-grigio con riflessi rossi; le unghie color corno scuro. Il sottocolore segue le tonalità del sovracoloro.



**Olandese**

Facilmente riconoscibile, grazie al particolare disegno ed al contrasto dei colori della pelliccia. Il disegno caratteristico della testa consiste in una fronte bianca, orecchie e macchie circolari sulle guance colorate. Il cerchio di divisione del corpo, fra il bianco e il colore, deve fasciare il tronco dell'animale passando 2-3 cm dietro gli arti anteriori che comunque devono essere bianchi. Coniglio elegante, arrotondato e armonico. La colorazione più bella è sicuramente il nero che oltre ad essere la più difficile da ottenere e da riprodurre, assume particolare pregio quando è pura, perfetta e con una certa brillantezza. Sono ammesse comunque tutte le colorazioni, compresa quella giapponese

**Oro di Sassonia**

Il mantello è uniforme di un bel colore rosso fulvo intenso e brillante. Il sottocolore è fulvo pallido tendente al giallo.

**Nani Colorati**

Geneticamente, per mole e per caratteristiche i Nani colorati sono praticamente uguali all'Ermellino (o Polacco) dal quale derivano. L'unica differenza è il mantello, che può avere tutte le colorazioni delle razze riconosciute, eccetto le Pezzate. Nella colorazione "Martora" è ammesso oltre al bruno e al blu anche il giallo (o siamese). Il corpo è raccolto, corto e arrotondato, come la testa. La lunghezza massima delle orecchie è di 7 cm. Le zampe sono corte ed esili, la coda piccola e perfettamente aderente.

**Pezzata Piccola**

La pelliccia fitta e piena, con abbondante giarra. Il pelo è di media lunghezza, di colore bianco. I colori del disegno sono nero, blu e avana. Gli occhi della colorazione bianco-nero e bianco-avana sono marroni, mentre nei soggetti bianco-blu sono grigio-blu.

**Pezzata Inglese**

La differenza dalla Gigante Pezzata per la distribuzione delle macchie sui lati che formano una specie di catena di piccoli punti colorati che partendo dalla nuca attraversano i fianchi obliquamente per finire in macchie più grosse sulle cosce.

Il colore di fondo è bianco puro. Sono ammesse le seguenti colorazioni per le macchie: nero, blu, madagascar, fulvo e avana. Il colore degli occhi è corrispondente al colore del disegno.

Razza leggera con buon portamento, elegante e vivace nell'espressione generale. La pelliccia è





folta nella borra e fine nella giarra. Il pelo non troppo lungo (2,5 cm). Le unghie sono incolori.



**Russo**

Il mantello ricorda quello della Californiana, di colore bianco candido e macchie colorate su muso, orecchie, zampe e coda. Sono ammesse tre varianti nella colorazione delle macchie: nero, blu e avana. Gli occhi sono rossi, le unghie scure.



**Razze Speciali**

**Angora**

È la tipica razza allevata per la lana. Il colore più diffuso ed anche più apprezzato dalla industria manifatturiera è il bianco, ma sono ammessi tutti i colori.



**Rex**

Tipica di questa razza è la pelliccia corta e molto folta, tanto da sembrare velluto al tatto. Le varietà riconosciute dallo standard italiano sono moltissime: bianco, avana, blu, nero, madagascar, martora, fata, castor rex (di colore castano focato), lince rex rossa (di colore rosa-beige con riflessi color platino), lince rex blu (di colore blu con riflessi rosa), rex dalmato (con colore base bianco puro e con disegno nero, blu, avana, castoro, giallo o madagascar) e rex tricolore (con colore base bianco e colore del disegno nero e arancione).



**Satin**

La razza Satin è caratterizzata da un mantello particolarmente lucente, risultato di una mutazione (comparsa negli Stati Uniti in un coniglio di razza Avana intorno al 1940) che ha alterato la struttura del pelo rendendolo molto sottile.

Lo Standard italiano ammette le colorazioni avorio con occhi rossi o blu, nera, blu, bruna, fata, castoro, lince, avana, cincillà fulva, rossa, martora (blu, bruna e gialla siamese) e argentata.



**Volpe**

La pelliccia ricorda quella della volpe, è folta e dotata di una borra molto fitta. La giarra è particolarmente forte e lunga (5-6 cm) su tutto il corpo, eccezion fatta per testa, orecchie e zampe. Lo Standard italiano ammette le colorazioni bianca con occhi rossi o blu, blu, gialla, avana, cincillà e fata.



## 6. OBIETTIVI DELLA TESI

La tracciabilità rappresenta un fondamentale aspetto per garantire la qualità e la sicurezza degli alimenti. La tracciabilità di razza nei prodotti carnei ed in quelli lattiero-caseari, si pone come esigenza al fine di garantire produzioni ottenute solo con animali di una particolare razza e per il fatto che su questi prodotti non è sempre possibile effettuare una tracciabilità individuale degli animali.

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

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

L'analisi del DNA permette di stabilire un collegamento diretto tra prodotto e animale. Collegamento impossibile da falsificare perchè il DNA è presente in tutte le cellule animali ed è unico per ciascun animale (a parte i gemelli monozigotici). Questo fatto permette facilmente di mettere in evidenza eventuali incongruenze tra prodotto e animale tramite una semplice analisi del DNA. Tuttavia per mettere a punto protocolli di autenticazione dei prodotti animali e, nel caso specifico, di prodotti animali monorazza, è necessario studiare i geni e le mutazioni che potrebbero permettere di differenziare le diverse razze e quindi i loro prodotti. In seguito, sulla base dei dati relativi a queste indagini, si potrà passare alla messa a punto vera e propria di protocolli di autenticazione e tracciabilità di razza basati sull'analisi del DNA.

Gli obiettivi della presente tesi sono stati quelli di:

1. Studiare alcuni geni (*MC1R* e *KIT*) che determinano il colore del mantello nel bovino ed eventualmente identificare e/o analizzare mutazioni in diverse razze per verificarne la diffusione;
2. Mettere a punto un protocollo di tracciabilità e autenticazione per il Parmigiano Reggiano prodotto con solo latte di razza Reggiana, come esempio per la messa a punto di simili protocolli per la tracciabilità di prodotti di altre razze bovine;
3. Studiare i due principali geni che determinano il colore del mantello nella specie suina (*MC1R* e *KIT*) come primo passo per la messa a punto di un protocollo di tracciabilità dei prodotti di razza Cinta Senese;

4. Studiare i geni *MC1R* e *ASIP* nel coniglio e successivamente caratterizzare diverse razze a questi loci come primo passo per lo studio della genetica del colore del mantello in questa specie e per poter disporre di un primo strumento utilizzabile per la tracciabilità di razza nella specie cunicola oltre che a valutarne gli alcuni aspetti evolutivi in altri leporidi.

La presente tesi è frutto dell'attività di ricerca in questo specifico campo della genomica applicata alle produzioni animali. Il lavoro svolto è stato oggetto di diverse pubblicazioni su riviste scientifiche e comunicazioni a convegni internazionali che si riportano di seguito come parte stessa della tesi, con, in alcuni casi, l'integrazione di alcuni elementi addizionali:

RUSSO V., FONTANESI L., SCOTTI E., TAZZOLI M., DALL'OLIO S., DAVOLI R. (2007) Analysis of melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene polymorphisms in some cattle breeds: their usefulness and application for breed traceability and authentication of Parmigiano Reggiano cheese. *Ital J Anim Sci.* 6 :257-272.

TAZZOLI M., BEEVER J.E., FONTANESI L., RUSSO V. (2007) Identification of mutations in the bovine KIT gene, a candidate for the Spotted locus in cattle. *Italian Journal of Animal Science* 6 (Suppl. 1), 218.

FONTANESI L., BOZZI R., TAZZOLI M., CROVETTI A., DAVOLI R., FRANCI O., RUSSO V. (2005) Genetic characterization of Cinta Senese pig breed: analysis of polymorphisms in four genes affecting performance and phenotypic traits. *Proceedings of the International Workshop "The Role of Biotechnology for the Characterisation and Conservation of Crop, Forestry, Animal and Fishery Genetic Resources"*, Villa Gualino, Turin 5-7 March 2005. *Book of Proceedings*, pp. 175-176.

FONTANESI L., TAZZOLI M., BERETTI F., RUSSO V. (2006). Mutations in the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *ANIMAL GENETICS*. vol. 37, pp. 489 – 493.

FONTANESI L., TAZZOLI M., RUSSO V. (2007) Non-invasive and simple methods for sampling rabbit DNA for PCR analysis of melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene mutations: a technical note. *World Rabbit Science*, 15, 121-126.

FONTANESI L., OULMOUDEN A., TAZZOLI M., ALLAIN D., DERETZ-PICOULET S., ROBINSON T.J., PECCHIOLI E.,  
COOK J., RUSSO V. Investigation of coat color affecting genes in several European rabbit  
breeds and other Leporid species. Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, in press.

**ANALYSIS OF MELANOCORTIN 1 RECEPTOR (*MC1R*) GENE  
POLYMORPHISMS IN SOME CATTLE BREEDS: THEIR USEFULNESS  
AND APPLICATION FOR BREED TRACEABILITY AND  
AUTHENTICATION OF PARMIGIANO REGGIANO CHEESE**

Vincenzo Russo, Luca Fontanesi, Emilio Scotti, Marco Tazzoli,  
Stefania Dall'Olio and Roberta Davoli

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroambientale, Sezione di Allevamenti Zootecnici,  
Università di Bologna, Reggio Emilia, Italy

*Corresponding author:* Prof. Vincenzo Russo, DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici,  
Facoltà di Agraria, Università di Bologna. Via F.lli Rosselli 107, Villa Levi - Coviolo, 42100 Reggio  
Emilia, Italy - Tel. +39 0522 290522, Fax: +39 0522 290523 - Email: vincenzo.russo@unibo.it

**ABSTRACT**

In cattle, the *MC1R* gene has been the subject of several studies with the aim to elucidate the biology of coat colour. Then, polymorphisms of this gene have been proposed as tools for breed identification and animal products authentication. As a first step to identify breed specific DNA markers that can be used for the traceability of mono-breed dairy cattle products we investigated, using PCR-RFLP and PCR-APLP protocols, the presence and distribution of some alleles at the *MC1R* locus in 18 cattle breeds for a total of 1360 animals.

For each of seven breeds (Italian Holstein, Italian Brown, Italian Simmental, Rendena, Jersey, Reggiana and Modenese) as a large number of animals (>70) was genotyped the obtained results can be considered with more confidence. Allele  $E^D$  was identified only in black pied cattle (Italian Holstein and Black Pied Valdostana). Allele  $E$  (this nomenclature includes all alleles except  $E^D$ ,  $E^I$  and  $e$ ) was observed in Italian Brown, Rendena, Jersey, Modenese, Italian Simmental, Grigio Alpina, Piemontese, Chianina, Romagnola, Marchigiana, Swedish Red and White and Danish Red. Allele  $E^I$  was identified in Italian Brown, Rendena, Grigio Alpina, Piemontese, Swedish Red and White and Danish Red. The recessive allele  $e$ , known to cause red coat colour, was fixed in

Reggiana and almost fixed in Italian Simmental.

This allele was observed also in Italian Holstein, Italian Brown, Rendena, Jersey and Modenese even if with low frequency. Moreover, this allele was detected in Valdostana, Pezzata Rossa d'Oropa, Piemontese, Romagnola, Swedish Red and White, Danish Red, Charolais and Salers. In the case of the Reggiana breed, which is fixed for allele *e*, the *MC1R* locus is highly informative against breeds that carry other alleles or in which allele *e* is at very low frequency. In theory, using the *MC1R* locus it is possible to identify the presence of milk of some other breeds in Parmigiano Reggiano cheese labelled as of only Reggiana. This possibility was practically tested setting up protocols to extract and analyse polymorphisms of the *MC1R* locus in several dairy products, including Parmigiano Reggiano cheese cured for 30 months. The lower detection limit was estimated to be 5% of non expected DNA. This test can represent a first deterrent against frauds and an important tool for the valorisation and authentication of Parmigiano Reggiano cheese obtained from only Reggiana milk.

**Key words:** breed traceability, dairy cattle products, food authentication, *MC1R* polymorphisms, Parmigiano Reggiano cheese

## RIASSUNTO

### ANALISI DI ALCUNE MUTAZIONI AL LOCUS *MELANOCORTIN 1 RECEPTOR (MC1R)* IN DIVERSE RAZZE BOVINE E LORO UTILIZZO PER LA TRACCIABILITA' DI RAZZA DEL FORMAGGIO PARMIGIANO REGGIANO

*Il legame tra un prodotto di origine animale e la razza da cui questo è originato rappresenta un aspetto importante per la valorizzazione di alcune produzioni. Il maggior prezzo che questi prodotti spuntano sul mercato fa emergere l'esigenza di poter autenticare o tracciare i prodotti mono-razza per smascherare e scoraggiare possibili frodi. A questo scopo sono stati proposti sistemi di analisi del DNA, alcuni dei quali analizzano marcatori in geni che determinano il colore del mantello, che è uno dei principali caratteri che differenziano tra di loro le razze. Diverse mutazioni nel gene melanocortin 1 receptor (*MC1R*) sono già state associate a particolari effetti sul colore del mantello nella specie bovina. In questa ricerca abbiamo studiato la presenza dei principali alleli al locus *MC1R*, per valutare la possibilità di utilizzare questo gene per l'autenticazione e la tracciabilità di razza dei prodotti lattiero-caseari. Le mutazioni che permettono di distinguere*

*questi alleli sono state analizzate utilizzando protocolli di PCR-RFLP e PCR-APLP su un totale di 1360 animali appartenenti a 18 razze bovine. Per ognuna delle seguenti razze, Frisona Italiana, Bruna Italiana, Pezzata Rossa Italiana, Jersey, Rendena, Reggiana e Modenese, è stato possibile analizzare più di 70 animali. L'allele  $E^D$  è stato identificato nella razza Frisona Italiana con una frequenza dello 0,886. L'allele  $E$  (nomenclatura che include tutti gli alleli tranne che  $e$ ,  $E^D$  e  $E^I$ ) è stato identificato con alta frequenza nella Bruna Italiana (0,591), Rendena (0,738), Jersey (0,955) e Modenese (0,961) e con bassa frequenza nella Pezzata Rossa Italiana (0,029). Inoltre, questo allele è stato osservato nella Rossa Svedese, Rossa Danese, Grigio Alpina, Piemontese, Romagnola, Marchigiana e Chianina. In alcune di queste razze (Bruna Italiana, Rendena, Grigio Alpina, Piemontese, Rossa Svedese e Rossa Danese) è stato identificato anche l'allele  $E^I$ . L'allele  $e$  è risultato fissato nella razza Reggiana e quasi fissato nella razza Pezzata Rossa Italiana. Inoltre, con bassa frequenza, è stato identificato in tutte le altre razze analizzate, tranne che nella Marchigiana. Le differenze osservate tra razze esaminate indicano che, almeno in alcuni casi, è possibile utilizzare i polimorfismi del gene MC1R per escludere o confermare l'impiego di latte di una determinata razza nella produzione di un prodotto lattiero-caseario. Il caso più interessante è quello del formaggio Parmigiano Reggiano prodotto con l'uso esclusivo di latte di bovine di razza Reggiana. Infatti, essendo presente in questa razza soltanto l'allele  $e$  di MC1R il rilievo di qualsiasi altro allele nel DNA estratto dal formaggio rivela l'uso di latte proveniente da altre razze. La messa a punto di un metodo PCR-RFLP per l'analisi del DNA estratto da prodotti lattiero caseari, incluso il Parmigiano Reggiano di oltre 24 mesi di stagionatura, rappresenta uno strumento importante per la difesa di questo prodotto mono-razza da eventuali frodi. I risultati ottenuti su 10 forme di formaggio prodotto esclusivamente con latte di bovine di razza Reggiana e su 15 forme di Parmigiano Reggiano commerciale ottenuto senza restrizione della razza di origine del latte hanno mostrato la validità del metodo del quale è stata valutata anche la sensibilità.*

*Parole chiave: tracciabilità di razza, autenticazione dei prodotti lattiero-caseari, mutazioni del gene MC1R, formaggio Parmigiano Reggiano.*

## **INTRODUCTION**

Traceability of farm animals to their source breed is becoming an important issue for the authentication of their products as there is an increasing interest in marketing mono-breed labelled lines of meat as well as dairy products, that in some cases have obtained the protected denomination



of origin (PDO). This interest derives from the fact that a marketing link between breed and their originated products can contribute to improve breed profitability and, in turn, sustainability of such farm animal productions with important impacts on rural economy of particular geographic areas and on breed conservation and biodiversity (i.e.: de Roest and Menghi, 2000; Gandini and Villa, 2003). A classical example on this issue is the recovery of the Reggiana breed through the production and valorisation of Parmigiano Reggiano cheese obtained from this breed only (Russo and Mariani, 1975; Associazione Nazionale Allevatori Bovini Razza Reggiana, 2000). This mono-breed cheese is sold at about the double the market prize of undifferentiated Parmigiano Reggiano cheese.

Analysis of the DNA present in all animal products (including dairy products as the milk contains the somatic cells of the cow) can be used to trace back its origin to the individual animals and to infer their breed. Different approaches have been proposed for breed traceability using genetic markers: i) a probabilistic approach mainly based on the use of highly variable microsatellite or AFLP markers combined with different computational analyses that assign individuals to a particular breed with a certain probability (i.e.: Blott *et al.*, 1999; Ciampolini *et al.*, 2000; Maudet *et al.*, 2002; Negrini *et al.*, 2003); ii) a deterministic approach based on the use of few breed specific or exclusive markers whose informativeness is due only to their presence or absence in the analysed products (i.e.: Maudet and Taberlet, 2002; Carrión *et al.*, 2003). The former needs the constitution of databases of microsatellite or AFLP allele or genotype frequencies for each considered breed. It was proposed for breed traceability of individual meat cuts even if some limits have been observed for the distinction of relatively genetically undifferentiated breeds (i.e.: Ciampolini *et al.*, 2000; Maudet *et al.*, 2002). Moreover, the main drawback of this approach is that it cannot be used to assign the breed of origin for products constituted by mixtures of several/many animals, like most dairy products are. The deterministic approach, as relies on the identification of markers that are present or absent in all (or most) animals of a particular breed, can be applied to mixture of products obtained from more animals. Useful markers for this approach can be identified looking at mutations in genes affecting the main traits that differentiate the breeds.

Since the constitution of the first modern cattle breeds that dates back to the 1700's - 1800's, coat colour has been usually considered as an aid to breed identification. Therefore registration of the animals to the herd-books required, and usually still requires, a specific coat colour and colour distribution pattern typical of that particular breed. These rules resulted more or less in the fixation of distinctive coat colours in most of the European cattle breeds. Classical genetic studies established that this trait is influenced by several genes that in some cases have been identified at the molecular level (reviewed in Olson, 1999). Thus, mainly as a consequence of human selection

undergone during the constitution of the breed, mutations in some of these genes may result as diagnostic tools that could be used to attribute or exclude an animal to a particular cattle breed and then may also be useful to trace their dairy or meat products (Chung *et al.*, 2000; Maudet and Taberlet, 2002; Carrión *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2004; Russo and Fontanesi, 2004).

Pigmentation in cattle, and in general in all mammals, is determined by the presence or absence of melanins in the hair (Searle, 1968). The melanins (eumelanin and phaeomelanin) are produced in specialized cells, the melanocytes, and are accumulated in the melanosomes that migrates by exocytosis to the hair during its growth. The relative amounts of black/brown (eumelanin) and red/yellow (phaeomelanin) pigments produced in melanocytes are controlled primarily by two loci, *Extension* and *Agouti*. The *Extension* (*E*) locus codes for the melanocyte stimulating hormone receptor (MSHR) or melanocortin 1 receptor (*MC1R*) that is expressed in melanocytes (Robbins *et al.*, 1993). *MC1R* is a member of the superfamily of G-protein-coupled receptors consisting of seven transmembrane domains whose action on eumelanin synthesis is mediated, upon binding of the  $\alpha$ -MSH and ACTH peptides, through the activation of adenylyl cyclase to elevate cAMP levels in melanocytes, that in turn affect tyrosinase activity (Mountjoy *et al.*, 1992). Classical genetic studies have indicated that dominant alleles at the *Extension* locus are associated with black coat colour while recessive alleles at this locus produce red/yellow coat colours (Searle, 1968). Several mutations of the *MC1R* gene have been described in mouse (Robbins *et al.*, 1993), human (Valverde *et al.*, 1995) and in different farm mammals, like cattle (Klungland *et al.*, 1995), sheep (Våge *et al.*, 1999), pig (Kijas *et al.*, 1998), horse (Marklund *et al.*, 1996) and rabbit (Fontanesi *et al.*, 2006). Some of them cause a constitutive activation of the *MC1R* protein dependent signaling pathway inducing eumelanin synthesis (black coat colour) while others cause a loss of function of the coded protein and induce phaeomelanin production (red/yellow coat colour). In cattle, the first molecular genetic studies identified three main alleles associated with coat colour at the *Extension* locus (Klungland *et al.*, 1995; Joerg *et al.*, 1996):  $E^+$ , the wild type allele that produces a variety of colours depending on the *Agouti* locus (Adalsteinsson *et al.*, 1995);  $E^D$ , the dominant allele, caused by a T>C missense mutation in the *MC1R* coding region determining an activation of the encoded receptor, that, in turn, gives black coat colour;  $e$ , the recessive allele caused by a single nucleotide deletion in the *MC1R* coding region that produces a non functional prematurely terminated receptor and that, in homozygous animals, yields red/yellow coat colour. Then, another allele ( $E^I$ ), determined by a duplication of 12 bp that subsequently causes a duplication of four amino acids in the third intracellular loop of the *MC1R* protein, was reported (Kriegesmann *et al.*, 2001; Rouzaud *et al.*, 2001; Maudet and Taberlet, 2002). Its effect on coat colour is not yet completely clarified. Other two alleles, indicated as  $E^{Dl}$  and  $e^f$  have been identified and their activity partially

characterized *in vitro* (Graphodatskaya *et al.*, 2002; Maudet and Taberlet, 2002). Moreover, other mutations have been reported in different breeds (Kriegesmann *et al.*, 2001; Maudet and Taberlet, 2002; GenBank acc. no. AF547663, Heaton *et al.*, 2003, unpublished), whose specific effect on coat colour has not been investigated yet.

As a first step to identify breed specific DNA markers that can be used for the traceability of dairy cattle products, like some typical and traditional Italian mono-breed cheeses, we investigated the presence and distribution of some alleles at the *MC1R* locus in several cattle breeds that show different coat colours and patterns. Moreover, we set up a protocol to investigate admixture of milk of different breeds in dairy products focusing this procedure mainly for the traceability and authentication of Parmigiano Reggiano cheese of only Reggiana breed.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Hair, milk or semen samples were collected from a total of 1082 cows and 278 sires of 18 different breeds (Table 1). More than 70 animals were analysed for seven dairy or dual purpose breeds (Italian Holstein-Friesian, Italian Brown, Italian Simmental, Jersey, Reggiana, Modenese and Rendena) for a total of 1272 analysed samples. These seven breeds will be indicated henceforth as group 1. The remaining 88 animals were analysed to obtain a first preliminary evaluation or, in some cases, to confirm the variability at the *MC1R* gene in other 11 breeds, including some traditional beef breeds. These animals will be indicated henceforth as group 2.

Cows of Italian Holstein Friesian, Italian Brown, Italian Simmental, Reggiana, Modenese, Rendena and Jersey were sampled in 17, 20, 7, 8, 4, 3 and 1 farms located in the North of Italy, respectively. Grigio Alpina, Valdostana, Pezzata Rossa d'Oropa, Piemontese, Romagnola, Marchigiana, Chianina, Swedish Red and White, Danish Red, Salers and Charoleis samples were collected during fair expositions in the North of Italy or in a few farms. Semen was provided by several artificial insemination centres.

### *Dairy products*

Several products and cheese samples were collected. Some were only Reggiana milk derived products and were directly obtained from the producers. The mono-breed dairy products were the following: two milk pools of only Reggiana collected from Parmigiano Reggiano cheese vats, two

whey samples collected from the same cheese vats, three samples of fresh Parmigiano Reggiano cheese (1-2 days old) obtained from only Reggiana and 10 Parmigiano Reggiano cheese samples of 24 to 30 months obtained from only Reggiana. Other 15 Parmigiano Reggiano cheese samples (10-30 months old), not labelled as mono-breed products, purchased in retailer markets in the North of Italy, were considered as obtained by undefined animals without breed limitation.

#### *DNA extraction*

DNA extraction from hair roots was performed according to Healy et al. (1995). DNA was extracted from individual milk samples as described by Davoli et al. (1998) or using the Milk Extraction Kit (Nurex, Italy) and from semen using a Chelex 100 protocol (Walsh et al., 1991).

For the listed dairy products DNA was extracted using commercial kits designed for blood (QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen) or food (Nucleo Spin Food, Macherey-Nagel, Düren, Germany). About 1-2 g of cheese was homogenized in a 15 ml tube. Then, 4 ml of bidistilled water and 200  $\mu$ l of a 20 mg/ml proteinase K solution were added. This mix was vortexed and placed overnight in a rocking oven at 60°C. Then, about 2 ml (QIAamp DNA Blood Midi Kit) or 200  $\mu$ l (Nucleo Spin Food) of this mix was used for DNA extraction according to the manufacturer's protocols. The Macherey-Nagel kit was not used to extract DNA from cheese older than 20 month. For milk and whey pools, 2 ml have been directly used for DNA extraction using the QIAamp DNA Blood Midi Kit, without previous proteinase-K overnight treatment.

#### *PCR, analysis of mutations in individual samples and in dairy products and sequencing*

PCR primers, designed on the bovine gene sequence (EMBL acc. no. S71017; Vanetti et al., 1994), were used to amplify *MC1R* gene fragments (Table 2). PCR was performed using a PT-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA) or a Perkin Elmer 9600 (Applied Biosystems) thermal cycler in a volume of 20  $\mu$ l containing the DNA template (about 10-100 ng), 1 U DNA EuroTaq DNA polymerase (EuroClone Ltd., Paington, Devon, UK), 1X PCR Buffer, 2.5 mM dNTPs, 10 pmol of each primer and 1.0-2.0 mM of MgCl<sub>2</sub>. PCR profile for the analysis of individual samples was as follows: 5 min at 95°C; 35 amplification cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at the specific annealing temperature for each primer pair (Table 2), 30 sec at 72°C; 10 min at 72°C. PCR of the template DNA extracted from cheese samples was carried out with 40 amplification cycles.

These PCR fragments obtained with primer pair 1 were analysed by means of a restriction fragment length polymorphism (RFLP) approach using *MspI* (recognition sequence CCGG) and *SsiI*

(recognition sequence CCGC) to distinguish allele *e* from the other alleles and allele  $E^D$  from the other alleles, respectively (Fig. 1 a and b). A PCR-amplified product length polymorphism protocol (PCR-APLP) was set up to analyse the *MC1R* region that contains the 12 bp insertion (primer pair 2) that differentiates allele  $E^I$  from the other alleles (Fig. 1c). Sequencing was performed using the Big Dye v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on the PCR products obtained using primer pair 3 (Table 2) to amplify genomic DNA of two Italian Holstein Friesian and two Reggiana sires or using primer pair 2 to amplify genomic DNA of two Italian Brown cows. The genotyping protocols used in the present study have been confirmed by sequencing parts of the single exon *MC1R* gene encompassing the investigated mutations in cattle with different genotypes.

#### *Analysis of the sensitivity of the PCR-RFLP and PCR-APLP protocols*

In order to have a first rough estimation of the sensitivity of the PCR-RFLP (*MspI* digestion) allele detection method in dairy products we adapted and combined the methods described by Breem et al. (2000) and Maudet and Taberlet (2001). Several mixtures of DNA including different proportions of  $E^D/E^D$  Holstein DNA (1, 2, 5, 10, 25, 50 and 100%) in *e/e* Reggiana DNA were prepared. DNA concentration was evaluated using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). Restriction analysed fragments were electrophoresed and ethidium bromide stained bands were captured using a Kodak EDAS 290 instrument (Eastman Kodak Company, Scientific Imaging Systems, Rochester, NY, USA). Band peak intensity and band net intensity were obtained using the Kodak 1D image analysis software (Eastman Kodak Company). The relative intensity (RI) was calculated as the averaged ratio of the band peak intensity and band net intensity obtained for the 118 bp and 137 bp fragments..

## **RESULTS AND DISCUSSION**

#### *Analysis of the MC1R mutations in several cattle breeds*

The combination of the PCR-RFLP and PCR-APLP analyses (Fig. 1a, b and c) made it possible to distinguish the four main alleles at the bovine *MC1R* locus: i) allele  $E^D$  causing black coat colour; ii) allele *e*, causing red coat colour; iii) allele  $E^I$  caused by a 12 bp insertion; iv) the wild type allele  $E^+$ , that actually is not possible, using these genotyping methods, to distinguish from other less characterized alleles reported by several authors, thus henceforth it will be indicated as allele *E*. Allele and genotype frequencies obtained in the analysed animals are reported in Table 1. Among

the breeds of group 1, allele  $E^D$  was identified only in the Italian Holstein Friesian (0.886) while in the group 2 it was observed only in the sampled Black Pied Valdostana cow. Considering group 1, allele  $E$  was observed with high frequency in the Italian Brown (0.591), Rendena (0.738), Jersey (0.955) and Modenese (0.961), while with low frequency in Italian Simmental (0.029). In group 2, this allele was identified in the Red Swedish, Red Danish, Grigio Alpina, Piemontese, Romagnola, Marchigiana and Chianina breeds. Allele  $E^I$  was observed in Italian Brown (0.377) and Rendena (0.250) and, among the breeds of group 2, in Grigio Alpina, Piemontese, Swedish Red and White and Danish Red. Allele  $e$  was fixed in Reggiana (breed characterized by solid red coat colour) and almost fixed in Italian Simmental (0.971). This allele was observed also in all other investigated breeds of group 1, even with low frequency. In breeds of group 2, the recessive  $e$  allele was identified in Valdostana, Pezzata Rossa d'Oropa, Piemontese, Romagnola, Swedish Red and White, Danish Red, Charoleis and Salers.

Other investigators have studied this locus in some of the breeds included in the present work thus it is possible to compare their results with what is reported in Table 1. For some of these breeds (Italian Holstein-Friesian, Italian Brown, Italian Simmental, Rendena and Jersey) our report included a much larger number of animals compared to the previous studies. For other breeds (Reggiana and Modenese, among group 1, and Grigio Alpina, Swedish Red and White and Danish Red, among group 2), the present study is the first report.

The presence of allele  $E^D$  only in black breeds (Italian Holstein-Friesian and Black Pied Valdostana) was expected and confirms the results of previous studies (Joerg et al., 1996; Rouzaud et al., 2000; Maudet and Taberlet, 2002; Crepaldi et al., 2003; Rolando and Di Stasio, 2006). All black Holstein animals carried at least one copy of  $E^D$ . Moreover, it is also well known that allele  $e$  is present in the Italian Holstein-Friesian. Our study that, to our knowledge, is the largest investigation at this locus in this breed, obtained, considering only black animals (the red Italian Holstein-Friesians were purposely sampled, thus they were excluded from the allele frequency estimation), a frequency of the recessive  $e$  allele of about 8.5 %. If we assume Hardy-Weinberg equilibrium at this locus, homozygous  $e/e$  Italian Holstein-Friesian animals should be about 0.7 % in the Italian population.

A few Italian Brown and Rendena animals have been analysed by Crepaldi et al. (2005) who observed in these breeds only the presence of the  $E$  and  $E^I$  alleles. However, our study including a larger number of animals, reported the presence of allele  $e$  in both these breeds, even if with low frequency and only in heterozygous state. In the Italian Simmental Crepaldi et al. (2005) observed only allele  $e$  while in the present study we identified, unexpectedly, also few  $E/e$  and  $E/E$  cows (10 and 1, respectively). These animals were sampled in two different farms and for four of them it was possible to identify a common ancestor that unfortunately was not possible to sample. Thus, it could



be supposed that the Italian Simmental may not be completely fixed at the *MC1R* locus due to more or less remote crossing with other breeds. However, according to the used genotyping protocols it is not possible to exclude in the Italian Simmental breed the presence of allele  $e'$ , that is indistinguishable from other alleles apart from the three ( $E^D$ ,  $E^I$  and  $e$ ) directly genotyped. This allele should confers a similar red phenotype to the animals (Graphodatskaya et al., 2002).

In Jersey, despite what was reported by Berryere et al. (2003), we identified, even with low frequency (0.045), for the first time also allele  $e$ .

Among the breeds of group 2, it is worth reporting that we identified alleles  $e$  and  $E^I$  in the Piedmontese breed that was suggested to be only  $E^+/E^+$  by Rolando and Di Stasio (2006), and we confirmed the presence of allele  $e$  in the Romagnola and Chianina breeds according to what was already reported by others (Crepaldi et al., 2003; Maudet and Taberlet, 2002). Miming the allelic structure at the *MC1R* locus in these two Italian white beef breeds, allele  $e$  was observed also in another Italian white breed, Modenese, a local dairy breed. This presence may produce red animals if heterozygous sires are actively used causing problems for the registration to the herd book of animals without the characteristic coat colour (Associazione Italiana Allevatori, 2006). In the Romagnola breed this problem was solved starting a program aimed to eradicate allele  $e$  from the breed (Marilli et al., 2005). According to what we observed, a similar program may be useful in the Modenese breed considering also the potential applications for breed traceability when a breed is fixed for a particular allele.

Reggiana breed was deeply investigated at this locus. All active used sires were genotyped together with a large number of cows. According to our results, it is possible to say that Reggiana breed is fixed for allele  $e$ .

Other two typical red breeds, Danish Red and Swedish Red and White, were not fixed for the  $e$  allele as presented also alleles  $E$  and  $E^I$ . From one hand, this was unexpected considering that these breeds are recognized by their characteristic red coat colour and that a phenotypic survey suggested that all animals of these two breeds are  $e/e$  (Kantanen et al., 2000). From the other hand the heterogeneity at the *MC1R* locus could be predicted considering the fact that, during the 1970's, Brown Swiss breeding was introduced into the Danish Red bloodline and that, in the 1960's, Ayrshire blood was introgressed into Swedish Red and White lines (Mason, 1996).

The few animals that we have analysed for the Valdostana, Pezzata Rossa d'Oropa, Marchigiana, Charoleis and Salers confirm the results obtained for these breeds by other Authors (Rouzaud et al., 2000; Maudet and Taberlet, 2002; Crepaldi et al., 2003).

*Potential and limits of the MC1R locus for breed traceability*

Considering the allele and genotype frequencies obtained for the analysed breeds it is possible to note some differences that can be used, in theory, to identify or exclude, at least in some cases, the breed of origin of dairy products. For this purpose we have focused our attention mainly to the seven breeds included in group 1. For the other breeds only few animals have been genotyped, thus in deep investigations are necessary to assess the power of the *MC1R* gene for breed traceability in their cases.

Allele  $E^D$  makes it possible to distinguish black and white Holstein-Friesian milk from all other breeds as this allele is not present in non black animals confirming what was suggested by Maudet and Taberlet (2002). Allele  $E^I$ , that is present in Italian Brown and Rendena in which it is not fixed and even is not the most frequent, is only partially informative against breeds that do not have this allele. Namely, if this allele is evidenced it is possible to deduce that milk of cows of these breeds is present while if this allele is not detected it cannot be excluded the presence of Italian Brown or Rendena milk in the analysed dairy products. Reggiana breed, for which there is a very high interest in the possibility to trace its mono-breed Parmigiano Reggiano cheese, resulted fixed for allele  $e$ . This situation makes it possible to say that the *MC1R* locus is highly informative for this breed against breeds that carry other alleles or in which allele  $e$  is at very low frequency. Namely, using the *MC1R* locus it is possible to differentiate Parmigiano Reggiano cheese of Reggiana from cheese produced using milk of Italian Holstein-Friesian (black and white), Italian Brown, Rendena, Modenese and Jersey, breeds that all, except Rendena, are present in the geographic area of production of the Parmigiano Reggiano cheese. However, it should be pointed out that Italian Simmental and Reggiana products cannot be distinguished as the former breed has a very high frequency of allele  $e$ . Moreover, the low expected and actual frequency of red  $e/e$  Italian Holstein-Friesian cows in this breed makes it highly improbable, but still possible, the production of Parmigiano Reggiano cheese from milk of only cows with this genotype. Thus, only in these two cases it is not possible to exclude the use of milk of other breeds/type of animals (Italian Simmental and red Italian Holstein-Holtesin cows) for the production of Parmigiano Reggiano cheese of only Reggiana. On the other hand, as also some mono-breed cheeses in the north eastern part of Italy are produced only with Italian Simmental milk, similar considerations may be applied or deduced for this breed. In this case it is worth to consider that Reggiana cows are not present in the geographic region in which mono-breed cheeses are manufactured using only Italian Simmental milk.

However, as Reggiana (solid red) and Italian Simmental and red Italian Holstein-Friesian (red and white) differ by their coat colour pattern distribution, the identification of (a) genetic marker(s) that may distinguish nonspotted from spotted animals could solve the limit of the *MC1R* locus for

traceability of Parmigiano Reggiano cheese of only Reggiana. It remains to be solved the possibility to distinguish Italian Simmental from red Italian Holstein-Friesian dairy products.

From crossbreeding studies it was deduced that in spotted animals a recessive allele, *s*, is fixed at the Spotted locus and that other alleles at this locus ( $S^H$ ,  $S^P$  and  $S^+$  of the Hereford colour pattern, pinzgauer colour-sided pattern and nonspotted wild type, respectively) act as dominant suppressors of the spotted phenotype (Olson, 1999), even if other modifier genes may be involved in this phenotype. The Spotted locus was then mapped to bovine chromosome 6 in the region of the *v-KIT* Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (*KIT*) gene (Grosz and MacNeil, 1999) whose mutations, in other species (i.e.: Jackson, 1997), have been indicated to affect reduced or localized pigmentation. Moreover, a major QTL for the degree of spotting in Simmental and Holstein cattle was localized in the same position of chromosome 6, suggesting the presence of more than one recessive *s* allele at the Spotted locus (Reinsch et al., 1999). Thus, the *KIT* gene seems an obvious candidate to identify genetic markers that may be useful to distinguish spotted from nonspotted cattle. Nevertheless, a single nucleotide polymorphism (SNP) identified in intron 3 of this gene (Olsen et al., 2000) resulted not informative for this purpose (Maudet and Taberlet, 2002; our unpublished result). Further studies on the bovine *KIT* gene may provide more useful DNA markers.

#### *Application of MC1R gene polymorphisms for breed traceability and authentication of Parmigiano Reggiano cheese*

As milk contains a large number of somatic cells that, in turn, are included as components in the cheese and in other processed dairy products, the DNA that is present in these cells represents the trace of the milk producer animals (Lipkin et al., 1993). Thus, to use this animal trace, the first step is the extraction of the DNA. Several studies have already reported the possibility to extract and analyse DNA from cheese (i.e.: Branciani et al., 2000; Maudet and Taberlet, 2001; 2002).

In the present work we set up two different extraction protocols that, even if were based on kit originally designed for blood or general food, made it possible to obtain amplifiable DNA from all collected Parmigiano Reggiano cheese samples as well as from the milk and milk whey pools. Thus it was possible to isolate and amplify DNA from cheese cured for up to 30 months indicating that during such a long curing period the animal DNA is not completely destroyed.

Moreover, the use of *MC1R* gene polymorphisms to trace and evaluate the authenticity of mono-breed dairy products relies, other than on the possibility to extract and PCR amplify DNA from the mentioned dairy products, on the sensitivity of the mutation detection methods used to identify the

presence of different alleles in the amplified DNA. The evaluation of the sensitivity of the genotyping protocols was intended as the identification of the lower detection limit of possible contaminating DNA, namely DNA of not allowed breeds, in the analysed products. This issue was investigated using as PCR template mixtures of DNA including different proportions of DNA of animals with diverse *MC1R* genotype. The use of already extracted DNA instead of mixture of milk or purposely manufactured cheese containing known proportions of milk of animals with different *MC1R* genotype overcomes the problem due to the large variation on somatic cell count of different milk samples. The PCR-RFLP test was applied considering the possibility to identify the presence of alleles different from the allele *e* that is fixed in the Reggiana breed as, in this case, there is a direct interest in avoiding fraud in the production of Parmigiano Reggiano from milk of only this breed. Figure 2 reports the plotted RI as well as the captured gel picture of the two main DNA fragments (118 and 137 bp) for the analysed artificial constructed reference samples. The lower limit at which it was possible to identify the presence of different alleles other than the *e* allele was 5%. For the 1 and 2% reference samples it was not possible to detect the 118 bp fragment. Even if what was of interest was the identification of the lower limit of detection that shows if a dairy product derives from an admixture of milk of different breeds, the obtained “reference curve” can represent a rough semi-quantitative estimation of the level of mixture of DNA with different genotypes. Thus it could be used, with caution, to evaluate the level of admixture of milk in a dairy product. The parameters that might interfere with the accuracy of the methods may be i) the somatic cell count of individual milk samples, as already mentioned, that are affected by several factors, and that alters the contribution of the individual cow DNA to the milk pool from which the dairy products are obtained, and ii) the sensitivity of the mutation detection methods that in general give distorted estimations for alleles at lower concentration (Breem et al., 2000). The sensitivity of this method could be improved using alternative genotyping approaches. For example, Maudet and Taberlet (2002) detected the presence of 1% of Holstein’s milk in a milk curd using a competitive oligonucleotide priming PCR method together with the genotyping of fluorescently labelled reaction products in a sequencer.

The PCR-RFLP test that was applied on the 10 samples of long cured Parmigiano Reggiano cheese, the three samples of fresh Parmigiano Reggiano cheese and the samples of milk and milk whey pools of only Reggiana revealed, as expected, only the fragment corresponding to allele *e*. When this test was applied on Parmigiano Reggiano cheese of unknown breeds, only the fragment of 118 bp (alleles *E*, *E<sup>D</sup>* or *E<sup>I</sup>*), or two fragments of 118 (alleles *E*, *E<sup>D</sup>* or *E<sup>I</sup>*) and 138 bp (allele *e*), were identified showing that these cheeses were not produced using only Reggiana milk.

## CONCLUSIONS

The present study investigated for the first time polymorphisms of the *MC1R* gene in some cattle breeds and added new information on the population genetic structure at this locus for several other breeds. This information has been evaluated to implement a breed traceability strategy for some mono-breed products.

Even if the use of the *MC1R* polymorphisms alone cannot give a complete answer to the question that arises in a field application of cattle breed traceability of dairy products it was shown that this gene, considering the four analysed alleles and the genotype frequencies in the investigated breeds, it is use to exclude or assign, at least in some cases, the breed of origin of a product. The most favourable situation is for the Reggiana breed that presents only allele *e* at the *MC1R* locus. The genetic test that was used to analyse the animal trace in cheeses cured up to 30 months can represent a first deterrent against frauds and an important tool for the valorisation and authentication of Parmigiano Reggiano cheese obtained from only Reggiana milk.

This work was supported by Regione Emilia Romagna and Provincia of Reggio Emilia.

We thank M. Prandi, C. Villa (Associazione Nazionale Allevatori Bovini Razza Reggiana) and the farmers who helped and collaborated in this research.

## REFERENCES

*\*References are included starting at page 132*

**Table 1. Breeds, number of genotyped animals, allele and genotype frequencies. The breeds of group 1 are indicated in bold.**

<i>Breeds</i>	<i>N° of animals</i>	<i>Allele frequencies<sup>§</sup></i>				<i>Genotype frequencies (N° animals)</i>							
		<i>E<sup>D</sup></i>	<i>E</i>	<i>E<sup>I</sup></i>	<i>e</i>	<i>E<sup>D</sup>/E<sup>D</sup></i>	<i>E<sup>D</sup>/e</i>	<i>E/E</i>	<i>E/E<sup>I</sup></i>	<i>E/e</i>	<i>E<sup>I</sup>/E<sup>I</sup></i>	<i>E<sup>I</sup>/e</i>	<i>e/e</i>
<b>Italian</b>													
<b>Holstein-Friesian</b>	261 (86+175)	0.890	-	-	0.110	0.805 (210)	0.157 (43)	-	-	-	-	-	0.038 (8)*
<b>Italian Brown</b>	248 (6+242)	-	0.591	0.377	0.032	-	-	0.343 (85)	0.472 (117)	0.024 (6)	0.121 (30)	0.040 (10)	-
<b>Italian Simmental</b>	208 (0+208)	-	0.029	-	0.971	-	-	0.005 (1)	-	0.048 (10)	-	-	0.947 (197)
<b>Jersey</b>	100 (2+98)	-	0.955	-	0.045	-	-	0.910 (91)	-	0.09 (9)	-	-	-
<b>Rendena</b>	82 (0+82)	-	0.738	0.250	0.012	-	-	0.512 (42)	0.427 (35)	0.024 (2)	0.037 (3)	-	-
<b>Reggiana</b>	297 (124+173)	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-	-	1.00 (297)
<b>Modenese</b>	76 (21+55)	-	0.961	-	0.039	-	-	0.921 (70)	-	0.079 (6)	-	-	-
<i>Grigio Alpina</i>	6 (0+6)	-	0.750	0.250	-	-	-	0.500 (3)	0.500 (3)	-	-	-	-
<i>Valdostana**</i>	6 (0+6)	0.167	0.083	0.083	0.667	0.167 (1)	-	-	0.167 (1)	-	-	-	0.668 (4)
<i>Pezzata Rossa d'Oropa</i>	2 (0+2)	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-	-	1.00 (2)
<i>Piedmontese</i>	6 (2+4)	-	0.834	0.083	0.083	-	-	0.833 (5)	-	-	-	0.167 (1)	-
<i>Chianina</i>	7 (4+3)	-	0.857	-	0.143	-	-	0.714 (5)	-	0.286 (2)	-	-	-
<i>Romagnola</i>	15 (13+2)	-	0.933	-	0.067	-	-	0.867 (13)	-	0.133 (2)	-	-	-
<i>Marchigiana</i>	4 (1+3)	-	1.00	-	-	-	-	1.00 (4)	-	-	-	-	-
<i>Swedish Red and White</i>	18 (1+17)	-	0.583	-	-	0.417	-	0.278 (5)	-	0.611 (11)	-	-	0.111 (2)
<i>Danish Red</i>	6 (0+6)	-	0.667	0.083	0.250	-	-	0.333 (2)	0.167 (1)	0.500 (3)	-	-	-
<i>Charoleis</i>	11 (11+0)	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-	-	1.00 (11)
<i>Salers</i>	7 (7+0)	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-	-	1.00 (7)
<b>Total</b>	<b>1360 (278+1082)</b>												

<sup>§</sup> As the used genotyping protocol cannot distinguish allele *E<sup>+</sup>* from other less characterized alleles reported by several authors, we used *E* to consider all alleles except *E<sup>D</sup>*, *E<sup>I</sup>* and *e*.

\* Eight red Italian Holstein-Friesian cows were purposely sampled.

\*\* Of the 6 sampled Valdostana cows, 4 were red pied, one was black pied and 1 was solid brown.



**Table 2. PCR analyses.**

<i>Primer pair name</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>	<i>Annealing temp. (°C)</i>	<i>PCR products (bp)</i>	<i>Use</i>
<i>Pair 1</i>	CAAGAACCGCAACCTGCACT <sup>§</sup>	GCCTGGGTGGCCAGGACA <sup>§</sup>	65	137/138*	PCR-RFLP ( <i>MspI/SsiI</i> )
<i>Pair 2</i>	AGTGCCTGGAGGTGTCCATCC	CAGCAGGATGGTGAGGTTG	63	243/255**	PCR-APLP and Sequencing
<i>Pair 3</i>	AGTGCCTGGAGGTGTCCATCC	GAAGTTCTTGAAGATGCAGCC	60	740***	Sequencing

<sup>§</sup> Primer sequences from Klungland *et al.* (1995)

\* Allele *e* that is caused by 1 single nucleotide deletion results in a fragment of 137 bp.

\*\* A fragment of 12 bp differs allele *E<sup>l</sup>* from the other *MC1R* alleles.

\*\*\* The length of the wild type sequence was considered.

Figure 1: A) PCR-RFLP analysis with *MspI* and B) with *SsiI*. C) PCR-APLP analysis. The genotypes are indicated at the top of each lane. In A) as the analysis cannot distinguish alleles  $E^D$ ,  $E$  and  $E^I$ , the fragment of 118 bp was indicated with  $E^+$ . The fragment of 20 bp, resulting from the digestion of the 138 bp fragment of the  $E^D$ ,  $E$  or  $E^I$  alleles is not shown in the gel. In B) as the analysis cannot distinguish alleles  $E$  (130 bp),  $E^I$  (130 bp) and  $e$  (129 bp), the gel band of 129/130 bp was indicated with  $E^+$ . Differences of 1 bp are undistinguishable in the gel. The fragment of 33 bp, resulting from the digestion of the 130 bp fragment of the  $E^D$  allele, as well as the fragment of 8 bp, due to the presence of a *SsiI* restriction site in the forward primer, are not shown in the gel. In C) as the analysis cannot distinguish alleles  $E^D$ ,  $E$  and  $e$ , the fragment of 243 bp was indicated with  $E^+$ . M = DNA molecular weight VIII (Roche Diagnostics).

A)

M  $E/E$   $e/e$   $e/e$   $e/e$   $E/E$   $E/E$   $E/E$   $E/E$   $E/E$   $E/E$   $E/e$   $E/E$   $E/e$   $E/E$



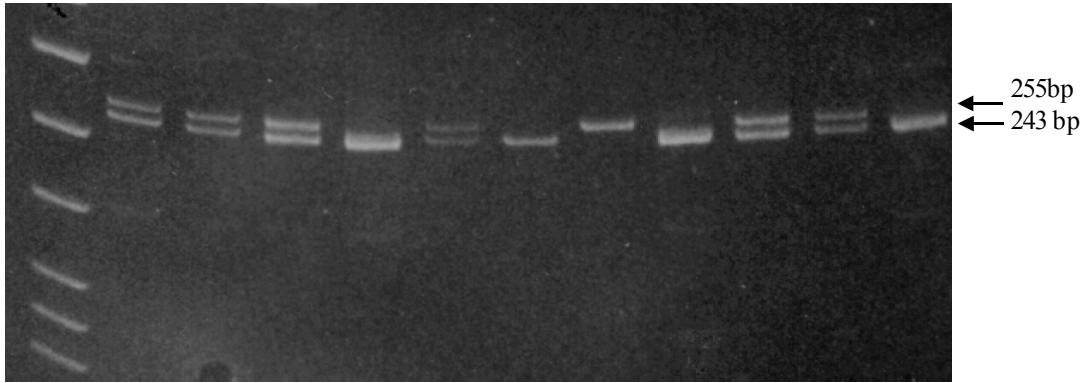
B)

M  $E^+/E^+$   $E^D/E^D$   $E^+/E^+$   $E^+/E^+$   $E^D/E^+$   $E^D/E^+$   $E^D/E^+$   $E^+/E^+$   $E^D/E^D$



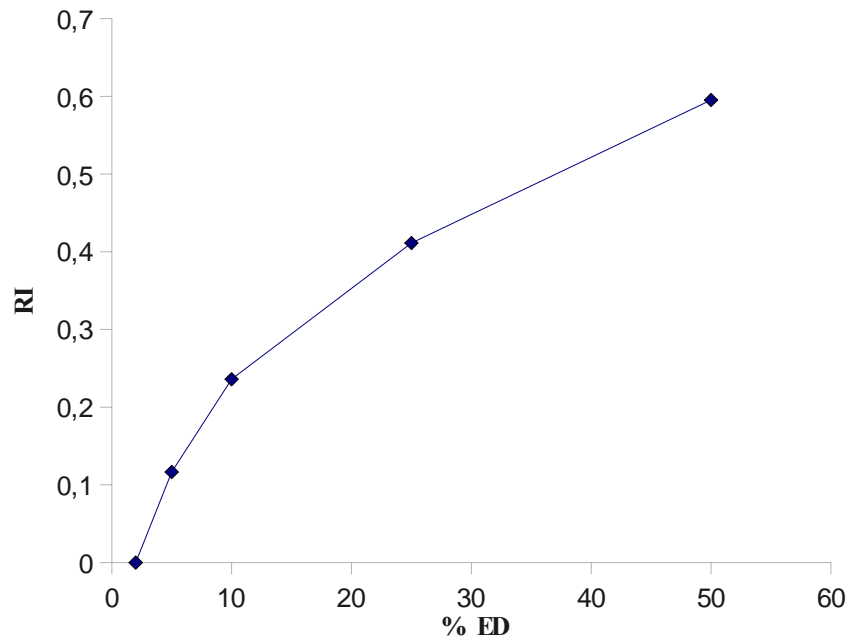
C)

M *E<sup>1</sup>/E<sup>+</sup>* *E<sup>1</sup>/E<sup>+</sup>* *E<sup>1</sup>/E<sup>+</sup>* *E<sup>+</sup>/E<sup>+</sup>* *E<sup>1</sup>/E<sup>+</sup>* *E<sup>+</sup>/E<sup>+</sup>* *E<sup>1</sup>/E<sup>1</sup>* *E<sup>+</sup>/E<sup>+</sup>* *E<sup>1</sup>/E<sup>+</sup>* *E<sup>1</sup>/E<sup>+</sup>* *E<sup>+</sup>/E<sup>+</sup>*

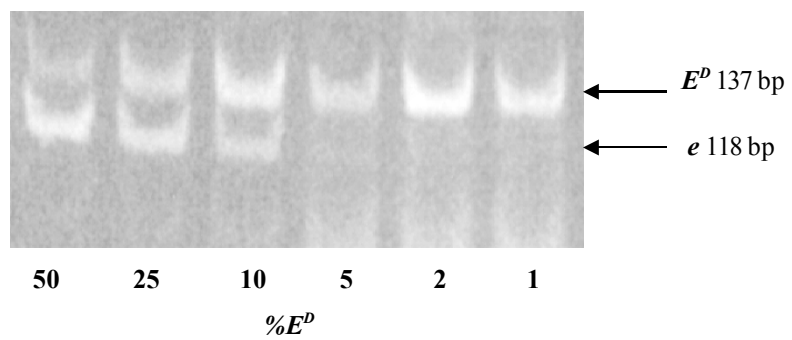


**Figure 2: A) RI curve obtained for the PCR-RFLP (*MspI*) analysis of artificial constructed reference DNA samples containing different concentrations of contaminating DNA of  $E^D/E^D$  animals. B) A PCR-RFLP (*MspI*) gel analysis of artificial constructed reference DNA samples used for the construction of the “reference curve”.**

**A)**



**B)**



# IDENTIFICATION OF MUTATIONS IN THE BOVINE *KIT* GENE, A CANDIDATE FOR THE SPOTTED LOCUS IN CATTLE

M. Tazzoli<sup>1,2</sup>, J. E. Beever<sup>2</sup>, L. Fontanesi<sup>1</sup>, V. Russo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università di Bologna, Italy

<sup>2</sup>Department of Animal Sciences, University of Illinois, USA

*Corresponding author:* Luca Fontanesi. Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Sezione di Allevamenti Zootecnici. Via F.lli Rosselli 107, 42100 Reggio Emilia, Italy – Tel. +39 0522 290516 – Fax: +39 0522 290523 – Email: luca.fontanesi@unibo.it

## ABSTRACT

In mammals, abnormal migration of melanoblasts from the neural crest during embryonic development may be the reason of the piebaldism phenotype that is a mixture of pigmented and unpigmented areas in the coat. Several cattle breeds, like for example Holstein, show the piebald spotted coat colour phenotype, that, according to crossbreeding studies, is due to a recessive allele (*s*), member of the allele series of the *Spotted* (*S*) locus. Dominant alleles at this locus act as suppressors of the spotted pattern and produce uniformly pigmented animals while others determine the colour-sided pattern known, for example, in the Hereford breed. The bovine v-*KIT* Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene (*KIT*) gene was localized in the region of chromosome 6 where the *Spotted* locus was mapped. *KIT* plays a major role during the embryonic development in directing the migration of the melanoblasts from the neural crest. Mutations in this gene cause different coat colour patterns in mouse and human. In pigs, the *KIT* gene is responsible for variations at the *White* (*I*) locus. Thus, this gene can be considered a strong candidate for the *Spotted* locus in cattle. With the final aim to identify DNA markers associated to different coat colour pattern distributions that could eventually be used as markers for breed traceability of dairy and beef products, we sequenced the 21 bovine *KIT* exons in cattle breeds showing different coat colour patterns. PCR primers were designed on available bovine *KIT* genomic sequence in order to

amplify all coding exons and parts of the intronic regions using DNA extracted from 8 animals of either Holstein, Hereford and Angus breeds. Sequencing revealed 75 mutations including 72 single nucleotide polymorphisms and 3 indels of one, three and five bp, respectively. These mutations were organized in a few haplotypes that were not observed in all studied breeds. Further investigations are in progress to evaluate the association of the identified polymorphic sites with coat colour patterns in beef and dairy cattle breeds.

## INTRODUCTION

From crossbreeding studies it was deduced that in spotted animals a recessive allele, *s*, is fixed at the Spotted locus and that other alleles at this locus ( $S^H$ ,  $S^P$  and  $S^+$  of the Hereford colour pattern, Pinzgauer colour-sided pattern and nonspotted wild type, respectively) act as dominant suppressors of the spotted phenotype (Olson, 1999), even if other modifier genes may be involved in this phenotype. The Spotted locus was then mapped to bovine chromosome 6 in the region of the *v-KIT* Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (*KIT*) gene (Grosz and MacNeil, 1999) whose mutations, in other species (i.e.: Jackson, 1997), have been indicated to affect reduced or localized pigmentation. Moreover, a major QTL for the degree of spotting in Simmental and Holstein cattle was localized in the same position of chromosome 6, suggesting the presence of more than one recessive *s* allele at the Spotted locus (Reinsch et al., 1999). Thus, the *KIT* gene seems an obvious candidate to identify genetic markers that may be useful to distinguish spotted from nonspotted cattle. Nevertheless, a single nucleotide polymorphism (SNP) identified in intron 3 of this gene (Olsen et al., 2000) resulted not informative for this purpose (Maudet and Taberlet, 2002).

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Hair, milk, blood and semen samples were collected from a total of 32 cows and bull belonging to three cattle breeds showing different coat colour patterns: 8 Holstein-Friesian, 8 Aberdeen Angus and 8 Hereford (Table 1), and DNA was extracted using standard protocols.



### *PCR and sequencing analysis of mutations.*

The PCR reaction was performed using primers designed on the bovine *KIT* gene sequences available in the Ensembl database and derived from the assembling of the bovine genome sequencing.

PCR primers, designed on the bovine gene sequence, were used to amplify *KIT* gene fragments (Table 2). PCR was performed using a PTC-225 (MJ Research, Watertown, MA, USA) thermal cycler in a volume of 10 $\mu$ l containing the DNA template (about 10-100 ng), 1 U DNA SigmaTaq DNA polymerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1X PCR Buffer, 2.5 mM dNTPs, 10 pmol of each primer and 1.0-2.0 mM of MgCl<sub>2</sub>. PCR profile for the analysis of individual samples was as follows: 5 min at 95°C; 27 amplification cycles of 45 sec at 94°C, 60 sec at the specific annealing temperature for each primer pair (Table 2), 75 sec at 72°C; 5 min at 72°C.

These PCR fragments obtained were analysed by ABI3730 DNA analyzer. Sequencing was performed using the Big Dye v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on the PCR products obtained using primer pair described in Table 2 to amplify genomic DNA of 32 animals ( 8 Holstein-Friesian, 8 Aberdeen Angus and 8 Hereford).

The sequences obtained were aligned compared using Codon Code Aligner software.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### *Analysis of the KIT mutations in the three breeds studied.*

Sequencing of the 21 *KIT* exons (including parts of the intronic regions) revealed on the whole 75 mutations of which 72 single nucleotide polymorphisms and 3 indels of one, three and five bp, respectively. An example of an identified SNP is shown in the Figure 1.

## **CONCLUSIONS**

The present preliminary study investigated for the coding sequence, and part of no-coding

sequence, of the KIT gene in some bovine breeds. the identified mutations were organized in a few haplotypes that were not observed in all studied breeds.

We did not found a breed-specific mutation for a KIT locus, Further investigations are in progress to evaluate the association of the identified polymorphic sites with coat colour patterns in beef and dairy cattle breeds.

## **REFERENCES**

*\*References are included starting at page 132*

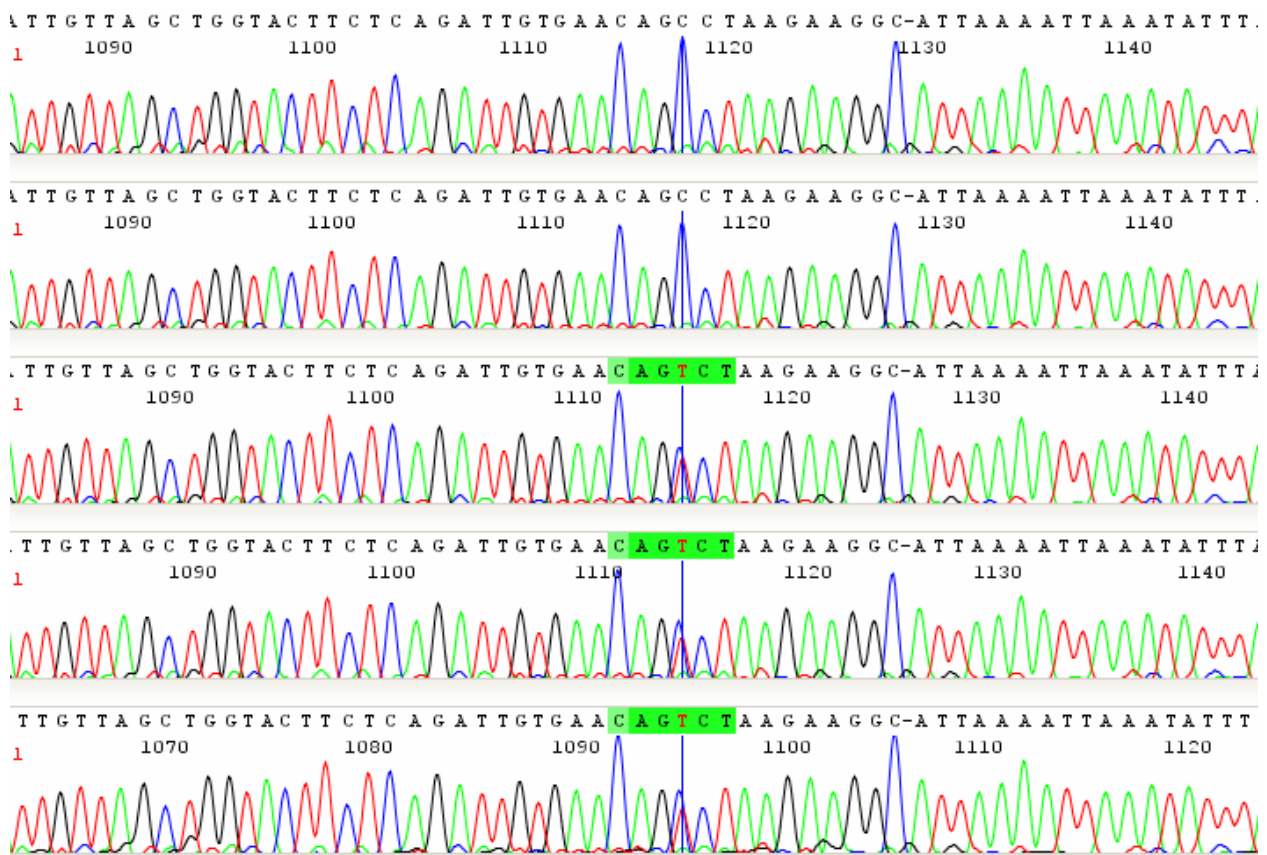
**Table 1. Breeds, number of animals,**

<i>Breeds</i>	<i>Number</i>
Holstein-Friesian	8
Aberdeen Angus	8
Hereford	8
<b><i>Total</i></b>	<b>32</b>

**Table 2. PCR analyses.**

<i>Prime r pair name</i>	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>	<i>Annealing temp. (°C)</i>	<i>Exon/s</i>	<i>PCR products (bp)</i>
<i>Kit 1</i>	GAGGAGCAGGTGCAGAAACT	CTGAAAGACTCGCAGCTCAG	58	1	970
<i>Kit 2</i>	GCAAATCTCCGTAGGCATTAGG	GATGCATAGTGGCTTCGGGTAT	60	2	1094
<i>Kit 3</i>	GAATAAAGTCGGCAGCCATTTG	ACCAGTGGGCATTTAGCTATTG	60	3	1140
<i>Kit 4</i>	GGGAAGCCTTACACTGTTTGAA	AGTGCGTTGAGATGCGTATTTT	60	4	1161
<i>Kit 5</i>	TGATAGGATGCAGGTATGCTGA	TGTAGTCACTTGGCAGCAGAAA	58	5	1018
<i>Kit 6</i>	TAATATGCATCAGGACTAGTAGGT	GCTCCCTGAGTCTTCATCATT	52	6	1161
<i>Kit 7</i>	TCTGCTTTGAGACACCTTGA	ACGCAGTATTCATCAGCTCA	58	7	994
<i>Kit 8</i>	GAACCCTGGAATCCTGATTAGA	TGTCCTTTTCGCATTACCTGAAG	56	8	1052
<i>Kit 9</i>	GAGTTGTAGACATTCGCTGAGA	ATGAATGACTAGCTCTCCCACA	54	9	1582
<i>Kit 10</i>	GCAAAGTTCACCTCAGATGTCAC	GAATGTCTCATCTCCTCCAGAA	58	10-11-12-13	1569 bp
<i>Kit 11</i>	AGATCCACGGTCAAGTTGACAG	CTTACCGTGGTTCTTTCTGTG	58	14	1196 bp
<i>Kit 12</i>	GCCATCTAATTCCTAGGGATTG	CTTAGGAAACCAGGCTAACAGA	58	15-16	1438 bp
<i>Kit 13</i>	GAAACCAGGCTAACAGAATAGG	TACTTTCTGATGACAGCATGCG	54	17	1476 bp
<i>Kit 14</i>	GGTGATCCACTTATTTGAGAGG	ACCGTAGAGAATGAAGAGTTGC	58	18-19-20	1647 bp
<i>Kit 15</i>	CAAGTGCCTGGTTCTCAATGGA	CGACCAGCTTCAGAATGTCATC	60	21 (Part 1)	1076 bp
<i>Kit 16</i>	GTGCTTCTGACCTGGTTTCTA	AGTGCATTCACCCTGACATTAG	56	21 (Part 2)	1325 bp

**Figure 1: Sequencing of the 21 *KIT* exons (including parts of the intronic regions) revealed on the whole 75 mutations of which 72 single nucleotide polymorphisms and 3 indels of one, three and five bp, respectively. An example of an identified SNP is shown in the figure.**



# GENETIC CHARACTERIZATION OF CINTA SENESE PIG BREED: ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN FOUR GENES AFFECTING PERFORMANCE AND PHENOTYPIC TRAITS

L. Fontanesi<sup>1</sup>, R. Bozzi<sup>2</sup>, M. Tazzoli<sup>1</sup>, A. Crovetto<sup>2</sup>, R. Davoli<sup>1</sup>, O. Franci<sup>2</sup>, V. Russo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Facoltà di Agraria, University of Bologna, Via F.lli Rosselli 107, 42100 Reggio Emilia, Italy

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Zootecniche, Facoltà di Agraria, University of Florence, Viale delle Cascine 5, 50144 Firenze, Italy

## SUMMARY

We analysed 66 Cinta Senese pigs for polymorphisms at two coat colour genes (*MC1R* and *KIT*) and showed that, these loci can be useful for the traceability of meat products of this breed. Moreover, in this breed we identified the presence of the *1843T* allele (~0.04) at the *RYRI* locus and observed the presence of the *B* allele (~0.07) at the *ESR* locus. The information can be used in selection plans aimed to improve the performances of this local pig breed.

**Keywords:** Cinta Senese, Pig, Polymorphisms, Coat colour, Meat quality.

## INTRODUCTION

Cinta Senese (CS) is a white belted pig breed originated in the Montagnola uplands near Siena, in Tuscany, Italy. Its presence is well documented in several old paintings since the 14<sup>th</sup> century. This breed has suffered a severe bottleneck in the 1980s and passed from 160,000 heads in 1950s to 81 sows and 3 boars in 1986. During the 1990s the population size increased reaching in 2003 the number of 886 sows and 201 boars spread in 188 herds. In 1996, a genetic management programme started and a reduction of the inbreeding level of the animals (from 0.21 in 1995 to 0.15 in 2003) was obtained. The breed is well known for the production of high quality meat, has a high degree of rusticity and it is well adapted to outdoors rearing with pasture on woods of chestnuts and acorn. In comparison to selected breeds, CS is characterised by a poorer *in vita* performances and fatter carcasses. CS breed shows low reproductive performances ( $7.68 \pm 1.98$  litter size at birth and  $6.71 \pm$

2.12 litter size at weaning) in comparison to the improved breeds. In 1998, the national herd-book was started on the basis of recordings going back to the 1970s and Tuscany region promoted a five year research programme on the breed. Moreover, a request of Guarantee of Origins Protection (DOP; Regulations CEE 2081/92) has been presented to EU for CS meat products.

With the aim to identify molecular markers that could be used for the traceability and valorisation of the products obtained with this breed we investigated polymorphisms in two genes affecting coat colour, *MC1R* and *KIT* that are coded by the extension and dominant white/white belted loci, respectively. Moreover, we analysed mutations in two other genes affecting meat production, quality and stress resistance traits (*RYR1*) and reproductive parameters (*ESR*) with the final objective to use these data in selection plans aimed to improve the performances of this breed.

## MATERIALS AND METHODS

Hair or blood was sampled from a total of 66 CS animals. DNA was extracted and PCR amplified for two fragments (one of 196 bp and one of 154 bp) of the *MC1R* gene, for two products (a 175 bp fragment and a diagnostic product for the duplication) of the *KIT* gene, for a 134 bp fragment of the *RYR1* gene and for a 120 bp fragment of the *ESR* gene. The PCR products of the *MC1R* gene were digested with *Bsp*HI (for the 196 bp fragment), *Hha*I and *Bst*UI (for the 154 bp fragment) to distinguish the  $E^+$ ,  $E^{D1}$ ,  $E^{D2}/E^P$  (the genotyping methods used here cannot distinguish the  $E^{D2}$  allele from the  $E^P$  allele) and  $e$  alleles at the *extension* locus, the 175 bp products of the *KIT* gene were digested with *Nla*III to analyse the splice site mutation of intron 17 (*ssm*+, *ssm*-), the PCR fragment of the *RYR1* were digested with *Hha*I or *Cfo*I to analyse the C1843T mutation and the *ESR* amplicons were digested with *Pvu*II to differentiate the *A* and *B* alleles. The second product of the *KIT* gene is amplified only in animals carrying the duplication ( $d+$ ) reported by.

## RESULT AND DISCUSSION

At both coat colour loci, the breed was fixed. At the *MC1R* gene, the analysed animals showed only allele  $E^{D2}/E^P$ . At the *KIT* locus, the CS pigs did not show the presence of the splice site mutation of intron 17 (*ssm*-) and did not show the presence of the duplication breakpoint ( $d-$ ). Considering these data with what was reported for other breeds at these two loci it is possible to distinguish CS pigs

from Wild Boar ( $E^+$ ,  $ssm-$ ,  $d-$ ), Meishan and Large Black ( $E^{D1}$ ,  $ssm-$ ,  $d-$ ), Duroc ( $e$ ,  $ssm-$ ,  $d-$ ), Large White ( $E^p$ ,  $ssm+$ ,  $d+$ ) and Landrace ( $E^p$ ,  $ssm+$ ,  $d+$ ) pigs. However, using these data, it is not possible to distinguish CS animals from Hampshire ( $E^{D2}$ ,  $ssm-$ ,  $d-$ ) and, in some cases, from Pietrain ( $E^p$ ,  $ssm-$ ,  $d+$  or  $d-$ ) pigs. Thus, the information obtained at the two coat colour loci, if confirmed in a larger sample of animals, can be used to implement a first traceability protocol for the CS products.

At the *RYRI* locus, 5 animals were carriers of the *1843T* recessive allele, thus its frequency in the breed was  $\sim 0.04$  confirming what was reported by. This allele causes halothane sensitivity, porcine stress syndrome and PSE (pale, soft, exudative) meat and it will be important to eradicate it from the breed even if no indication of poor meat quality and stress sensitivity has been reported so far in CS. Genealogical data will be analysed in order, eventually, to identify if a blood line may be responsible for the diffusion of this negative allele.

A low level of variability was observed also at the *ESR* locus. Allele *A* was the most frequent ( $\sim 0.93$ ) and only 9 animals were heterozygous for the *B* allele. This allele, in other breeds, has been associated with an increased litter size and it will be interesting to evaluate if the same effects could be confirmed also in CS.

In conclusion, with this first study we obtained information that could be used for the protection and valorisation of CS products as well as for the implementation of selection plans avoiding the spreading of negative alleles. Other studies, including more genes, are needed to have more data on the genetic variability and the genetic potential of this breed.

## ACKNOWLEDGEMENTS

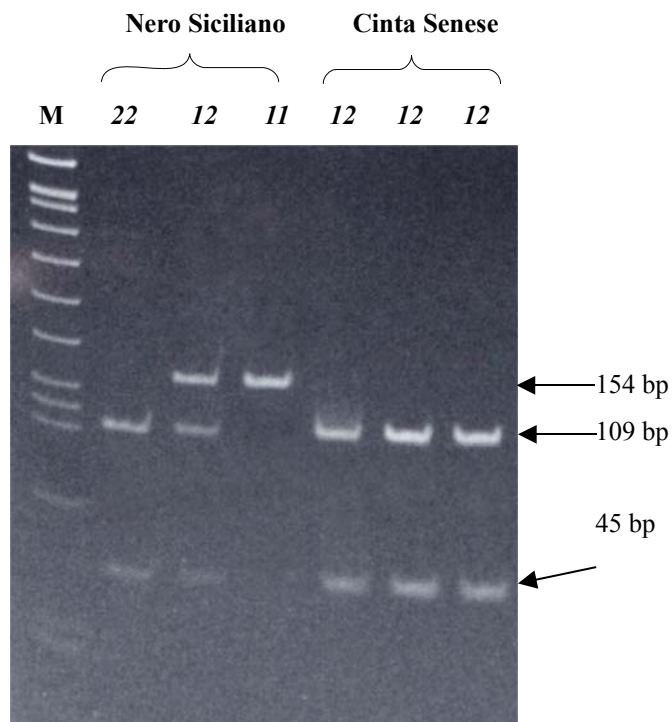
This work was supported by Siena Province and MIUR ex 60% funds.

## REFERENCES

*\*References are included starting at page 132*



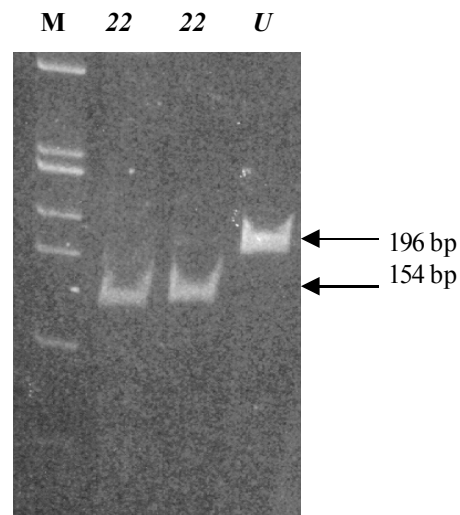
**Figure 1: PCR-RFLP analyses of the amplified DNA fragments of the *MC1R* gene restriction with *HhaI* of the 154 bp fragment. M = DNA Molecular Weight Marker.**



**Figure 2: PCR-RFLP analyses of the amplified DNA fragments of the *MC1R* gene restriction with *HhaI* of the 154 bp fragment. M = DNA Molecular Weight Marker; U = undigested PCR product. In some cases, pigs of other breeds were used to confirm the results of the genotyping protocols.**



**Figure 3: PCR-RFLP analyses of the amplified DNA fragments of the *MC1R* gene restriction with *Bsp*HI of the 196 bp fragment. M = DNA Molecular Weight Marker; U = undigested PCR product. In some cases, pigs of other breeds were used to confirm the results of the genotyping protocols.**



**Figure 4: PCR-RFLP analyses of the amplified DNA fragments of the analysis of the *KIT* gene restriction with *Nla*III of the 175 bp fragment; M = DNA Molecular Weight Marker.**

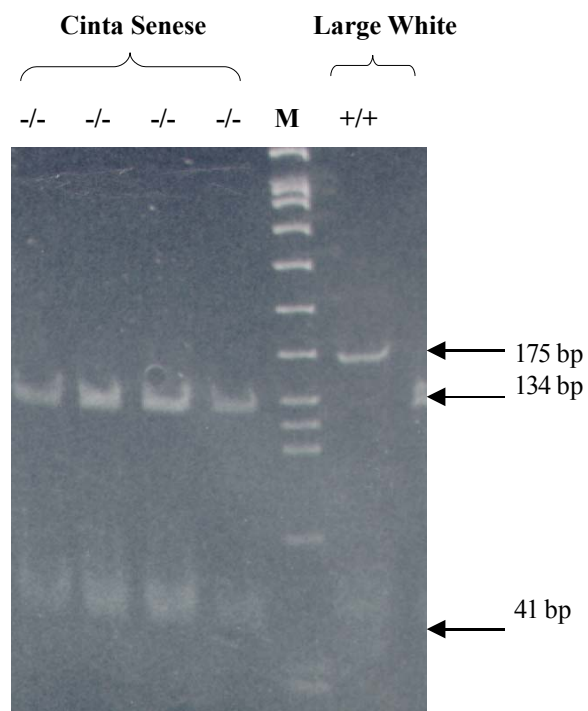


Figure 5: PCR analysis of the duplication of the *KIT* gene. M = DNA Molecular Weight Marker.

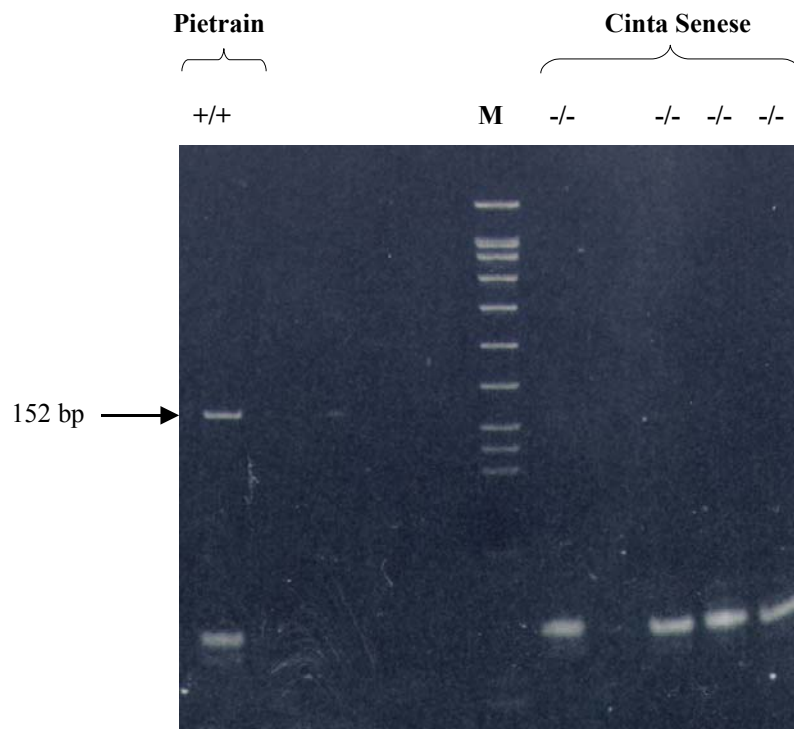
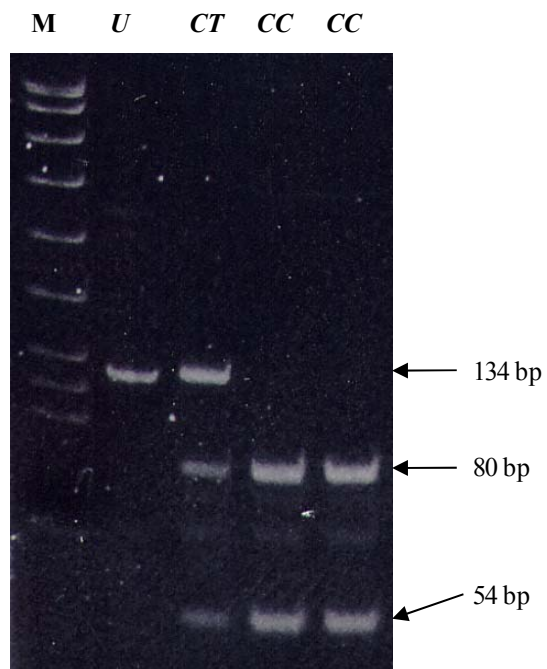
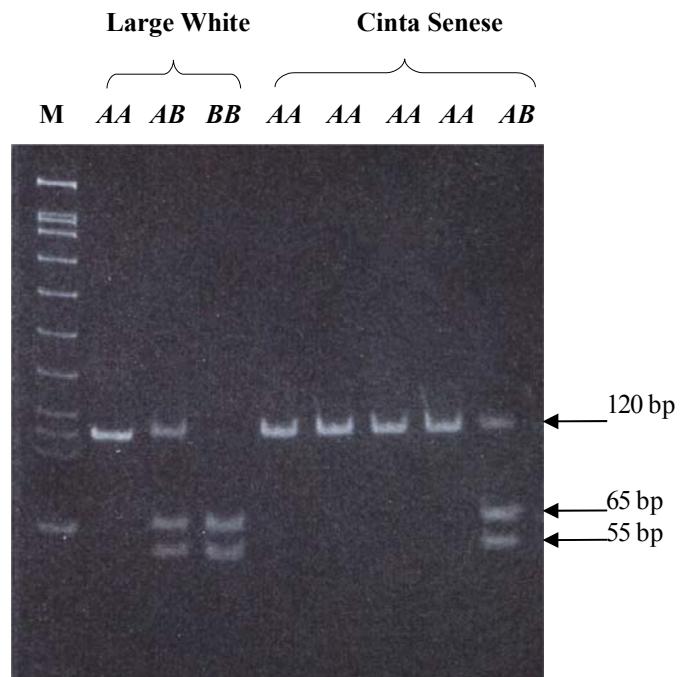


Figure 6: PCR-RFLP analysis with *HhaI* of the 134 bp fragment of the *RYR1* gene.



**Figura 7: PCR-RFLP analysis with *Pvu*II of the 120 bp fragment of the *ESR* gene. M = DNA Molecular Weight Marker.**



**MUTATIONS IN THE MELANOCORTIN 1 RECEPTOR (*MC1R*) GENE ARE  
ASSOCIATED WITH COAT COLOURS IN THE DOMESTIC RABBIT  
(*Oryctolagus cuniculus*)**

L. Fontanesi, M. Tazzoli, F. Beretti and V. Russo

DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Faculty of Agriculture, University of Bologna, Via  
F.lli Rosselli 107, Villa Levi – Coviolo, 42100 Reggio Emilia, Italy

Correspondence to: Luca Fontanesi DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Faculty of  
Agriculture, University of Bologna, Via F.lli Rosselli 107, Villa Levi – Coviolo, 42100 Reggio  
Emilia, Italy. Tel: +39 0522 290516, Fax: +39 0522 290523 e-mail: luca.fontanesi@unibo.it

Running title: *MC1R* mutations in domestic rabbits

**SUMMARY**

Mutations at the *Extension*/melanocortin 1 receptor (*MC1R*) locus have been identified to alter coat colour and pigment synthesis in several vertebrates. We sequenced almost the complete coding region of the *MC1R* gene in several domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) breeds and identify four different alleles: two wild type alleles differing by two synonymous single nucleotide polymorphisms, one allele determined by a 30 nucleotides in-frame deletion (**A30** allele) and one allele determined by the in-frame deletion of 6 nucleotides (**A6** allele). A PCR based protocol was used to distinguish the wild type alleles from the **A30** and **A6** alleles in 260 rabbits belonging to 37 breeds and in 2 hybrids. All red/fawn rabbits were homozygous for the **A30** allele. This allele represents the recessive *e* allele at the *Extension* locus identified by the pioneering genetic studies in this species. All Californian, Checkered, Giant White and New Zealand White analysed rabbits showed genotype **A6/A6**. Allele **A6** was also observed in Dutch and Champagne d'Argent rabbits. Black coat colour is part of the colour of these breeds except for the two albino breeds (Giant White and New Zealand White). Following the nomenclature established at the rabbit *Extension* locus, this allele, that is dominant over allele **A30**, may be allele *E<sup>D</sup>* or allele *E<sup>S</sup>*. The wild type alleles were present in several other breeds. Interaction between the *MC1R* alleles and the *Agouti* locus may be assumed to explain the agouti-black coat colour of some F<sub>1</sub> rabbits resulting from **A6/A6** X **A30/A30**

crosses.

**Keywords:** coat colour, *Extension*, melanocortin 1 receptor mutations, domestic rabbit

## INTRODUCTION

Pigmentation in mammals is mainly determined by the distribution of two chemically distinct types of melanin pigments, pheomelanin and eumelanin, which produce red/yellow and dark phenotypes, respectively. The relative amount of eumelanin and pheomelanin in the melanocytes are controlled primarily by two loci, the *Extension* and *Agouti* loci (Searle 1968). Studying mice, Robbins *et al.* (1993) demonstrated that the *Extension* locus encodes the melanocyte-stimulating hormone receptor, also known as melanocortin 1 receptor (*MC1R*), that is a seven transmembrane G protein-coupled receptor associated to adenylyl cyclase via the  $\alpha$  subunit of the heterotrimeric Gs protein. When  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone (MSH) binds *MC1R* causes the activation of the receptor that triggers the cAMP cascade, which, in turn, activates tyrosinase, the rate limiting enzyme in melanin production, and the melanocyte switch to eumelanin synthesis. Mutations of the single exon *MC1R* gene causing a constitutively active receptor are dominant and produce black coat colour, whereas inactivating mutations are recessive and result in red/yellow pigmentation. *MC1R* mutations have been identified to alter coat colour and pigment synthesis in several mammals, like mice (Robbins *et al.*, 1993), human (Valverde *et al.*, 1995), cattle (Klungland *et al.*, 1995; Joerg *et al.*, 1996), guinea pig (Cone *et al.*, 1996), horse (Marklund *et al.*, 1996), fox (Våge *et al.*, 1997), pigs (Kijas *et al.*, 1998), sheep (Våge *et al.*, 1999), dogs (Everts *et al.*, 2000; Newton *et al.*, 2000), bear (Ritland *et al.*, 2001) and felids (Eizirik *et al.*, 2003) as well as in avian (Takeuchi *et al.*, 1997; Theron *et al.*, 2001; Kerje *et al.*, 2003) and reptiles (Rosenblum *et al.*, 2004). The *Agouti* locus encodes for the agouti signaling protein (*ASIP*) that is a paracrine signaling molecule antagonist of MSH in binding to *MC1R* and thereby preventing the *MC1R*-MSH interaction, resulting in pheomelanin synthesis instead of black/brown eumelanin (Bultman *et al.*, 1992). Recessive mutants of *Agouti* (allele *a*) cause dark coat colour (Searle, 1968). The *Extension* and *Agouti* loci show epistatic interactions in most species even if exceptions have been observed (Searle, 1968; Våge *et al.*, 1997).

After the rediscovery of the Mendel's laws at the beginning of the 1900s, the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) was considered a model species to study coat colour genetics due to the availability of several strains with an extreme variability of this phenotype (Castle, 1905; Punnett, 1912; 1915). Actually, most rabbit breeds and strains, many of which are known under different

names in different countries, are identified mainly by their own characteristic coat colour and pattern distribution and breeder/fancy breeder organizations worldwide have established specific breed standards (i.e.: American Rabbit Breeders Association, 1955; Associazione Nazionale Coniglicoltori Italiani, 1989; Fédération Française de Cuniculiculture, 2000). So far in rabbits, only one locus influencing coat colour, the albino (*C*) locus, has been investigated at the molecular level and several mutations of the tyrosinase gene, affecting this phenotype, have been identified (Aigner *et al.*, 2000).

Up to now the rabbit *Extension* locus has been studied only by means of classical genetics making it possible to assign it to linkage group VI (Fox & Van Zutphen, 1979). Five alleles, listed according to their dominance level, have been reported at the *Extension* locus:  $E^D$  (dominant black),  $E^S$  (steel, weaker version of  $E^D$ ),  $E$  (normal grey or normal extension of black),  $e^J$  (Japanese, mosaic distribution of black and yellow) and  $e$  (non-extension of black, yellow/red with white belly) (Castle, 1930; Robinson, 1958; Searle, 1968; Fox, 1994). Moreover, the most frequent genotype of some breeds at this locus has been deduced or established by pedigree studies (Castle, 1930; Robinson, 1958; Fox, 1994). For example, all red or fawn breeds, like New Zealand Red, have been assigned the  $e/e$  genotype.

Here we sequenced almost the complete coding sequence of the rabbit *MC1R* gene, report on the identification and analysis of mutations in different breeds and discuss their association with alleles at the *Extension* locus and their putative interactions with the *Agouti* locus.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Hair or blood samples were collected from 260 rabbits registered to the stud book of the Italian Association of Rabbit Breeders (ANCI; <http://www.anci-aia.it>). These animals belong to 36 different breeds with diverse coat colour and pattern distribution. Two commercial hybrids were also sampled. Table 1 reports the sampled animals with a short description of their coat colour and the putative genotype at the *Agouti* and *Extension* loci as deduced from earlier studies (Punnett, 1912; 1915; Castle, 1930; Robinson, 1958; Fox, 1994). Two crosses between Checkered Giant and Burgundy Fawn rabbits were established with the production of 8 weaned F<sub>1</sub> rabbits for which coat colour was recorded (Figure 1).



### *Polymerase chain reaction (PCR) and sequencing*

To sequence the rabbit *MC1R* gene, PCR primers (Table 2; primer pairs 1, 1A, 2 and 3) were designed on the alignment of the human, mouse, bovine, pig, horse, dog and cat *MC1R* gene sequences or on the specific rabbit sequences obtained during the assembling of what was obtained with heterologous primers. These primers were used to PCR amplify genomic DNA extracted using standard methods (Sambrook *et al.*, 1989) from blood or hair of rabbits of different breeds or strains showing diverse coat colour: Alaska (1), Belgian Hare (2), Blue Vienna (1), Burgundy Fawn (2) (Figure 1), Californian (1), Checkered Giant with black markings (2) (Figure 1), Coloured Dwarf (pale Siamese) (1), English Spot with Madagascar markings (1), Giant Grey (2) (Figure 1), Russian (1), Silver (1), commercial hybrid (1). PCR was performed using a PT-100 thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) in a volume of 20 µl containing 10-100 ng DNA template, 1 U DNA EuroTaq DNA polymerase (EuroClone Ltd., Paington, Devon, UK), 1X PCR Buffer, 2.5 mM dNTPs, 10 pmol of each primer, 1.0 mM of MgCl<sub>2</sub>. PCR profile was as follows: 5 min at 95°C; 35 amplification cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 64°C, 30 sec at 72°C; 10 min at 72°C. For the sequencing of the PCR fragments, 3-4 µl of PCR product was treated with 2 µl of ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA) following the manufacturer protocol. Cycle sequencing of the PCR products was obtained with the Big Dye v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and sequencing reactions, after a purification step with DyeEx™ 2.0 Spin columns (Qiagen, Hilden, Germany), were loaded on an ABI3100 Avant sequencer (Applied Biosystems). Sequences were edited, assembled and aligned with the help of the BioEdit software v. 7.0.5.2 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

### *Analysis of mutations*

To analyse the two deletions, a PCR-amplified product length polymorphism (APLP) method was established using primer pair 1B (Table 2) and the PCR conditions already reported. PCR products were obtained using as template the DNA extracted as indicated above or adding directly to the PCR mix two-three hair bulbs without any previous treatment. PCR products were electrophoresed on 10% 29:1 bis-acrylamide:acrylamide gels and stained with ethidium bromide (Figure 2). The A>G mutation at position 347, disrupts/creates a restriction site (CGCG) for endonuclease *Bst*UI. Thus, using primer pair 1B, a PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method was established to analyse this single nucleotide polymorphism (SNP). Five µl of PCR product was digested with 10 U of *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) and the resulting

fragments were resolved with polyacrylamide gel electrophoresis as indicated above. Allele G347 is restricted while allele A347 is not digested (Figure 2).

## RESULTS

### *Identification of mutations*

The assembled sequence of 910 bp (excluding the extreme primer sequences) obtained from the Giant Grey rabbits (EMBL accession no. AM180878), considered as carriers of the wild type *E* allele (Castle, 1930; Robinson, 1958; Searle, 1968) (Figure 1), contained 14 bp of the 5'-untranslated region and 896 bp of the predicted 951 bp complete open reading frame. The deduced amino acid sequence of 299 amino acids showed 80, 76, 78, 77, 81 and 78% identity with the corresponding human, mouse, cattle, pig, cat and dog *MC1R* protein sequences, respectively. The nucleotide sequence obtained from the Giant Grey rabbits was the same as obtained from the Russian rabbit but differed by two synonymous SNPs from the sequence (EMBL accession no. AM180879) obtained from Belgian Hare, Alaska, Blue Vienna and Silver rabbits (an A>G and a T>C substitutions at position 347 and 569, respectively). From these sequencings, it is evident that two wild type alleles, differing by two silent SNPs (thus, with the same encoded protein) in linkage disequilibrium, exist in the domestic rabbit. The sequenced commercial hybrid was heterozygous at the two polymorphic sites supporting again linkage disequilibrium of these two SNPs.

The sequences obtained from the fawn/red/yellow animals (Burgundy Fawn, English Spot with Madagascar markings and Siamese rabbits) showed an in-frame 30 bp deletion (EMBL accession no. AM180881; **A30** allele) causing the loss of 10 amino acids (from position 102 to position 111) that are part of the first extracellular loop (Figure 3). This deletion may disrupt the functionality of the *MC1R* protein resulting in the yellow/red phenotype that is a characteristic of the sequenced rabbits. It is interesting to note that this deletion occurs just after a repeat sequence of 4 CTG triplets and terminates just before two GTG repeats. Hosoda *et al.* (2005), analysing *MC1R* gene sequences in mustelids, suggested that indels may be related to specific nucleotide arrangements within this gene that are associated to repeats in the or close to the deleted regions. The 30 bp deletion eliminates nucleotide position 347 corresponding to the first SNP in the wild type alleles. However, at the second SNP position (position 569 of the wild type alleles) all **A30** sequences reported T, as in the Giant Grey rabbits.

The sequences produced from Californian and Checkered Giant rabbits showed another in-frame deletion of 6 bp (EMBL accession no. AM180880; **A6** allele) determining the elimination of two

amino acids at positions 94 and 95, close to the extracellular end of the second transmembrane domain (Figure 3) in which gain of function missense mutations have been reported in mice (Robbins *et al.*, 1993), bovine (Klungland *et al.*, 1995), chicken (Takeuchi *et al.*, 1996), pigs (Kijas *et al.*, 1998) and bananaquit (Theron *et al.*, 2001). At the two SNP positions, all **A6** sequences showed A and T, respectively, like the Giant Grey sequence.

#### *Analysis of the mutations*

To analyse the two deletions in a larger sample of rabbits belonging to different breeds (Table 1) a PCR-APLP method (Figure 2) was developed. All rabbits of breeds with typical fawn/red/yellow coat colour (namely Burgundy Fawn, English Lop, Gold Saxony, New Zealand Red and Thuringian) and other animals showing the pheomelanin phenotype (Madagascar, shaded yellow/brown and Siamese coat colour) had genotype **A30/A30** (Table 1). Moreover, black Dutch rabbits that were heterozygous **E/A30** indicated that allele **A30** is recessive to the wild type allele **E**. An **E/A30** genotype was observed also in an albino commercial rabbit, but in this case the mutated *C* locus masked any other locus, affecting also the phenotypic expression of the *Extension* locus (Castle, 1930; Robinson, 1958; Searle, 1968; Aigner *et al.*, 2000).

Allele **A6** was homozygous in all Californian, Checkered, Giant White and New Zealand White genotyped rabbits and was identified in three out of eight Dutch animals and in heterozygous state (**E/A6**) in only one Champagne d'Argent rabbit (Table 1). Black or dark blue coat colour is part of the colour of the listed breeds except for the two albino breeds (Giant White and New Zealand White) that cannot express any colour, as indicated above.

All other rabbits, belonging to breeds with a wide variety of coat colour ranging from black (i.e.: Alaska, Blanc de Hotot, Dalmatian, Dutch, English Spot, Rhinelander, Russian, Silver and Tan) to dark blue or brown (i.e.: Blue Vienna, Havana and Marten), or different gradations of grey (i.e.: Champagne d'Argent, Fairy Marburg, Fairy Pearly, Giant Chinchilla, Giant Grey, Lop and Lynx) or white (i.e.: Ermine and White Vienna), did not show the reported deletions and were considered having genotype **E/E** (Table 1).

To obtain a first evaluation of the distribution of the two wild type alleles in different **E/E** breeds and to investigate the first point mutation site (position 347 in the wild type sequence) in carriers of the **A6** allele, a PCR-RFLP protocol (Figure 2) was used to genotype 61 rabbits of different breeds (Alaska, 2; Belgian Hare, 2; Blue Vienna, 7; Californian, 7; Champagne d'Argent, 1; Checkered, 7; Ermine, 1; Fairy Pearly, 1; Giant Chinchilla, 1; Fox, 1; Giant Grey, 2; Giant White, 1; Lop, 8; Mini Silver, 1; New Zealand White, 8; Rex, 4; Rhinelander, 3; Russian, 2; Silver, 2) and one hybrid. All

**$\Delta 6/\Delta 6$**  rabbits (23) were homozygous A/A, confirming what was observed by sequencing. Of the remaining 39 rabbits, the A/A genotype was evidenced in 12 animals (Ermine, 1; Giant Grey, 2; Lop, 2; Mini Silver, 1; Rex, 1; Rhineland, 3; Russian, 2), genotype A/G was observed in the hybrid rabbit and in Blue Vienna (5), Fairy Pearly (1), Fox (1), Giant Chinchilla (1), Lop (4), Rex (3) and Silver (1) and the **G/G** genotype was present in the remaining 10 rabbits. From these data, it seems that the two wild type alleles may segregate in several **E/E** breeds.

### *Family study*

To evaluate the putative dominant behaviour of allele  **$\Delta 6$**  and the recessive mode of inheritance of allele  **$\Delta 30$** , two crosses between Checkered Giant (with black markings and genotype  **$\Delta 6/\Delta 6$** ) and Burgundy Fawn (with genotype  **$\Delta 30/\Delta 30$** ) rabbits were carried out (Figure 1). All weaned 8 F<sub>1</sub> animals resulted agouti-black (with black extremities) or self black in the exact 3:1 ratio, thus the fawn phenotype was always masked (Figure 1). This result indicated the dominance (or semi-dominance) of allele  **$\Delta 6$**  and confirmed the recessive behaviour of allele  **$\Delta 30$**  at the *Extension* locus.

## DISCUSSION

*MC1R* mutations affecting coat colour at the *Extension* locus have been observed in a wide variety of vertebrates, including mammals, birds and reptiles (Robbins *et al.*, 1993; Klungland *et al.*, 1995; Valverde *et al.*, 1995; Cone *et al.*, 1996; Joerg *et al.*, 1996; Marklund *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1997; Våge *et al.*, 1997; Kijas *et al.*, 1998; Våge *et al.*, 1999; Everts *et al.*, 2000; Newton *et al.*, 2000; Ritland *et al.*, 2001; Theron *et al.*, 2001; Eizirik *et al.*, 2003; Kerje *et al.*, 2003; Rosenblum *et al.*, 2004). Despite the broad number of breeds and strains with different coat colour available in rabbit as well as to the fact that pioneering studies on coat colour have been carried out in this species, among the most common domestic mammals, the domestic rabbit was the only one that was not investigated at the *MC1R* gene yet.

Using the described PCR approach, we were able to amplify and sequence almost the complete coding sequence of the *MC1R* gene in 16 rabbits belonging to different breeds showing diverse coat colour. Four *MC1R* alleles were identified in the sequenced animals: two wild type alleles (**E**) differing by two non-sense SNPs, one recessive allele determined by a deletion of 10 amino acids (caused by a 30 nucleotides in-frame deletion,  **$\Delta 30$**  allele) and one dominant or partial dominant allele determined by a deletion of 2 amino acids (due to an in-frame deletion of 6 nucleotides,  **$\Delta 6$**  allele). The domestic rabbit is the third species for which alleles caused by nonframeshift deletions

in this gene have been reported as only in two felids (jaguar and jaguarundi) alleles determined by such mutations have been observed (Eizirik *et al.*, 2003).

The **A30** rabbit allele can be indicated to be allele *e* of the *Extension* locus due to the recessive mode of inheritance and to its complete association with the pheomelanin coat colour across different breeds. The resulting lack of 10 amino acids, eliminating two third of the first extracellular loop (Figure 3), may alter the packing of transmembrane fragment (TM) 2 and TM3 with direct effects on the second intracellular loop that is important for normal coupling and interaction with the Gs protein (Lu *et al.*, 1998). This deletion was only partially overlapping to the **A24** (from amino acids 95 to 102) and **A15** (from amino acids 101 to 105) alleles reported in the melanistic jaguarundi and jaguar species, respectively (Eizirik *et al.*, 2003), that interest only partially the first extracellular loop and are less extensive than the *e* causing deletion that we report in the rabbit (Figure 3).

The rabbit **A6** allele may mimic allele  $E^D$  or  $E^S$  at the *Extension* locus (Robinson, 1958; Searle, 1968) but, as we could not distinguish which of the two alleles the **A6** sequence may correspond, we indicated it as  $E^{D-S}$ . However, it is not completely clear if these two forms are really two distinct alleles at the *Extension* locus or are the products of other modifying genes acting on the same allele (Onslow, 1922; Castle, 1930), thus several fancy breeders consider only four alleles for the *Extension* series. Nevertheless, considering the shot-gun sequencing strategy across different breeds, it is possible that other alleles with or without phenotypic effect may have not been disclosed thus making it plausible the differentiation at the molecular level of these two putative alleles. In other species, several other mutations that have been shown or inferred to lock the *MC1R* in an active state have been reported to interest amino acids of the outer portion of the second transmembrane domain (Figure 3): E94K in mouse ( $E^{so-3J}$ ; Robbins *et al.*, 1993), in chicken (Takeuchi *et al.*, 1996) and bananaquits (Theron *et al.*, 2001); L99P in cattle (Klungland *et al.*, 1995) and pigs (Kijas *et al.*, 1998); L100P in mouse ( $E^{so}$ , Robbins *et al.*, 1993). Position 94 that is deleted, together with position 95, in the **A6** rabbit allele, is part of the highly charged domain containing Glu94, Asp117 and Asp121 that is the key site for the TM2 and TM3 conformational changes for the functional coupling of the receptor (Lu *et al.*, 1998). Semi-dominant behaviour has been supposed for the jaguarundi 8 amino acid deleted allele (Eizirik *et al.*, 2003) that has in common with this rabbit allele the lack of amino acid at position 95 (Figure 3). A similar semi-dominant effect or partial epistatic interaction with alleles at the *Agouti* locus, may be ascribed also to the **A6** ( $E^{D-S}$ ) rabbit allele. This hypothesis may be supported from the results of the crosses between black marking Checkered Giants (genotype **A6/A6**) with **A30/A30** Burgundy Fawn rabbits that produced agouti-black and self black rabbits in the 3:1 ratio, probably depending on which genotype is present at the *Agouti* locus. Following this reasoning and inferring the parental genotype

at the *Agouti* locus ( $A/a$  for both parents; Figure 1), the supposed model may suggest that genotype  $a/a$  may strengthen black colour even when the rabbits are heterozygous  $E^{D-s}/e$ , while carriers of the  $A$  allele in such heterozygous animals may result in agouti-black production. In animals with  $E^{D-s}/E^{D-s}$  genotype or, on the other hand, with  $e/e$  genotype, no visible effect may be obtained if the  $A$  allele is present at the *Agouti* locus. Even if more results are needed to confirm this hypothesis, this model of interaction between the *Extension* and *Agouti* loci could be deduced from the pioneering segregation studies of Punnett (1912; 1915).

The rabbit  $E$  alleles were isolated from breeds that, according to previous classical genetic analyses, were suggested to carry the wild type form (Table 1). Linkage disequilibrium between the two differentiating point mutations was observed even if we cannot completely exclude the presence of other possible combinations (namely A347-C569 or G347-T569) because, as only the A347G substitution interests a restriction site, only this mutation was investigated in a larger sample. As expected, the  $E$  alleles were identified in a wide range of breeds with different coat colour including self black or black markings (or dark blue and brown) for which the  $a/a$  genotype at the *Agouti* locus has been suggested to determine the eumelanic phenotype (Castle, 1930; Robinson, 1958; Searle, 1968; Fox, 1994). The two in-frame deletion alleles here reported may have been originated independently from the A347-T569 wild type allele as both sequences report the nucleotide signs of their putative ancestral form.

The rabbit is one of the few domestic mammals for which it was possible to give approximate dates for the occurrence of major coat colours. The yellow phenotype ( $e$  allele), together with the albino, blue dilution, brown, Dutch and non-agouti coat colour may have appeared before the 1700, thus it is one of the oldest mutations documented in this species. The English, Himalayan and steel coat patterns or colours originated later (Robinson, 1984). However, due to the more recent constitution of the breeds and to the fact that most if not all the important breeds are based upon one or a few of the basic coat colour mutants, it is not surprising that allele  $\Delta 30$ , as well as allele  $\Delta 6$  and the two wild type alleles have been observed in several different breeds that in some cases have distinctive presumed origin. A particular case can be represented by the Dutch breed for which we observed the wild type,  $\Delta 30$  and  $\Delta 6$  alleles. Actually, in most countries the standard of this breed accepts different colorations and fancy breeders maintain a different genetic pool in which there is segregation of the different colours. Furthermore, it is interesting to note that two breeds that have close relationships, the Californian and the New Zealand White, showed the same genotype at the *Extension* locus. As a matter of fact, the Californian breed originated in California (and this is the reason of its name) at the beginning of the 1900s from crosses with the New Zealand White, the Himalayan (the old name of the Russian breed that is still used in some countries to indicate this breed), and, possibly, the

Chinchilla breed (Sandford, 1986). Thus, it could be supposed that the Californian breed has inherited allele **A6** from the New Zealand White breed and the typical coat colour pattern from the Himalayan breed, as the genotyped Russian animals resulted **E/E** (Table 1) confirming what was reported for the Himalayan breed (Punnett, 1915; Robinson, 1958).

In the present work we identified two new naturally engineered mutations of the *MC1R* gene adding further information for the disclosure of the role of amino acid residues and protein regions in the functionality of this receptor. Biochemical and pharmacological investigations of the **A30** and **A6** alleles will be important to confirm their roles in the evidenced phenotypes and their interacting effects with the *ASIP* protein. However, the presence in nature of other allelic forms with in-frame deletions in this gene, that interest the same protein region, as evidenced in felids (Eizirik *et al.*, 2003), together with the species specific nonframeshift deletions reported in mustelids (Hosoda *et al.*, 2005) and lion-tamarinds (Mundy & Kelly 2003), may ask for *in vitro* studies considering assays with partial deleted forms of this protein in order to elucidate the effect of the lack of amino acids in the functionality and evolution of the receptor. Moreover, the isolation of the *Agouti* gene and the characterization of mutations at this locus in rabbits may clarify the phenotypic effects supposed for several breeds and the interaction with the *Extension* locus.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank ANCI and several rabbit breeders for their help in the sampling.

## REFERENCES

*\*References are included starting at page 132*



**Table 1: Breeds and animals genotyped with the PCR-APLP method.**

<i>Breeds (No. of animals)</i>	<i>Coat colour and [proposed Agouti and Extension genotype]<sup>1</sup></i>	<i>APLP genotype<sup>2</sup></i>				
		<i>Δ30/Δ30</i>	<i>Δ30/Δ6</i>	<i>Δ6/Δ6</i>	<i>E/Δ30</i>	<i>E/E</i>
Alaska (7)	self black [ <i>a/a, E/-</i> ]	-	-	-	-	7
Belgian Hare (6)	reddish laced with black [ <i>A/-, E/-</i> ]	-	-	-	-	6
Blanc de Hotot (4)	white with black markings [ <i>a/a, E/-</i> ]	-	-	-	-	4
Blue Vienna (20)	dark blue [ <i>a/a, E/-</i> ]	-	-	-	-	20
Burgundy Fawn (27)	fawn [ <i>A/-, e/e</i> ]	27	-	-	-	-
Californian (28)	white with black markings [ <i>a/a, ?</i> ]	-	-	28	-	-
Champagne d'Argent (7)	silver as surface colour and dark blue as under- colour [ <i>a/a, E/-</i> ]	-	1	-	-	6
Checkered Giant (10)	white with black (9) or blue (1) markings [ <i>a/a,</i> <i>E<sup>D</sup>/-</i> ]	-	-	10	-	-
Checkered Small (4)	white with black markings [ <i>a/a, E<sup>D</sup>/-</i> ]	-	-	4	-	-
Coloured Dwarf (6)	Blanc de Hotot (1) [ <i>a/a,</i> <i>E/-</i> ]; blue (1) [ <i>a/a, E/-</i> ]; bristle white (1) [?, ?]; hare-grey (1) [ <i>A/-, E/-</i> ]; Havana (1) [ <i>a/a, E/-</i> ]; pale Siamese (1)* [?, <i>e/e</i> ]	1*	-	-	-	5
Dutch (8)	with black markings [ <i>a/a, E/-</i> or <i>E<sup>D</sup>/-</i> or <i>E<sup>S</sup>/-</i> ]; with Madagascar markings (1)* [?, <i>e/e</i> ]	1*	-	3	3	1
English Lop (1)	shaded yellow/brown [ <i>a/a, e/e</i> ]	1	-	-	-	-
English Spot (6)	white with black markings (5) [ <i>a/a, E/-</i> ]; Madagascar markings (1)* [?, <i>e/e</i> ]	1*	-	-	-	5
Ermine (4)	white albino (2) [?, ?]; white with blue eyes (2) [?, <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	4
Fairy Marburg (3)	grey-light blue [?, <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	3
Fairy Pearly (7)	pearling grey [?, <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	7
Fox (1)	dark blue [ <i>a/a, E/-</i> ]	-	-	-	-	1
Giant Chinchilla (6)	chinchilla [ <i>A/-, E/E</i> ]	-	-	-	-	6
Giant Grey (6)	wild-grey [ <i>A/-, E/E</i> ]	-	-	-	-	6
Giant White (3)	white albino [?, ?]	-	-	3	-	-
Gold Saxony (2)	red [?, <i>e/e</i> ]	2	-	-	-	-
Havana (3)	dark brown [ <i>a/a, E/E</i> or <i>E<sup>D</sup>/E</i> ]	-	-	-	-	3
Lop (15)	wild-grey [ <i>A/-, E/-</i> ]; with Madagascar markings (4)* [?, <i>e/e</i> ]	4*	-	-	-	11
Lop Dwarf (7)	white (1) [?, ?]; pearling grey (1) [?, <i>E/-</i> ]; white and Madagascar (3)* [?, <i>e/e</i> ]; Madagascar (1)*	5*	-	-	-	2

	[?, <i>e/e</i> ]; shaded yellow/brown (1)* [ <i>a/a</i> , <i>e/e</i> ]					
Lynx (2)	silver blue [?, ?]	-	-	-	-	2
Marten (1)	brown [ <i>a/a</i> , <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	1
Mini Lop (2)	wild-grey [ <i>A/-</i> , <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	2
Mini Silver (4)	black with silvering [ <i>a/a</i> , <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	4
New Zealand Red (7)	red [ <i>A/-</i> , <i>e/e</i> ]	7	-	-	-	-
New Zealand White (23)	white-albino [?, ?]	-	-	23	-	-
Rex (4)	dalmatian (3) [ <i>a/a</i> , <i>E/-</i> ]; black (1) [ <i>a/a</i> , <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	4
Rhineland (7)	white with black and yellow markings [ <i>a/a</i> , <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	7
Russian (2)	white with black markings [ <i>a/a</i> , <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	2
Silver (5)	black with silvering [ <i>a/a</i> , <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	5
Tan (6)	black fire (5) [ <i>a'/a'</i> , <i>E/-</i> ]; Havana (1) [ <i>a'/a'</i> , <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	6
Thuringian (3)	shaded yellow/brown [ <i>a/a</i> , <i>e/e</i> ]	3	-	-	-	-
White Vienna (4)	white-blue eyes [?, <i>E/-</i> ]	-	-	-	-	4
Commercial hybrids (2)	white-albino [?, ?]	-	-	-	1	1
<b>Total (262)</b>		<b>51</b>	<b>1</b>	<b>71</b>	<b>4</b>	<b>135</b>

<sup>1</sup> In breeds for which animals of different coat colour have been sampled, the number of the rabbits showing the distinctive phenotypes is indicated between circled brackets. Squared brackets contains the proposed genotype at the *Agouti* (for which three alleles have been reported: *A*, *a* and *a'*, the later producing the tan phenotype) and *Extension* loci, when available or deduced from the literature.

<sup>2</sup> The number of the animals showing the different genotypes is reported. An asterisk (\*) has been included to link the genotyped animals with their coat colour description when more phenotypes were sampled for a breed.

**Table 2: PCR primers and product length in bp.**

<i>Primer pair name</i>	<i>Forward (5' – 3')</i>	<i>Reverse (5' – 3')</i>	<i>Product length</i>	<i>Amplified region<sup>3</sup></i>
<b>1</b>	CACCAGCCCTTCCTGAT <sup>1</sup>	GTAGCGCAGTGCGTAGAAGA	488	1-450
<b>1A</b>	CTGCACTCGCCCATGTACTA	AGCAGAGGCTGGACACCAT	196	239-396
<b>1B</b>	ATCTGCTGCCTGGCCTTG	CAGATGAGCACGTCGATGA	146	263-370
<b>2</b>	ACCTGCTGGTGAGCGTGA	AAGAAGATGCCAGGAGGAT	502	283-693
<b>3</b>	GTCCTGCTCTGCCTCATCAT	AGTCTCTGGCTGCGGAAG <sup>2</sup>	335	593-910

<sup>1</sup> 5' and <sup>2</sup> 3' most extreme primers that have not been included in the assembled sequences.

<sup>3</sup> The wild type sequence (EMBL acc. no. AM180878) was considered as reference.

## LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: A) Giant Grey, B) Burgundy Fawn, C) Checkered Giant and D) F<sub>1</sub> (obtained from a Burgundy Fawn x Checkered Giant cross) rabbits. The determined genotype at the *Extension* locus, together with the assumed (A) or deduced (B, C and D) genotype at the [*Agouti*] locus, is shown below each photograph.

A)



$E/E, [A/-]$

B)



$e/e, [A/a]$

C)



$E^{D-S}/E^{D-S}, [A/a]$

D)



$E^{D-S}/e, [A/-]$      $E^{D-S}/e, [a/a]$      $E^{D-S}/e, [A/-]$

Figure 2: PCR-APLP and PCR-RFLP analyses of the rabbit *MC1R* gene. M= DNA molecular weight marker VIII (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany); R= reference mix of the amplified products of the  $\Delta 30$ ,  $\Delta 6$  and *E* alleles. The APLP and RFLP genotypes are indicated at the top of each lane. The fragment of 43 bp generated in the RFLP analysis is not shown in the gel.

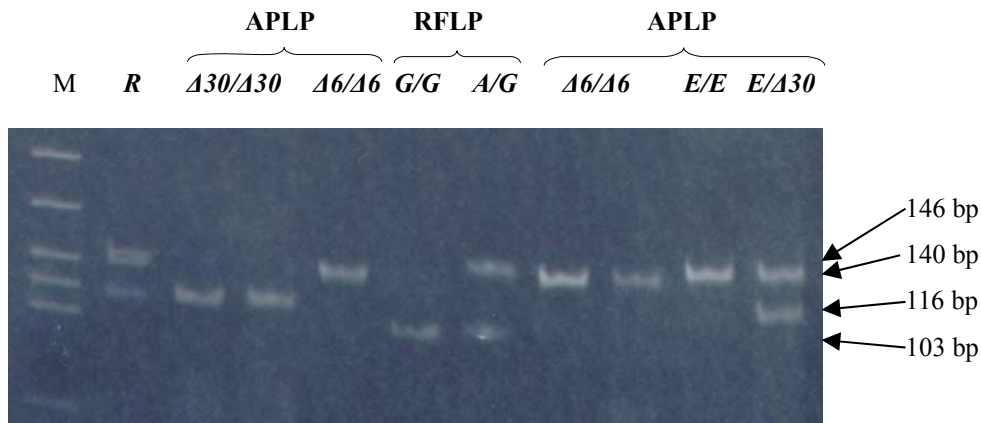
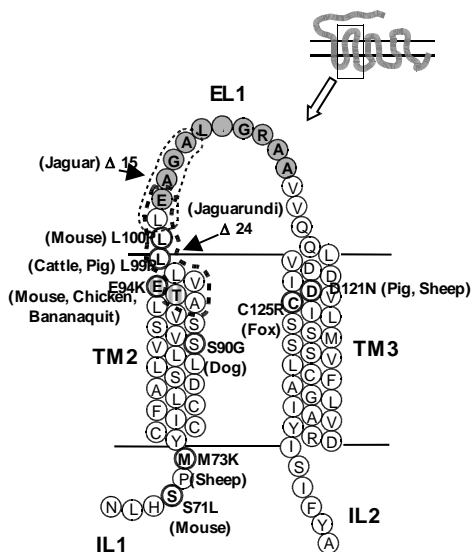


Figure 3: Diagram of a portion of the rabbit *MC1R* protein in which the  $\Delta 6$  and  $\Delta 30$  deletions occur. The two dimensional-model as been derived from the human *MC1R* secondary structure reported by Ringholm *et al.* (2004). Amino acids shaded in grey are those that are deleted in the rabbit  $\Delta 30$  allele. The two vertical hatched residues represent the deleted amino acids in the  $\Delta 6$  rabbit allele. Circles bordered by a thick black line represent the activating amino acids substitutions that have been previously reported to be associated to dominant eumelanic phenotype in mice (Robbins *et al.*, 1993), cattle (Klungland *et al.*, 1995), chicken (Takeuchi *et al.*, 1997), fox (Våge *et al.*, 1997), pig (Kijas *et al.*, 1998), sheep (Våge *et al.*, 1999) and bananaquit (Theron *et al.*, 2001). The deletions observed in jaguar and jaguarundi (Eizirik *et al.*, 2003) have been surrounded by a dotted or a bold dotted line, respectively. The inset at the right top shows the secondary structure diagram of the whole protein with evidenced the region enlarged below it. EL, extracellular loop; IL, intracellular loop; TM, transmembrane domain.



**NON-INVASIVE AND SIMPLE METHODS FOR SAMPLING RABBIT DNA FOR PCR ANALYSIS OF MELANOCORTIN 1 RECEPTOR (*MC1R*) GENE MUTATIONS: A TECHNICAL NOTE**

FONTANESI L., TAZZOLI M., RUSSO V.

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroambientale (DIPROVAL), Sezione di Allevamenti Zootecnici, University of Bologna, 42100 Reggio Emilia, Italy

Corresponding author: Luca Fontanesi DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Faculty of Agriculture, University of Bologna Via F.lli Rosselli 107, Villa Levi - Coviolo, 42100 Reggio Emilia, Italy. Tel. +39 0522 290516, Fax: +39 0522 290523 Email: luca.fontanesi@unibo.it

**ABSTRACT**

Simple and non-invasive methods of collecting and preserving biological specimens for genetic analysis can be useful in reducing the discomfort of the involved animals and can be applicable for high-throughput studies that require a large number of biosamples. In order to have the possibility to analyse a large number of samples and making easier the collection of rabbit biological materials as well as to reduce the cost and time of the genotyping procedures, here we tested different protocols for the genotyping of mutations identified in the rabbit melanocortin receptor 1 (*MC1R*) gene that are associated to coat colours in different rabbit breeds. These protocols make use of rabbit hair roots or cell preparations from buccal swabs with a direct PCR amplification without previous DNA extraction. Hair samples were collected from 60 rabbits of different breeds and preserved for up to 12 months at 4°C.

For each hair sample 5-10 hair roots were clipped a few mm from the root directly within a 0.2 ml PCR tube. Buccal cells were collected from 10 crossbred and purebred rabbits and prepared after a few steps for PCR. The PCR fragments were analysed by means of polyacrylamide gel electrophoresis and stained with ethidium bromide or using fluorescent labelled products resolved in a capillary automatic sequencer. The success genotyping rate of the hair and buccal cell samples was 98% and 80%, respectively. These values are comparable to the success rates of other protocols described in human or other animals involving previous DNA extraction. The obtained

results show that non-invasive methods of biological specimen collection that make it possible to analyse the DNA without previous extraction can be easily and routinely applied in rabbit molecular genetic studies. However, due to the higher success rate and the easier method of collection, plucked hairs seem the best source for high-throughput biosampling in this species.

**Key Words:** Rabbit, hair DNA, buccal swabs, biological specimens, direct PCR, *MC1R* mutations.

## INTRODUCTION

Usually, peripheral blood sampling has been the method of choice for preparing animal DNA for a wide range of molecular genetic applications and classical protocols use this biological material for DNA extraction (i.e.: Sambrook *et al.*, 1989). However, its collection requires invasive procedures and the use of anticoagulants, like EDTA or epinephrine, complicating sometimes the sampling and storing. Thus, alternative, simple and non-invasive methods of collecting and preserving biological specimens for DNA extraction can be useful in reducing the discomfort of the involved animals as well as to facilitate these procedures.

For these reasons, several sampling approaches including the use of hairs and buccal swabs have been largely and successfully applied in human epidemiological studies and forensic medicine (Higuchi *et al.*, 1988; Thomson *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1999). The use of hair as source of DNA has been described in dogs and cats (Menotti-Raymond *et al.*, 1997; Oberbauer *et al.*, 2003; Pfeiffer *et al.*, 2004) as well as in wild animals (Sloane *et al.*, 2000; Roon *et al.*, 2003; Frantz *et al.*, 2004) for forensic, genome analysis and population genetic studies. In large farm mammals, like, for example, pigs and cattle, it is common the use of hair roots as source of DNA in PCR studies (Healy *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1996). However, in small mammals, like the rabbits, the use of hair roots has not been described yet. Less frequent in any farm animal is the use of buccal swabs whose collection could be more complicated in large than in small animals (Brooks *et al.*, 2003; Meldgaard *et al.*, 2004).

Then simple PCR protocols accompanying these non-invasive biological specimen collecting methods make it possible to reduce the analysis costs speeding up the laboratory work. A large number of PCR protocols has been described starting from the isolation of DNA using alternative and simple methods. Some of them use directly biological materials, like blood, serum, cerebrospinal fluid, saliva and solid tissues, without any prior DNA extraction step (Mercier *et al.*, 1990; Panaccio *et al.*, 1993; Panaccio *et al.*, 1993a; Liu *et al.*, 1995; Sandford and Pare, 1997; French *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2003). To our knowledge, hair roots and buccal cells have not been

used in direct PCR experiments, yet. Then, visualization of the amplified DNA can be performed using standard gel electrophoresis with ethidium bromide staining or using capillary electrophoresis of dye labelled fragments in automatic sequencers.

We recently identified two mutations in the rabbit melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene (the *Extension* locus) associated with red or black coat colours in different rabbit breeds. These mutations were caused by the deletion of 30 or 6 base pairs (bp) of the single exon *MC1R* gene determining the production of a putative non functional or activated transmembrane receptor, respectively (Fontanesi *et al.*, 2006).

In order to analyse a large number of samples and making easier the collection of rabbit biological materials as well as to reduce the cost and time of the genotyping procedures, here we describe different protocols for the genotyping of mutations identified in the rabbit *MC1R* gene that make use of rabbit hair roots or cell preparations from buccal swabs with a direct PCR amplification without any preliminary step of DNA extraction.

## MATERIALS AND METHODS

### *Hair and buccal swab sampling*

Hair samples were collected from 60 rabbits of different breeds (Belgian Hare, n. = 5; Blue Vienna, n. = 5; Burgundy Fawn, n. = 10; Californian, n. = 10; Checkered Giant, n. = 5; Giant Grey, n. = 4; New Zealand White, n. = 20; commercial hybrid, n. = 1) and preserved for up to 12 months in 1.5 ml polypropylene microtubes at 4°C. Buccal cells were collected from 10 crossbred and purebred rabbits. For all animals the *MC1R* genotype was previously known based on PCR analyses from extracted DNA samples (Fontanesi *et al.*, 2006). For buccal cell sampling, widely available sterile cotton sticks were used to gently scrape of both inner cheeks of the animals. Then the cotton sticks were cut a few mm from the cotton bud that was dropped in a 1.5 ml microcentrifuge tube. Closed tubes were placed for 2-5 days at 4°C.

### *Biological material for direct PCR*

With the help of magnification lens and sterile laboratory forceps and scissors, for each hair sample 5-10 hair roots were clipped a few mm from the root directly within a 0.2 ml PCR tube. Then, the tubes were closed and stored at room temperature (RT) till their use for PCR. This procedure was carried out in a clean and sterile environment and care was taken to avoid cross contamination

between samples. On average, each plucked hair makes it possible to obtain hair roots for about 10 PCR.

The preparation of the buccal cells was modified from Meldgaard *et al.* (2004). Briefly, about 0.6 ml of sterile bidistilled H<sub>2</sub>O was added to the tubes containing the cotton buds prepared as described above. The cotton buds were allowed to soak for 10 min at RT while the tubes were rotating on a suitable device. Then the tubes were vortexed thoroughly and spinned for 30 sec in a microcentrifuge. The tubes were opened and the cotton buds were removed and disposed after having pressed them against the interior surface of the microcentrifuge tube in order to release as much liquid as possible. After, the tubes containing the remained liquid were centrifugated for 5 min at 5,000 rpm. Water was pipetted off while taking care not to disturb the small cell/debris pellet. Then, 50 ul of PCR buffer 1X was added to the pellet and the tubes were vortexed until the pellet disappeared.

Negative controls were incorporated into all biosample preparations.

#### *PCR and genotyping analyses*

Target of the PCR amplification was a 146 bp fragment (dimension of the wild type alleles) of the rabbit *MC1R* gene encompassing the region containing the two deletions associated with different coat colours (Fontanesi *et al.*, 2006). The PCR tubes containing the hair roots were filled with 20 ul of PCR mix and then briefly spinned. PCR mix contained 1 U EuroTaq DNA polymerase (EuroClone Ltd., Paington, Devon, UK), 1X PCR Buffer, 2.5 mM dNTPs, 10 pmol of primer forward (5'-ATCTGCTGCCTGGCCTTG-3') and 10 pmol of primer reverse (5'-CAGATGAGCACGTCGATGA-3'), 1.0 mM of MgCl<sub>2</sub>, bidistilled H<sub>2</sub>O to the final volume of 20 ul. The buccal cells were amplified directly using the same PCR mix described above and as template 5 ul of 1X PCR buffer after the suspension of the cell pellet as indicated in the previous paragraph (thus, each buccal cell preparation makes it possible to perform about 10 PCR). As controls, four samples of rabbit DNA extracted from whole blood using the protocol described in Sambrook *et al.* (1989) and negative controls were used in all PCRs.

PCR profile was as follows: 8 min at 95°C; 40 amplification cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 62°C, 30 sec at 72°C; 10 min at 72°C. PCR was performed using a PT-100 thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA). When the amplified fragments were resolved using capillary electrophoresis in an ABI3100 Avant sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), primer forward was fluorescence labelled at 5' with the dye 6-FAM. For this analysis, PCR products (2 ul reaction product) were diluted in 10 ul of Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and added to



0.1 ul of Rox labelled DNA ladders (500HD Rox, Applied Biosystems). Labelled DNA fragments were scored using GeneScan v. 3.7 and Genotyper v. 3.7 software (Applied Biosystems). PCR primers were not labelled when the detection of the DNA fragments was carried out using 10% 29:1 bis-acrylamide:acrylamide gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

No amplification was detected in all negative controls.

## RESULT AND DISCUSSION

Direct PCR of biological materials or tissues relies on the possibility to get free DNA in solution after the denaturation steps that should lysate cells. However, the presence of *Taq* polymerase inhibitors may prevent PCR amplification and for this reason special PCR mixes have been applied in direct PCR analyses (Panaccio *et al.*, 1993; Panaccio *et al.*, 1993a). Nevertheless, it is possible that biological samples may not require any particular treatment as PCR inhibitors are not abundant or are diluted and do not affect amplification reactions (Fode-Vaughan *et al.*, 2001). Here we tested this possibility in order to routinely continue to carry out PCR without any modification from standard protocols for the analyses of mutations of the rabbit *MC1R* gene. As the genotyping of the two *MC1R* deletions is based on fragment length polymorphisms (Fontanesi *et al.*, 2006), no further treatment of what is produced from the amplification reactions is needed to score the rabbit genotypes making it easier to test new protocols for this analysis. Two sources of biological materials containing DNA were tested: i) hair roots stored for up to one year and ii) buccal cells. Sampling hair is an extremely simple way to collect biological material in rabbits and hundreds of samples can be easily obtained in a short time. Of the 60 analysed samples of the present work we obtained the expected PCR fragment for 54 animals (90% of positive results) in the first attempt of amplification. The six failed samples were then reanalysed taking care to check if the brief spinning of the PCR tubes after the introduction of the PCR mix made it possible to obtain a direct contact of the hair roots with the PCR solution. In the second attempt, for five of them it was possible to obtain the genotype. The reason for which a sample was not possible to amplify was probably due to the low number and/or poor quality of the hair roots selected from a very small pluck of hair. Thus, on the whole, it was possible to genotype ~98% of the samples that is a success rate higher or comparable to what was observed in human or animal forensic and population studies that involved hair DNA extraction protocols (Sloane *et al.*, 2000; Frantz *et al.*, 2004; Pfeiffer *et al.*, 2004; Melton *et al.*, 2005). Figure 1 shows some electropherograms from rabbits with different *MC1R* genotypes. This method is more sensitive as DNA amplified fragments were correctly scored even if the same amplifications checked on polyacrylamide gels could not be clearly visualized. The genotypes

obtained with this method of analysis confirmed the results obtained with polyacrylamide gel electrophoresis analyses.

Then, this protocol was used to test the possibility to detect the genotype at this rabbit locus starting from buccal cell crude preparations without DNA extraction. Of the ten analysed samples, eight gave the expected genotype while for two it was not possible to amplify the DNA even if the amplification step was attempted three times (80% of positive results). Further adjustments to this protocol may be required to obtain a more efficient result. However, it should be considered that this method of cell preparation may produce a very low amount of amplifiable DNA due a direct amplification of the cell debris without previous DNA extraction step. Even if this data has been obtained from a few samples, still this can be considered a high success rate comparing our method to the DNA extraction protocols applied in human forensic and epidemiological studies that used buccal swabs in which PCR was successful in ~75% to ~99% of all cases according to the amplified locus or the method of collection of biosamples (Walker *et al.*, 1999; Feigelson *et al.*, 2001).

The obtained results showed that non-invasive methods of biological specimen collection that make it possible to analyse the DNA can be easily applied in rabbit molecular genetic studies. Direct PCR protocols for the analysis of the *MC1R* gene without preliminary DNA extraction have been tested successfully in this species considering hair roots and buccal cells. Thus, it could be reasonably predicted that the described protocols can work also for other PCR products. However, this has not been tested in the present work and needs further investigations with a particular attention to the possibility to amplify microsatellite loci. As a matter of fact, microsatellite analyses from low quality or low quantity DNA can be affected by two types of genotyping errors: i) allele dropout for which a true heterozygote is scored homozygote and ii) false allele production defined as a PCR-generated allele that is not one of the alleles of the true genotype (Goossens *et al.*, 1998). These problems have not been encountered in the fragment analysis for the *MC1R* gene whose polymorphic sites are not simple sequence repeats: the obtained genotypes in the investigated animals were always as expected from previous data that were produced by PCR from extracted DNA. Probably, a more in-deep evaluation of the error rate of the described genotyping protocols should include a larger number of samples. Nevertheless, it is still possible to consider, before PCR amplification, a DNA extraction step from the two investigated sources of biological material. In this case, it remains the advantage of the simplicity of the methods of specimen collection that are easier than blood sampling.

On the other hand, comparing the results obtained with the use of two sources of biological materials (hairs or buccal cells, due to a higher success rate and an easier method of collection, plucked hairs seem the best source for high-throughput biosampling in the rabbit. Thus we will

continue to use this method for a more in-deep investigation of the rabbit *MC1R* gene polymorphisms that may include analysis of other breeds/lines, family based pedigrees and wild rabbit populations.

Moreover, it should be pointed out that hair root analyses resulted reliable for the genotyping of samples stored for up to one year. Further investigations to evaluate in more detail the storage time between collection and use of this material is under way.

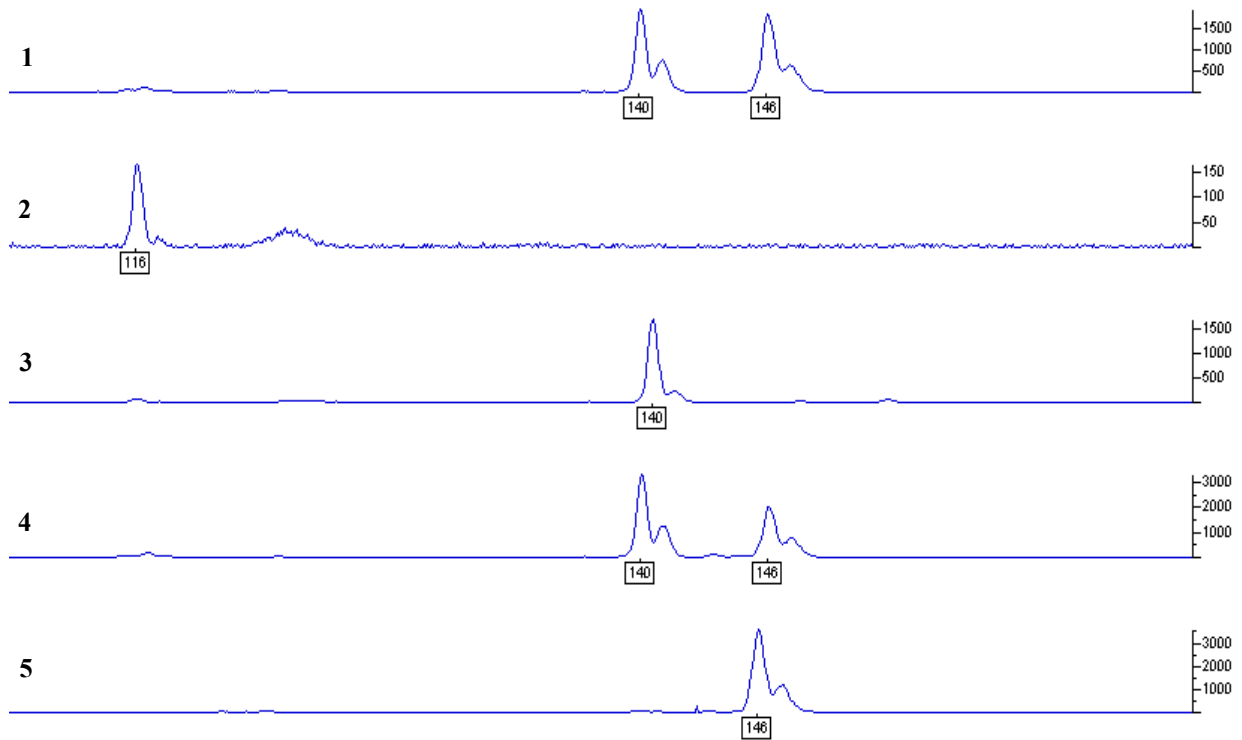
### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by RFO funds from the University of Bologna. We thank several rabbit breeders and Associazione Nazionale Coniglicoltori Italiani (ANCI) for their collaboration in the sampling of biological materials.

### **REFERENCES**

*\*References are included starting at page 132*

**Figure 1: Electropherograms obtained with a capillary sequencer from five rabbits showing different genotypes at the *MC1R* locus. 1 and 4: heterozygous rabbits for the wild type and the 6 bp deletion alleles; 2, homozygous rabbit for the 30 bp deletion allele; 3, homozygous rabbit for the 6 bp allele; 5, homozygous rabbit for the wild type allele.**



# INVESTIGATION OF COAT COLOUR AFFECTING GENES IN SEVERAL EUROPEAN RABBIT BREEDS AND OTHER LEPORID SPECIES

Fontanesi L.<sup>1\*</sup>, Oulmouden A.<sup>2</sup>, Tazzoli M.<sup>1</sup>, Allain D.<sup>3</sup>, Deretz-Picoulet S.<sup>4</sup>, Robinson T.J.<sup>5</sup>, Pecchioli E.<sup>6</sup>, Cook J.<sup>7</sup>, Russo V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, University of Bologna, Via F.lli Rosselli 107, 42100 Reggio Emilia, Italy

<sup>2</sup>UMR1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, INRA/Université de Limoges, 87060 Limoges Cedex, France

<sup>3</sup>UR631, Station d'Amélioration Génétique des Animaux, INRA Toulouse, 31326 Castanet Tolosan, France

<sup>4</sup>UE967, Génétique Expérimentale en Productions Animales, INRA Le Magneraud, 17700 Surgères, France

<sup>5</sup>Dept. of Botany and Zoology, Evolutionary Genomics Group, University of Stellenbosch, PB X1, Matieland 7602, South Africa

<sup>6</sup>Centro di Ecologia Alpina, Viote del Monte Bondone, 38040 Trento, Italy

<sup>7</sup>Museum of Southwestern Biology and Dept. of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NM 87131-0001, USA

\*Corresponding author: luca.fontanesi@unibo.it

## ABSTRACT

Pigmentation in mammals is mainly determined by the distribution of pheomelanin and eumelanin pigments which produce red/yellow and dark phenotypes, respectively. The relative amount of eumelanin and phaeomelanin in the melanocytes is controlled primarily by two loci, the *Extension* and *Agouti* loci. *Extension* locus encodes the melanocortin 1 receptor (*MC1R*). Mutations of the single exon *MC1R* gene causing a constitutively active receptor are dominant and produce black coat colour, whereas inactivating mutations are recessive and result in red/yellow pigmentation. *MC1R* mutations have been identified to alter coat colour and pigment synthesis in several mammals. Analysing almost the complete coding region of the *Oryctolagus cuniculus MC1R* gene,

we recently identified two mutations associated with red (recessive allele *e* of the *Extension* locus) or black (*E<sup>D</sup>* or *E<sup>S</sup>*, dominant black or steel, weaker version of *E<sup>D</sup>*) coat colours in different European rabbit breeds. These mutations were caused by the deletion of 30 bp (c.304\_333del30) or 6 bp (c.280\_285del6) of the *MC1R* gene determining the production of a putative non functional or activated transmembrane receptor, respectively. Here we completed the sequence of the 953 bp coding region of the *MC1R* gene in *O. cuniculus* excluding the presence of additional common disrupting or functional mutations. Moreover, *MC1R* gene sequence was obtained for *Bunolagus monticularis*, *Pentalagus furnessi*, *Romerolagus diazi*, *Sylvilagus floridanus* and *Sylvilagus nuttallii*. dN/dS (dN: number of non-synonymous substitutions; dS: number of synonymous substitutions analysis) suggested a possible action of purifying selection on this gene. *Agouti* locus encodes for the agouti signaling protein (*ASIP*). In mice as well as in other species, loss-of-function mutations (recessive) of the *Agouti* gene determine only the production of eumelanin while gain-of-function mutations (dominant) lead to pheomelanin production. In European rabbit, classical studies have suggested the presence of three alleles at the *Agouti* locus: *A* (wild type allele), *a'* (black and tan) and *a* (non-agouti). We sequenced the *O. cuniculus ASIP* exon 2 region and identified three mutations, Two were synonymous substitutions and one was an insertion of 1 bp. This insertion causes a frameshift of the translation just after the start codon suggesting that this mutation might be the molecular basis of the recessive black non-agouti allele at the *Agouti* locus (*a* allele). Genotyping this mutation in a larger number of animals confirmed the fixation of the insertion in all animals of breeds with black/dark coat colour. Sequencing of the same region was also obtained in another eight Leporid species showing several sequence differences between the *O.cuniculus* sequence.

**Key words:** Coat colour, Agouti signaling protein, Melanocortin 1 receptor, Mutations, *Leporidae*

## INTRODUCTION

Pigmentation in mammals is mainly determined by the distribution of pheomelanin and eumelanin pigments which produce red/yellow and dark phenotypes, respectively. The relative amount of eumelanin and phaeomelanin in the melanocytes is controlled primarily by two loci, the *Extension* and *Agouti* loci (Searle, 1968).

*Extension* locus encodes the melanocyte-stimulating hormone receptor (Robbins *et al.*, 1993), also known as melanocortin 1 receptor (*MC1R*). Mutations of the single exon *MC1R* gene causing a constitutively active receptor are dominant and produce black coat colour, whereas inactivating mutations are recessive and result in red/yellow pigmentation. *MC1R* mutations have been identified to alter coat colour and pigment synthesis in several mammals, like mice (Robbins *et al.*, 1993), human (Valverde *et al.*, 1995), cattle (Klungland *et al.*, 1995), horse (Marklund *et al.*, 1996), fox (Våge *et al.*, 1997), pigs (Kijas *et al.*, 1998), sheep (Våge *et al.*, 1999), dogs (Newton *et al.*, 2000) and other species. Analysing almost the complete coding region of the *Oryctolagus cuniculus* *MC1R* gene, we recently identified two mutations associated with red (recessive allele *e* of the *Extension* locus) or black (*E<sup>D</sup>* or *E<sup>S</sup>*, dominant black or steel, weaker version of *E<sup>D</sup>*) coat colours in different European rabbit breeds (Fontanesi *et al.*, 2006). These mutations were caused by the deletion of 30 bp (c.304\_333del30) or 6 bp (c.280\_285del6) of the *MC1R* gene determining the production of a putative non functional or activated transmembrane receptor, respectively. From our previous study it was not possible to define if the c.280\_285del6 deletion was the causative mutation of the *E<sup>D</sup>* or *E<sup>S</sup>* alleles. Two other synonymous mutations, organized in two haplotypes, were also identified.

*Agouti* locus encodes for the agouti signaling protein (*ASIP*) that is a paracrine signaling molecule antagonist of MSH in binding to *MC1R* and thereby preventing the *MC1R*-*MSH* interaction, resulting in pheomelanin synthesis instead of black/brown eumelanin (Bultman *et al.*, 1992). In mice as well as in other species, loss-of-function mutations (recessive) of the *Agouti* gene determine only the production of eumelanin while gain-of-function mutations (dominant) lead to pheomelanin production (i.e.: Bultman *et al.*, 1992; Kuramoto *et al.*, 2001; Kerns *et al.*, 2004). A variety of coat colours appear as a result of these alterations that show also epistatic or partial epistatic interactions with the *Extension* locus (Searle, 1968; Våge *et al.*, 1997). In European rabbit, classical studies have suggested the presence of three alleles at the *Agouti* locus: *A* (wild type allele), *a'* (black and tan) and *a* (non-agouti) (Robinson, 1958; Searle, 1968).

Coat colour genes are of particular interest to investigate phenotype evolution, signature of selection and adaptive variation in wild populations. A few studies in mice, primates, birds and fish have already reported evidences of the role of *MC1R* and *ASIP* genes in pigmentation evolution and adaptation (i.e.: Mundy and Kelly, 2003; Nachman *et al.*, 2003; Mundy, 2005; Hoekstra *et al.*, 2006; Selz *et al.*, 2007). Moreover, phylogenetic evolutionary studies have used the *MC1R* gene to evaluate functional constrains of protein domains and to compare phylogenetic trees obtained with

other molecular evidences (Klungland *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2007; Selz *et al.*, 2007). However, due to the lack of information on these two colour affecting genes in *Lagomorpha* species, similar studies cannot be carried out for species of this order.

Here, we investigated the *MC1R* and *ASIP* genes with a three fold objective: i) complete the sequence of the *MC1R* European rabbit gene and confirm the association of the reported deletions with coat colour phenotypes across breeds; ii) identify mutations in the *ASIP* gene that could be associated with coat colour phenotypes in European rabbit breeds; iii) obtain sequence information for the *MC1R* and *ASIP* genes in other Leporid species in order to provide the basic tools for evolutionary biology studies.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and DNA Isolation

Sixteen European rabbits (*O. cuniculus*) across 12 breeds or strains with different coat colour (Alaska, n.1; Belgian Hare, n.2; Blue Vienna, n.1; Burgundy Fawn, n.2; Californian, n.1; Checkered Giant with black markings, n.2; pale Siamese Coloured Dwarf, n.1; English Spot with Madagascar markings, n.1; Giant Grey, n.2; Russian, n.1; Silver, n.1; white commercial hybrid, n.1), and one animal for each of five different Leporid species (Riverine rabbit, *Bunolagus monticularis*; Amami rabbit, *Pentalagus furnessi*; Volcano rabbit, *Romerolagus diazi*; Eastern cottontail, *Sylvilagus floridanus*; Mountain cottontail, *Sylvilagus nuttallii*) were used to obtain the *MC1R* gene sequence. Eight European rabbits of different breeds with diverse coat colour (Belgian Hare, Black and Tan, Blue Vienna, Burgundy Fawn, Champagne Argent, Checkered Giant, Giant Grey and Rhinelander) and one animal for each of eight Leporid species (*B. monticularis*; Brown hare, *Lepus europaeus*; Mountain hare, *Lepus timidus*; Snowshoe hare, *Lepus americanus*; *P. furnessi*; *R. diazi*; *S. floridanus*) were used to sequence exon 2 of the *ASIP* gene. Additional 124 European rabbits of 16 different breeds were used for genotyping by PCR-RFLP the *ASIP* exon 2 insertion. European rabbit DNA was isolated from blood and/or hair roots as previously reported (Fontanesi *et al.*, 2006; 2007). DNA for the other Leporid species was isolated from cultured fibroblast cells, blood, muscle samples or ear notches using a standard phenol-chloroform protocol or the DNAeasy Tissue Kit (Qiagen).



## **Polymerase Chain Reactions (PCR)**

Four PCR primer pairs were used to amplify and sequence the *MC1R* gene in the animals listed above. Three primer pairs have been already reported by Fontanesi *et al.* (2006). To complete the sequence of the European rabbit coding region, an additional primer pair was designed aligning the *MC1R* gene in different species. Two primers (forward: 5'-CAGGAAGGCACATCCTCTTT-3'; reverse: 5'-TTCCCAAACCAAAGAAGTCAA-3') were used to amplify and sequence part of intron 1, exon 2 and part of intron 2 of the *ASIP* gene in the animals reported above. PCR was carried out in 20 ul containing 1 U EuroTaq DNA polymerase (EuroClone Ltd.), 1X PCR Buffer, 2.5 mM dNTPs, 10 pmol of each primer and 1.0-2.0 mM of MgCl<sub>2</sub>. PCR profile was as follows: 5 min at 95 °C; 35 amplification cycles of 30 sec at 95 °C, 30 sec at 56-64 °C, 30 sec at 72 °C; 10 min at 72 °C. PCR was performed using a PT-100 (MJ Research) or a T-Gradient (Biometra) thermal cycler.

## **Sequencing Analysis**

PCR products obtained from animals indicated above were sequenced on both strands using the same PCR primers and the BigDye v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Sequencing reactions, after purification steps to eliminate unincorporated labelled nucleotides, were loaded on an ABI3100 Avant sequencer (Applied Biosystem). Sequences were edited and aligned with the help of the CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation) and inspected manually. Estimation of dN/dS ratios (dN: number of non-synonymous substitutions; dS: number of synonymous substitutions) was obtained using the codeml option of the PAML package (Goldman and Yang, 1994).

## **Mutation Analysis**

A PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) protocol with *EcoRI* as a restriction enzyme was set up to analyse the insertion identified in the exon 2 of the European rabbit *ASIP* gene. 5 ul of PCR product was digested overnight at 37 °C with 2 U of *EcoRI* (Roche Diagnostics) in a final volume of 25 ul containing 1X enzyme reaction buffer. The resulting DNA fragments were separated by electrophoresis in 10% polyacrylamide:bis-acrylamide 29:1 gels with TBE 1X buffer and visualized with ethidium bromide on a UV apparatus.

## RESULTS AND DISCUSSION

The complete coding sequence of the European rabbit *MC1R* gene excluded the presence of common additional disrupting or activating mutations except the two deletions already reported by Fontanesi *et al.* (2006). Then, *MC1R* gene sequence information was obtained for other five leporid species (Figure 1). According to the alignment of Figure 1, of the two wild type *O. cuniculus* sequences already described (Fontanesi *et al.*, 2006) the sequence that was originally obtained from Belgian Hare and other breeds (Oc1) is the ancestral form. dN/dS ratio between the Oc1 sequence and that obtained for the other species ranged from 0.0648 to 0.1596 suggesting a possible action of purifying selection on this gene.

**Figure 1: Comparison of *MC1R* variable sites among species (Oc1: *O. cuniculus*, EMBL accession number AM180879; Oc2: *O. cuniculus*, EMBL accession number AM180878; Bm: *B. monticularis*; Pf: *P. furnessi*; Rd: *R. Diazii*; Sf: *S. floridanus*; Sn: *S. nuttallii*. Numbers indicate the position of the sites in the coding region. Dots represent nucleotides identical to the Oc1 *MC1R* gene sequence. Grey highlighted positions denote non-synonymous substitutions. A small region was not sequenced in Sf (lack of dots).**

```

11111222333333333333344444444444455555555555555566666666666777777778899
145580022748911333355680012447889900112334455788021112339900246992734
661545603739126123415392879478790312690140905319262566191858978285960
Oc1 CGGACTCCCACGCCTGCGGGCGCCCCCAATTGGCGTCACCTCACCTTCCATTGTGTATCCCCGCGGT
Oc2 .....A.....T.....
Bm  ..G.CT..G...C...CT..G.....GCC...CGGG.G.G..CCGGGCACCGGC..T..C..CC
Pf  ....C..T.TA..C.....G..C.....G..C.....A..G...TT..CTC..C
Rd  ..A.TC..G...ACA...T.TTTT.G.CC.A.A...T..G.TC.....A..G..G.....C
Sf  TA.T.C.....T.C.T...A...T.TG.CCA.T.....TG..C.....A..A.....C
Sn  TA.T.C.T.....C.T...A.....T..CCA.T.....G..C.....A..A.....TTC.C.C

```

Sequencing of the *O. cuniculus ASIP* exon 2 region revealed three mutations. Two were synonymous substitutions (G>A and G>A) and one was an insertion of 1 bp. This insertion causes a frameshift of the translation just after the start codon obtaining the production of a non functional *ASIP* protein. Disrupting or inactivating mutations in this gene produce recessive black non-agouti phenotypes (allele *a*) in other species (Bultman *et al.*, 1992; Kuramoto *et al.*, 2001; Kerns *et al.*, 2004) suggesting that the insertion identified in exon 2 of the European rabbit *ASIP* gene is the molecular basis of the same allele in this species. This mutation was originally identified by sequencing the amplified product obtained from a Blue Vienna (homozygous) and a Checkered Giant (heterozygous) rabbit. Genotyping this mutation in a larger number of animals confirmed the fixation of the insertion in all Blue Vienna (20 animals), Champagne Argent (18), Alaska (5), Silver

(4) and Russian (2) rabbits. These breeds have black/dark coat colour or black in the background and classical genetic studies have indicated that should be homozygous for the *a* non-agouti recessive allele at the *Agouti* locus (Robinson, 1958). Sequencing of the same region in other eight Leporid species did not identified this insertion. The *O. cuniculus* sequence differed from the three *Lepus sp.* sequences at 9 bp, but the sequences of species of *Lepus* did not diverge from each other. The sequence of *R. diazi* sequence was the most distant from *O. cuniculus* (27 bp different).

## CONCLUSIONS

The complete coding sequence of the European rabbit *MC1R* gene confirmed that the two deletions already reported are involved directly in determining the recessive red and dominant black/steel coat colour phenotypes. However, biochemical and pharmacological studies will be important to investigate the functional role of these two naturally engineered mutations of the *MC1R* gene. Identification of a new functional mutation of the *ASIP* gene associated with the recessive-non agouti black phenotype in *O. cuniculus* opens new perspectives for the study of the interaction between the *Extension* and *Agouti* loci. Moreover, sequences obtained for the *MC1R* and *ASIP* genes in several other leporid species will provide important tools for evolutionary studies in the Order *Lagomorpha*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by University of Bologna RFO funds. We thank Associazione Nazionale Coniglicoltori Italiani (ANCI) for its help during the sampling of European rabbit breeds.

## REFERENCES

*\*References are included starting at page 132*

## 7. CONCLUSIONI

Il gene *MC1R*, il gene *KIT* ed il gene *ASIP* sono di particolare interesse perché sono state recentemente identificate alcune mutazioni che influenzano il colore del mantello nella specie bovina, suina e cunicola.

Per mettere a punto protocolli da poter utilizzare nella tracciabilità di razza questo studio ha preso in esame questi geni con l'obiettivo ultimo di poter identificare, per mezzo dell'analisi del DNA, il colore del mantello degli animali direttamente nei prodotti finiti, quali latte o nei suoi derivati, o carne, e quindi risalire poi indirettamente alla razza.

Lo studio dei polimorfismi al locus *MC1R* nel bovino ha permesso di ottenere la distribuzione dei diversi alleli in 7 razze e una prima valutazione in altre 13 razze bovine allevate in Italia e all'estero.

Da questo studio si è evidenziato che la razza Reggiana è fissata per l'allele *e*, l'allele *E<sup>D</sup>* si trova solo nella Pezzata Nera (Frisona e Valdostana) e che l'allele *E<sup>I</sup>* è presente solo in alcune razze tra cui le principali sono la Bruna, la Rendena e la Grigio Alpina.

Questi tre alleli possono essere utilizzati, almeno in alcuni casi, per la tracciabilità dei prodotti lattiero caseari oltre che della carne prodotta da alcune razze. Altri studi potrebbero risultare interessanti per, eventualmente, identificare altri alleli a questo locus in modo da aumentare l'efficienza nella discriminazione o esclusione della provenienza di un prodotto da una particolare razza. Inoltre, l'approfondimento dello studio del gene *KIT*, associato alla pezzatura e presente solo in fase preliminare in questa tesi, potrebbe permettere di differenziare ulteriormente le razze che differiscono per la distribuzione del colore. Alla luce dei fatti, il gene *KIT* nella specie bovina, non presenta mutazioni razza specifiche risultanti dal sequenziamento della regione codificante del gene stesso.

Infine, è stato verificata, dal punto di vista pratico, analizzando alcuni formaggi e miscele di latte di diverse razze, la possibilità di utilizzare i polimorfismi del gene *MC1R* per l'applicazione in protocolli di tracciabilità di prodotti lattiero caseari "monorazza".

I risultati di questo studio contribuiscono allo sviluppo di procedure innovative per la difesa, la salvaguardia e la valorizzazione di produzioni tipiche "monorazza".

Nella specie suina, invece, l'analisi dei geni *MC1R* e *KIT*, potrebbe prevedere la creazione di un protocollo di tracciabilità e rintracciabilità, utilizzando come strumento la genetica molecolare e basato su un approccio deterministico per i prodotti derivanti da soggetti di razza Cinta Senese.

Lo studio dei geni del mantello è risultato essere un ottimo metodo per discriminare tra i soggetti di questa razza in purezza e le principali razze suine allevate in Italia, e dei rispettivi incroci di prima generazione.

È prevedibile un protocollo che permetta, con un numero limitato di analisi, di distinguere con certezza la razza Cinta Senese dalle razze Large White, Landrace, Duroc e dai rispettivi incroci.

Alcuni aspetti rimangono comunque ancora da definire, come la discriminazione con la razza Hampshire, che però, all'atto pratico, non sembra essere una grave fallanza del metodo di controllo, ed in alcuni casi con la razza Pietrain. Questo sia per il dubbio vantaggio che potrebbe essere ricavato dall'utilizzare la razza Hampshire per la produzione di prodotti stagionati, sia per la scarsa diffusione della razza in Italia.

La ricerca rivestirebbe ancora maggior valore se affiancata da studi di genetica molecolare incentrati sulle mutazioni responsabili di caratteristiche quali-quantitative delle carni, alcune delle quali già note per le razze cosmopolite ed altre oggetto di studio.

Per quanto riguarda invece la specie cunicola, allo stato attuale non sono presenti programmi di tracciabilità di razza in atto, ma alcuni stanno pian piano prendendo forma. Lo studio dei geni che influenzano il colore nel mantello nei conigli può comunque diventare un'utile strumento di tutela di alcune razze autoctone a scapito di altre che si possono riscontrare in commercio.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ACCIAIOLI, A., PUGLIESE, C., BOZZI, R., CAMPODONI, G.,FRANCI, O., GANDINI, G. (2002) Productivity of Cinta Senese and Large White x Cinta Senese pigs reared outdoor on woodlands and indoor. 1. Growth and somatic development. *It. J. Anim. Sci.* 1:171-180.
- ADALSTEINSSON, S., BJARNADOTTIR, S., VAGE, D. I., JONMUNDSSON, J. V., (1995). Brown coat color in Icelandic cattle produced by the loci Extension and Agouti. *J. Hered.* 86:395-398.
- ADAMS M.D., KERLAVAGE A.R., FLEISCHMANN R.D., FULDNER R.A., BULT C.J., LEE N.H., KIRKNESS E.F., WEINSTOCK K.G., GOCAYNE J.D., WHITE O., et al. (1995) Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377, (6547, Suppl.), 3-174.
- AIGNER B., BESENFELDER U., MÜLLER M. & BREM G. (2000). Tyrosinase gene variants in different rabbit strains. *Mammalian Genome* 11, 700-2.
- AMERICAN RABBIT BREEDERS ASSOCIATIONS (1955) Standard of Perfection. Standard Bred Rabbits and Cavies. American Rabbit Breeders Associations Inc., Pittsburgh, PA.
- ARCHIBALD A.L., HALEY C.S., BROWN J.F., COUPERWHITE S., McQUEEN H.A., NICHOLSON D., COPPIETERS W., VAN DE WEGHE A., STRATIL A., WINTERØ A.K., FREDHOLM M., LARSEN N.J., NIELSEN V.H., MILAN D., WOLOSZYN N., ROBIC A., DALENS M., RIQUET J., GELLIN J., CARITEZ J.-C., BURGAUD G., OLLIVIER L., BIDANEL J.-P., VAIMAN M., RENARD C., GELDERMANN H., DAVOLI R., RUYTER D., VERSTEGE E.J.M., GROENEN M.A.M., DAVIES W., HØYHEIM B., KEISERUD A., ANDERSSON L., ELLEGREN H., JOHANSSON M., MARKLUND L., MILLER J.R., ANDERSON DEAR D.V., SIGNER E., JEFFREYS A.J., MORAN C., LE TISSIER P., MULADNO, ROTHSCHILD M.F., TUGGLE C.K., VASKE D., HELM J., LIU H.-C., RAHMAN A., YU T.-P., LARSON R.G., SCHMITZ C.B. (1995) The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mamm. Genome* 6, 157-175.
- ASSOCIAZIONE ITALIANA ALLEVATORI, (2006). Registro Anagrafico delle popolazioni bovine autoctone e gruppi etnici a limitata diffusione. Disciplina del Registro Anagrafico. Web page address: [http://www.aia.it/tecnico/bovini/PubblicazioneRA\\_file/page0001.htm](http://www.aia.it/tecnico/bovini/PubblicazioneRA_file/page0001.htm).
- ASSOCIAZIONE NAZIONALE ALLEVATORI BOVINI RAZZA REGGIANA (2000) La Razza Reggiana. ANABoRaRe, Reggio Emilia, Italy.
- BANDIN M.G., BANDI C., BOLLA P., CAROLI A. E DAMINNI G. (1994) Identificazione e dosaggio di DNA bovino miscelato a DNA di bufalo mediante Polymerase Chain Reaction. *Sci. Tecn. Latt. Cas.* 45, (2), 87-94.
- BARENDSE W., ARMITAGE S.M., KOSSAREK L.M., SHALOM A., KIRKPATRICK B.W., RYAN A.M., CLAYTON D., LI L., NEIBERGS H.L., ZHANG N., GROSSE W.M., WEISS J., CREIGHTON P., MCCARTHY F., RON M.,

- TEALE A.J., FRIES R., MCGRAW R.A., MOORE S.S., GEORGES M., SOLLER M., WOMACK J.E., HETZEL D.J.S. (1994) A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genet.* 6, 227-235.
- BARENDSE W., VAIMAN D., KEMP S.J., SUGIMOTO Y., ARMITAGE S.M., WILLIAMS J.L., SUN H.S., EGGEN A., AGABA M., ALEYASIN S.A., BAND M., BISHOP M.D., BUITKAMP J., BYRNE K., COLLINS F., COOPER L., COPPIETERS W., DENYS B., DRINKWATER R.D., EASTERDAY K., ELDUQUE C., ENNIS S., ERHARDT G., FERRETTI L., FLAVIN N., GAO Q., GEORGES M., GURUNG R., HARLIZIUS B., HAWKINS G., HETZEL J., HIRANO T., HULME D., JORGENSEN C., KESSLER M., KIRKPATRICK B.W., KONFORTOV B., KOSTIA S., KUHN C., LENSTRA J.A., LEVEZIEL H., LEWIN H.A., LEYHE B., LIL L., MARTIN BURRIEL I., MCGRAW R.A., MILLER J.R., MOODY D.E., MOORE S.S., NAKANE S., NIJMAN I.J., OLSAKER I., POMP D., RANDO A., RON M., SHALOM A., TEALE A.J., THIEVEN U., URQUHART B.G.D., VAGE D.-I., VAN DE WEGHE A., VARVIO S., VELMALA R., VILKKI J., WEIKARD R., WOODSIDE C., WOMACK J.E., ZANOTTI M., ZARAGOZA P. (1997) A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mamm. Genome* 8, 21-28.
- BARRINGTON A., PEARSON K. (1906) On the inheritance of coat color in cattle. I. Shorthorn crosses and pure Shorthorn. *Biometrika* 4, 427-437.
- BECKMANN J.S., SOLLER M. (1983) Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67, 35-43.
- BERRYERE, T. G., SCHMUTZ, S. M., SCHIMPF, R. J., COWAN, C. M., POTTER, J., (2003). TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Anim. Genet.* 34:169-175.
- BISHOP M.D., KAPPES S.M., KEELE J.W., STONE R.T., SUNDEN S.L.F., HAWKINS G.A., SOLINAS TOLDO OM R., SOL C.J.A., SALIMANS M.M.M., JANSEN C.L., WERTHEIM VAN DILLEN P.M.E. E VAN DER NOORDAA J. (1990). RAPID AND SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF NUCLEIC ACIDS. *J. CLINIC. MICROBIOL.* 28, 495-503.
- BLOTT, S. C., WILLIAMS, J. L., HALEY, C. S., (1999). Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82:613-619.
- BOOM R., SOL C.J.A., SALIMANS M.M.M., JANSEN C.L., WERTHEIM VAN DILLEN P.M.E. E VAN DER NOORDAA J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clinic. Microbiol.* 28, 495-503.
- BRANCIARI, R., NIJMAN, I. J., PLAS, M. E., DI ANTONIO, E., LENSTRA, J. A., (2000). Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. *J. Food Prot.* 63:408-411.
- BREEM, G., HAROLD, D., RALSTON, S., SHAW, D., ST. CLAIR, D., (2000). Determining SNP allele frequencies in DNA pools. *BioTechniques* 28:464-470.
- BROOKS R., WILLIAMSON J., HENSLEY A., BUTLER E., TOUCHTON G., SMITH E., (2003). Buccal cells as a

- source of DNA for comparative animal genomic analysis. *Biotechnology Lett.*, 25, 451-454.
- BULTMAN S.J., MICHAUD E.J. & WOYCHIK R.P. (1992) Molecular characterization of the mouse Agouti locus. *Cell* 71, 1195-1204.
- BUMSTEAD N., PALYGA J. (1992) - A preliminary linkage map of the chicken genome. *Genomics* 13, 690-697.
- CARRIÓN, D., DAY, A., EVANS, G., MITSUHASHI, T., ARCHIBALD, A., HALEY, C., ANDERSSON, L., PLASTOW, G., (2003). The use of *MC1R* and *KIT* genotypes for breed characterisation. *Arch. Zootec.* 52:237-244.
- CARTER M.J. & MILTON I.D. (1993). An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. *Nucleic Acids Res.* 21, 1044.
- CASTLE W.E. (1905) Heredity of coat characters in guinea pigs and rabbits. Carnegie Institute Washington Publication 23, 1-78.
- CASTLE W.E. (1930) *The Genetics of Domestic Rabbit*. Cambridge Harvard University Press, London, UK.
- CHABOT B., STEPHENSON D.A., CHAPMAN V.M., BRESMER Å., BERNSTEIN A. (1988) The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88-89.
- CHARLIER C., DENYS B., BELANCHE J.I., COPPIETERS W., GROBET L., MNI M., WOMACK J., HANSET R., GEORGES M. (1996) Microsatellite mapping of the bovine roan locus: a major determinant of White Heifer Disease. *Mamm. Genome* 7, 138-142.
- CHEE M., YANG R., HUBBELL E., BERNO A., HUANG X.C., STERN D., WINKLER J., LOCKHART D.J., MORRIS M.S., FODOR S.P.A. (1996) Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274, 610-614.
- CHOWDHARY B.P., RAUDSEPP T., FRONICKE L., SCHERTHAN H. (1998) Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by Zoo-FISH. *Genome Res.* 8, 577-589.
- CHUNG, E. R., KIM, W. T., KIM, Y. S., HAN, S. K., (2000). Identification of Hanwoo meat using PCR-RFLP marker of *MC1R* gene associated with bovine coat color. *Korean J. Anim. Sci.* 42:379-390.
- CIAMPOLINI, R., LEVEZIEL, H., MOZZANTI, E., GROHS, C., CIANCI, D., (2000). Genomic identification of the breed of an individual or its tissue. *Meat Sci.* 54:34-40.
- CONE R.D., LU D., KOPPULA S., VÅGE D.I., KLUNGLAND H., BOSTON B., CHEN W., ORTH D.N., POUTON C. & KESTERSON R.A. (1996) THE MELANOCORTIN RECEPTORS: AGONIST, ANTAGONISTS, AND THE HORMONAL CONTROL OF PIGMENTATION. *RECENT PROGRESS IN HORMONE RESEARCH* 51, 287-318.



- CRAWFORD A.M., DODDS K.G., EDE A.J., PIERSON C.A., MONTGOMERY G.W., GARMONSWAY H.G., BEATTIE A.E., DAVIES K., MADDOX J.F., KAPPES S.M., STONE R.T., NGUYEN T.C., PENTY J.M., LORD E.A., BROOM J.E., BUITKAMP J., SHWAIGER W., EPPLIN J.T., MATTHEW P., MATTHEWS M.E., HULME D.J., BEH K.J., MCGRAW R.A., BEATTIE C.W. (1995) AN AUTOSOMAL GENETIC LINKAGE MAP OF THE SHEEP GENOME. *GENETICS* 140, 703-724.
- CREPALDI, P., MARILLI, M., GORNI, C., MEGGIOLARO, D., CICOGLIA, M., RENIERI, C., (2003). Preliminary study on *MC1R* polymorphism in some cattle breeds raised in Italy. *Ital. J. Anim. Sci.* 2 (Suppl. 1):13-15.
- CREPALDI, P., FORNARELLI, F., MARILLI M., (2005). *MC1R* gene: comparison between different farm animal species. *Ital. J. Anim. Sci.* 4 (Suppl. 2):43-45.
- DAVOLI, R., DALL'OLIO, S., MILC, J., RUSSO, V., (1998). Diffusione dell'allele G di  $\kappa_{S1}$ -caseina in razze bovine allevate in Italia. *Proc. XLI SISVet*, pp. 493-494.
- DE GOTARDI M.J., FREKING B.A., CUTHBERTSON R.P., KAPPES S.M., KEELE J.W., STONE R.T., LEYMASTER K.A., DODDS K.G., CRAWFORD A.M., BEATTIE C.W. (1998) A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mamm. Genome* 9, 204-209.
- DE ROEST, K., MENGHI, A., (2000). Reconsidering 'traditional' food: the case of Parmigiano Reggiano cheese. *Sociologia Ruralis* 40:439-451.
- DONDI G., (1924). *Rivista di Zootecnia* 1:237-245.
- EIZIRIK E., YUHKI N., JOHNSON W.E., MENOTTI-RAYMOND M., HANNAH S.S. & O'BRIEN S.J. (2003) Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Current Biology* 13, 448-53.
- ELLEGREN H., CHOWDHARY B., JOHANSSON M., ANDERSSON L. (1994) - A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of recombination. *Genetics* 137, 1089-1100.
- ERNST C.A. e DENTINE M.R. (1992). Genotyping of dairy cattle using direct amplification of DNA from somatic cells in small volumes of milk. *International Conference on Animal Genetics. ISAG Conference, Interlaken*, pp. 55.
- EVERTS R.E., ROTHUIZEN J. & VAN OOST B.A. (2000) Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (*MC1R*) in Labrador and Golden retrievers with yellow coat colour. *Animal Genetics* 31, 194-9.
- FÉDÉRATION FRANÇAISE DE CUNICULICULTURE (2000) *Le Standard Officiel des Lapins de Race*. FFC, Paris.
- FERNÁNDEZ, A., FABUEL, E., ALVES, E., RODRIGUEZ, C., SILIÓ, L., ÓVILO, C., (2004). DNA tests based on coat colour genes for authentication of the raw material of meat products from Iberian pigs. *J. Sci. Food Agric.* 84:1855-1860.
- FODE-VAUGHAN K.A., WIMPEE C.F., REMSEN C.C., COLLINS M.L., (2001). Detection of bacteria in

- environmental samples by direct PCR without DNA extraction. *Biotechniques*, 31, 598-604.
- FONTANESI L., TAZZOLI M., BERETTI F., RUSSO V., (2006). Mutations in the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Anim. Genet.*, 37, 489-493.
- FONTANESI L., TAZZOLI M., RUSSO V. (2007). Non-invasive and simple methods for sampling rabbit DNA for PCR analysis of melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene mutations: a technical note. *World Rabbit Sci.*, 15, 121-126.
- FOX R.R. & VAN ZUTPHEN L.F.M. (1979) Chromosomal homology of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) linkage group VI with rodent species. *Genetics* 93, 183-8.
- FOX R.R. (1994) Taxonomy and Genetics. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Second edition. (ed. by Manning P.J., Ringler D.H. & Newcomer C.E.), pp 1-26. Academic Press, San Diego, CA.
- FRANCI, O., CAMPODONI, G., BOZZI, R., PUGLIESE, C., ACCIAIOLI, A., GANDINI, G. (2003) Productivity of Cinta Senese and Large White x Cinta Senese pigs reared outdoors in woodlands and indoors. 2. Slaughter and carcass traits. *It. J. Anim. Sci.* 2:59–65.
- FRANCI O., ET AL., (2004). Proc. 5<sup>th</sup> Int. Symposium on Mediterranean Pig. Tarbes, France.
- FRANTZ A.C., SCHAUL M., POPE L.C., FACK F., SCHLEY L., MULLER C.P., ROPER T.J., (2004). Estimating population size by genotyping remotely plucked hair: the Eurasian badger. *J. Appl. Ecol.*, 41, 985-995.
- FREIGELSON H.S., RODRIGUEZ C., ROBERTSON A.S., JACOBS E.J., CALLE E.E., REID Y.A., THUN M.J., (2001). Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10, 1005-1008.
- FRENCH D.J., ARCHARD C.L., ANDERSEN M.T., MCDOWELL D.G., (2002). Ultra-rapid DNA analysis using HyBeacon probes and direct PCR amplification from saliva. *Mol. Cell. Probes*, 16, 319-326.
- GANDINI, G03. *Analisi. C.*, VILLA, E., 20s of the cultural value of local livestock breeds: a methodology. *J. Anim. Breed. Genet.* 120:1-11.
- GANDINI G., FORTINA R., FRANCI O., MADONIA G., MATASSINO D. (2001) In «Pig genetic resources in Europe» pp. 33-40. Editors L. Ollivier, et EAAP publication No.104, Wageningen, The Netherlands.
- GIUFFRÀ E., TÖRNSTEN A., MARKLUND S., BONGCAM-RUDLOFF E., CHARDON P., KIJAS J. M H., ANDERSON S. I., ARCHIBALD A. L., ANDERSSON L. A large duplication associated with dominant white color in pigs originated by homologous recombination between LINE elements flanking *KIT*. *Mamm Genome*. 2002 Oct;13(10):569-77.

- GOLDMAN N., YANG, Z. (1994). A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 11, 725-736.
- GOOSSENS B., WAITS L.P., TABERLET P., (1998). Plucked hair samples as a sources of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Mol. Ecol.*, 7, 1237-1241.
- GRAPHODATSKAYA, D., JOERG, H., STRANZINGER, G., (2002). Molecular and pharmacological characterization of the MSH-R alleles in Swiss cattle breeds. *J. Receptors Signal Transduction* 22:421-430.
- GROENEN M.A., CHENG H.H., BUMSTEAD N., BENKEL B.F., BRILES W.E., BURKE T., BURT D.W., CRITTENDEN L.B., DODGSON J., HILLEL J., LAMONT S., DE LEON A.P., SOLLER M., TAKAHASHI H., VIGNAL A. (2000) A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Res.* 10, 137-147.
- GROENEN M.A., CROOIJMANS R.P., VEENENDAAL A., CHENG H.H., SIWEK M., VAN DER POEL J.J. (1998) A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. *Genomics* 49, 265-274.
- GROSZ, M. D., MACNEIL, M. D., (1999). The "Spotted" locus maps to bovine chromosome 6 in a Hereford-cross population. *J. Hered.* 90:233-236.
- HAWKEN R.J., MURTAUGH J., FLICKINGER G.H., YERLE M., ROBIC A., MILAN D., GELLIN J., BEATTIE C.W., SCHOOK L.B., ALEXANDER L.J. (1999) A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. *Mamm. Genome* 10, 824-830.
- HEALY, P. J., DENNIS, J. A., MOULE, J. F., (1995). Use of hair root as a source of DNA or the detection of heterozygotes for recessive defects in cattle. *Austral. Vet. J.* 72:392.
- HEYEN D.W., BEEVER J.E., DA Y., EVERT R.E., GREEN C., BATES S.R.E., ZIEGLE J.S. E LEWIN H.A. (1997). Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim Genet.* 28, 21-27.
- HIGUCHI R., VON BEROLDINGEN C.H., SENSABAUGH G.F., ERLICH H.A., (1988). DNA typing from single hairs. *Nature*, 332, 543-546.
- HOEKSTRA H.E., HIRSCHMANN R.J., BUNDEY R.A., INSEL P.A., CROSSLAND J.P. (2006). A single aminoacid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. *Science*, 313, 101-104.
- HOSODA T., SATO J.J., SHIMADA T., CAMPBELL K.L. & SUZUKI H. (2005) Independent nonframeshift deletions in the *MC1R* gene are not associated with melanistic coat coloration in three mustelid lineages. *Journal of Heredity* 96, 607-13.
- HUBER C.G., OEFNER P.J., PREUSS E., BONN G.K. (1993) High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acids Res.* 21, 1061-1066.
- INNIS M.A., GELFAUD D.H., SNINSKY J.J. E WHITE T.J. (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academy Press.

- IYER K., CRABTREE J., CLIFTON S. & ROE B.A. (1993). Supercoiled DNA Isolation Using Diatomaceous Earth, Genome Science and Technology, Abstract C35, Genome Sequencing and Analysis Conference V.
- JAGGAR R.T. & MACDONALD C. (1992). Reliable Kit for Recombinant DNA Cloning, Nature, 24.
- JACKSON, I. J., (1997). Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. Hum. Mol. Genet. 6:1613-1624.
- JOERG, H., FRIES, H. R., MEIJERINK, E., STRANZINGER, G. F., (1996). Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. Mamm. Genome 7:317-318.
- KAN Y.S., DOZY A.M. (1978) Antenatal diagnosis of sickle-cell anemia by DNA analysis of amniotic fluid cells. Lancet 2, 910-912.
- KANTANEN, J., OLSAKER, I., BRUSGAARD, K., EYTHORSDDOTTIR, E., HOLM, L. -E., LIEN, S., DANELL, B., ADALSTEINSSON, S., (2000). Frequencies of genes for coat colour and horns in Nordic cattle breeds. Genet. Sel. Evol. 32:561-576.
- KAPPES S.M., KEELE J.W., STONE R.T., MCGRAW R.A., SONSTEGARD T.S., SMITH T.P., LOPEZ-CORRALES N.L., BEATTIE C.W. (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome. Genome Res. 7, 235-249.
- KERNS J.A., NEWTON J., BERRYERE T.G., RUBIN E.M., CHENG J.F., SCHMUTZ S.M., BARSH G.S. (2004). Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd dogs. Mamm. Genome, 15, 798-808.
- KIGUWA S.L., XETALL P., SMITH A.L., CRITCHER R., SWINBURNE J., MILLON L., BINNS M.M., GOODFELLOW P.N., MCCARTHY L.C., FARR C.J., OAKENFULL E.A. (2000) A horse whole-genome-radiation hybrid panel: chromosome 1 and 10 preliminary maps. Mamm. Genome 11, 803-805.
- KIJAS, J. M. H., WALES, R., TÖRNSTEN, A., CHARDON, P., MOLLER, M., ANDERSSON, L., (1998). Melanocortin Receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. Genetics 150:1177-1785.
- KIJAS J. M. H., MOLLER M., PLASTOW G., ANDERSSON L., A frameshift mutation in *MC1R* and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. Genetics. 2001 Jun;158(2): 779-85.
- Klungland, H., Olsen, H. G., Hassanane, M. S., Mahrous, K., Våge, D. I., (2000). Coat colour genes in diversity studies. J. Anim. Breed. Genet. 117:217-224.
- Klungland H., Røed K.H., Nesbø C.L., Jakobsen K.S., Våge D.I. (1999). The melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1-R) gene as a tool in evolutionary studies of Artiodactyles. Hereditas, 131, 39-46.
- KLUNGLAND, H., VÅGE, D. I., GOMEZ-RAYA, L., ADALSTEINSSON, S., LIEN, E., (1995). The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. Mamm.

Genome 6:636-639.

- KRIEGESMANN, B., DIERKES, B., LEEB, T., JANSEN, S., BREINIG, B., (2001). Two breed-specific bovine MC1-R alleles in Brown Swiss and Saler breeds. *J. Dairy Sci.* 84:1768-1771.
- KURAMOTO T., NOMOTO T., SUGIMURA T., USHIJIMA T. (2001). Cloning of the rat agouti gene and identification of the rat nonagouti mutation. *Mamm. Genome*, 12, 469-471.
- LAUVERGNE J.J. (1966) Genetique de la couleur du pelage des bovins domestiques. *Biblio. Genet.* 20, 1-68.
- LEVIN I., SANTANGELO L., CHENG H., CRITTENDEN L.B., DODGSON J.B. (1994) An autosomal genetic linkage map of the chicken. *J. Hered.* 85, 79-85.
- LI X.L., ZHENG G.R., ZHOU R.Y., LI L.H. (2007). Evolution and differentiation of MSHR gene in different species. *J. Hered.*, 98, 165-168.
- LINDGREN G., SANDBERG K., PERSSON H., MARKLUND S., BREEN M., SANDGREN B., CARLSTEN J., ELLEGREN H. (1998) - A primary male autosomal linkage map of the horse genome. *Genome Res.*, 8, 951-966. LITT M., LUTY J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397-401.
- LIPKIN, E., SHALOM, A., KHATIB, H., SOLLER, M., FRIEDMANN, A., (1993). Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 76:2025-2032.
- LIU Y.S., THOMAS R.J.S., PHILLIPS W.A., (1995). Single-step direct PCR amplification from solid tissues. *Nucleic Acids Res.*, 23, 1640.
- LU D., VÅGE D.I & CONE R.D. (1998) A ligand-mimetic model for constitutive activation of the melanocortin-1 receptor. *Molecular Endocrinology* 12, 592-604.
- MADDOX J.F., DAVIES K.P., CRAWFORD A.M., HULME D.J., VAIMAN D., CRIBIU E.P., FREKING B.A., BEH K.J., COCKETT N.E., KANG N., RIFFKIN C.D., DRINKWATER R., MOORE S.S., DODDS K.G., LUMSDEN J.M., VAN STIJN T.C., PHUA S.H., ADELSON D.L., BURKIN H.R., BROOM J.E., BUITKAMP J., CAMBRIDGE L., CUSHWA W.T., GERARD E., GALLOWAY S.M., HARRISON B., HAWKEN R.J., HIENDLEDER S., HENRY H.M., MEDRANO J.F., PATERSON K.A., SCHIBLER L., STONE R.T., VAN HEST B. (2001) An enhanced linkage map of the sheep
- MARILLI, M., FORNARELLI, F., CASALEGGI, M., MILANESI, E., FILIPPINI, F., CREPALDI, P., (2005). *MC1R* gene and coat color of Romagnola breed. Proc. 4<sup>th</sup> World Italian Beef Cattle Congress, Italy, April 29<sup>th</sup>-May 1<sup>st</sup> 2005, 241-246.
- MARKLUND L., JOHANSSON MOLLER M., HØYHEIM B., DAVIES W., FREDHOLM M., JUNEJA R.K., MARIANI P., COPPIETERS W., ELLEGREN H., ANDERSSON L. (1996) A comprehensive linkage map of the pig

- based on a wild pig – Large White intercross. *Anim. Genet.*, 27, 255-269.
- MARKLUND L., JOHANSSON MOLLER M., SANDBERG K., ANDERSSON L. (1996) A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm. Genome* 7, 895-899.
- MARKLUND S., KIJJAS J., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., RÖNNSTRAND L., FUNA K., MOLLER M., LANGE D., EDFORS-LILJA I., ANDERSSON L. (1998) Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome Res.* 8, 826-833.
- MASON, I. L., (1996). A world dictionary of livestock breeds, types and varieties. Fourth Edition, CABI publisher, Wallingford, UK.
- MASRI S.A., NGUYEN P.T., GALE S.P., HOWARD C.J. E JUNG S.-C. (1997) A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Can. J. Vet. Res.* 61, 15-20.
- MAUDET, C., LUIKART, G., TABERLET, P., (2002). Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J. Anim. Sci.* 80:942-950.
- MAUDET, C., TABERLET, P., (2001). Detection of cows' milk in goats's cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *J. Dairy Res.* 68:229-235.
- MAUDET, C., TABERLET, P., (2002). Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin receptor 1 (*MC1R*) gene polymorphism. *J. Dairy Sci.* 85:707-715.
- MELDGAARD M., BOLLEN P.J.A., FINSEN B., (2004). Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR. *Lab. Anim.*, 38, 413-417.
- MELTON T., DIMICK G., HIGGINS B., LINDSTROM L., NELSON K., (2005). Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs. *J. Forensic Sci.*, 50, 73-80.
- MENOTTI-RAYMOND M.A., DAVID V.A., O'BRIEN S.J., (1997). Pet cat hair implicates murder suspect. *Nature*, 386, 774.
- MERCIER B., GAUCHER C., FEUGEAS O., MAZURIER C., (1990). Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic Acids Res.*, 18, 5908.
- MOUNTJOY, K. G., ROBBINS, L. S., MORTRUD, M. T., CONE, R. D., (1992). The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257:1248-1251.
- MUNDY N.I. (2005). A window on the genetics of evolution: *MC1R* and plumage colouration in birds. *Proc. Biol. Sci.*, 272, 1633-1640.
- MUNDY N.I., KELLY J. (2003). Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. *Am. J. Physical Anthropol.*, 121, 67-80.
- NACHMAN M.W., HOEKSTRA H.E., D'AGOSTINO S.L. (2003). The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 5268-5273.
- NAKAMURA Y., LEPPERT M., O'CONNELL P., WOLFF R., HOLM T., CULVER M., MARTIN C., FUJUMOTO E.,

- HOFF M., KUMLIN E., WHITE R. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616-1622.
- NEGRINI, R., MILANESI, E., MOAZAMI-GOUDARZI, K., LALOÉ, D., CHEGDANI, F., BERNARDI, J., LENSTRA, J. A., AJMONE-MARSAN, P., (2003). Preliminary comparison between microsatellite and AFLP multilocus genotypes for bovine breed assignment. *Ital. J. Anim. Sci.* 2(Suppl.1):22-24.
- NEIMANN-SORENSEN A., ROBERTSON A. (1961) The associations between blood groups and several production characters in three Danish cattle breeds. *Acta Agricul. Scandin.* 11, 163-196.
- NEWTON, J. M., WILKIE, A. L., HE, L., JORDAN, S. A., METALLINOS, D. L., HOLMES, N. G., JACKSON, I. J., BARSH, G. S., (2000). Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm. Genome* 11:24-30.
- O'BRIEN S.J., MENOTTI-RAYMOND M., MURPHY W.J., NASH W.G., WIENBERG J., STANYON R., COPELAND N.G., JENKINS N.A., WOMACK J.E., MARSHALL GRAVES J.A. (1999) The promise of comparative genomics in mammals. *Science* 286, 458-481.
- OBERBAUER A.M., GROSSMAN D.I., EGGLESTON M.L., IRION D.N., SCHAFFER A.L., PEDERSEN N.C., BELANGER J.M., (2003). Alternatives to blood as a source of DNA for large-scale scanning studies of canine genome linkages. *Vet. Res. Commun.*, 27, 27-38.
- OLSEN H. G., VÅGE D. I., LIEN S., KLUNGLAND H. (2000) A DNA polymorphism in the bovine *c-kit* gene. *Animal Genetics* 31, 71.
- OLSON, T. A., (1999). Genetics of colour variation. In: R. Fries, A. Ruvinsky (Eds); *The genetics of the cattle*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 33-53.
- ONSLow H. (1922) Inheritance of "steel" coat colour in rabbits. *Journal of Genetics* 12, 91-9.
- ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HAYASHI K., SEKIYA T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2766-2770.
- PANACCIO M., GEORGESZ M., HOLLYWELL C., LEW A., (1993). Direct PCR from solid tissues without DNA extraction. *Nucleic Acids Res.*, 21, 4656.
- PANACCIO M., GEORGESZ M., LEW A.M., (1993)a. FoLT PCR: a simple PCR protocol for amplifying DNA directly from whole blood. *Biotechniques*, 14, 238-243.
- PFEIFFER I., VÖLKEI I., TÄUBERT H., BRENIIG B., (2004). Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Sci. Int.*, 141, 149-151.
- PINDER S.J., PERRY B.N., SKIDMORE C.J. E SAVVA D. (1991). Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction. *Anim. Genet.* 22, 11-20.
- PUNNETT R.C. (1912) Inheritance of coat colour in rabbits. *Journal of Genetics* 2, 221-38.
- PUNNETT R.C. (1915) Further experiments on the inheritance of coat colour in rabbits. *Journal of*

Genetics 5, 38-50.

- RAIMONDI R., (1955). Istituto Zootecnico e Caseario per il Piemonte, Torino.
- REINSCH, N., THOMSEN, H., XU, N., BRINK, M., KALM, E., BROCKMANN, G. A., GRUPPE, S., KÜHN, C., SCHWERIN, M., LEYHE, B., HIENDLEDER, S., ERHARDT, G., MEDJUGORAC, I., RUSS, I., FÖRSTER, M., REENTS, R., AVERDUNK, G., (1999). A QTL for the degree of spotting in cattle shows synteny with the *KIT* locus on chromosome 6. *J. Hered.* 90:629-634.
- REXOAD C.E.3RD, OWENS E.K., JOHNSON J.S., WOMACK J.E. (2000) A 12,000 rad whole genome radiation hybrid panel for high resolution mapping in cattle: characterization of the centromeric end of chromosome 1. *Anim. Genet.* 31, 262-265.
- RINGHOLM A., KLOVINS J., RUDZISH R., PHILLIPS S., REES J. & SCHIÖTH H.B. (2004) Pharmacological characterization of loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor that are associated with red hair. *Journal of Investigative Dermatology* 123, 917-23.
- RITLAND K., NEWTON C. & MARSHALL H.D. (2001) Inheritance and population structure of the white-phased "Kermode" black bear. *Current Biology* 11, 1468-72.
- ROBBINS, L. S., NADEAU, J. H., JOHNSON, K.,R., KELLY, M. A., ROSELLI-REHFUSS, L., BAACK, E., MOUNTJOY, K. G., CONE, R. D., (1993). Pigmentation phenotypes of variant Extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72:827-834.
- ROBINSON R. (1958) Genetic studies of the rabbit. *Bibliographia Genetica* 17, 229-558.
- ROBINSON R. (1984) Rabbit. In: *Evolution of Domesticated Animals.* (ed. by Mason I.L.), pp. 239-46. Longman, London.
- ROBBINS L.S., NADEAU J.H., JOHNSON K.R., KELLY M.A., ROSELLI-REHFUSS L., BAACK E., MOUNTJOY K.G., CONE R.D. (1993) Pigmentation phenotypes of variant Extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827-34.
- ROHRER G.A., ALEXANDER L.J., HU Z., SMITH T.P.L., KEELE J.W., BEATTIE C.W. (1996) A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res.* 6, 371-391.
- ROHRER G.A., ALEXANDER L.J., KEELE J.W., SMITH T.P.L., BEATTIE C.W. (1994) A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 136, 231-245.
- ROLANDO, A., DI STASIO, L., (2006). *MC1R* gene analysis applied to breed traceability of beef. *Ital. J. Anim. Sci.* 5:87-91.
- ROON D.A., WAITS L.P., KENDALL K.C., (2003). A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Mol. Ecol. Notes*, 3, 163-166.
- ROSENBLUM E.B., HOKSTRA H.E. & NACHMAN M.W. (2004) Adaptive reptile color variation and the evolution of the *MC1R* gene. *Evolution* 58, 1794-1808.
- ROUZAUD, F., MARTIN, J., GALLET, P. F., DELOURME, D., GOULEMONT-LEGER, V., AMIGUES, Y., MÉNISSIER, F.,



- LEVÉZIEL, H., JULIEN, R., OULMOUDEN, A., (2000). A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (*MC1R*). *Genet. Sel. Evol.* 32:511-520.
- ROYO, L.J., ÁLVAREZ, I., LUQUE, A.J., FERNÁNDEZ, I., DE ARGÜELLO, S., MOLINA, A., ROBLES, M., GOYACHE, F., (2003). Genotipado del locus Extension (*MC1R*) en cinco razas bovinas españolas de capa castaña. *Proceedings of the X Jornadas sobre Producción Animal, Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, Zaragoza, Spain, 14 – 16 May 2003.*
- RUSSO V., DALL'OLIO S., DAVOLI R., COSTELLI M.B., BIGI D., (1996). Studio del locus Alotano nelle razze suine allevate in Italia. *Zootec. Nutr. Anim.*, 22, 33-38.
- RUSSO, V., MARIANI, P., 1975. Modenese e Reggiana. Stato attuale e prospettive di due razze bovine che vanno scomparendo. *L'Italia Agricola* 113 (3):56-72.
- RUSSO, V., FONTANESI, L., (2004). Coat colour gene analysis and breed traceability. pp 95-100 in *Proc. 7<sup>th</sup> World Brown Swiss Conference, Verona, Italy.*
- RUSSO, V., FONTANESI L., DAVOLI R., CHIOFALO L., LIOTTA L., ZUMBO A. (2004) Analysis of single nucleotide polymorphisms in major and candidate genes for production traits in Nero Siciliano pig breed. *It. J. Anim. Sci.* 3:19-29.
- RUSSO V., ET AL., (1993). *Zoot. Nutr. Anim.* 19 :89-93.
- RUSSO V., ET AL., (2004). *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Symposium on Mediterranean Pig. Tarbes, France.*
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F. & MANIATIS T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.*
- SANDFORD A.J. (1986) *The Domestic Rabbit. Fourth Edition. Collins Professional and Technical Books, London, UK.*
- SANDFORD A.J., PARE P.D., (1997). Direct PCR of small genomic DNA fragments from serum. *Biotechniques*, 23, 890-892.
- SEARLE, A. G., 1968. *Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals. Logos Press, London, UK.*
- SEITZ J.J., SCHMUTZ S.M., THUE T.D., BUCHANAN F.C. (1999) A missense mutation in the bovine MGF gene is associated with the roan phenotype in Belgian Blue and Shorthorn cattle. *Mammalian Genome* 10, 710-712.
- SELZ Y., BRAASCH I., HOFFMANN C., SCHMIDT C., SCHULTHEIS C., SCHARTL M., VOLFF J.N. (2007). Evolution of melanocortin receptors in teleost fish: the melanocortin type 1 receptor. *Gene*, 401, 114-122.
- SHORT T. H., M. F. ROTHSCHILD, O. I. SOUTHWOOD, D. G. MCLAREN, A. DE VRIES, H. VAN DER STEEN, G. R. ECKARDT, C. K. TUGGLE, J. HELM, D. A. VASKE, A. J. MILEHAM, AND G. S. (1997). PLASTOW. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig

- lines. *J. Anim. Sci.* 1997 75: 3138-3142.
- SLOANE M.A., SUNNUCKS P., ALPERS D., BEHEREGARAY L.B., TAYLOR A.C., (2000). Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censuring method. *Mol. Ecol.*, 9, 1233-1240.
- SPONENBERG D.P. (1996) *Equine Color Genetics*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- SWINBURNE J., GERSTENBERG C., BREEN M., ALDRIDGE V., LOCKHART L., MARTI E., ANTCZAK D., EGGLESTON-SCOTT M., BAILEY E., MICKELSON J., ROED K., LINDGREN G., VON HAERINGEN W., GUERIN G., BJARNASON J., ALLEN T., BINNS M. (2000) First comprehensive low-density horse linkage maps based on two 3-generation, full sibling, cross-bred horse reference families. *Genomics* 66, 123-134.
- SYVÄNEN A.-C. (1999) From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.* 13, 1-10.
- TAKEUCHI S., SUZUKI H., YABUCHI M. & TAKAHASHI S. (1997) A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochimica et Biophysica Acta* 1308, 164-8.
- THERON E., HAWKINS K., BERMINGHAM E., RICKLEFS R. & MUNDY N.I. (2001) The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: a point mutation in the *MC1R* gene is perfectly associated with the melanic plumage morph in the bananaquit (*Coereba flaveola*). *Current Biology* 11, 550-7.
- THOMSON D.M., BROWN N.N., CLAGUE A.E., (1992). Routine use of hair root or buccal swab specimens for PCR analysis: Advantages over using blood. *Clin. Chim. Acta*, 207, 169-174.
- VÅGE, D. I, KLUNGLAND, H., LU, D., CONE, R. D., (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm. Genome* 10:39-43.
- VÅGE D.I, LU D.S., KLUNGLAND H., LIEN S., ADALSTEINSSON S., CONE R.D. (1997) A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nature Genetics* 15, 311-5.
- VAIMAN D., SCHIBLER L., BOURGEOIS F., OUSTRY A., AMIGUES Y., CRIBIU E.P. (1996) - A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics* 144, 279-305.
- VALVERDE, P., HEALY, E., JACKSON, I., REES, J. L., THODY, A. J., (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genet.* 11: 328-330.
- VANETTI, M., SCHONROCK, C., MEYERHOF, W., HOLLT, V., (1994). Molecular cloning of a bovine MSH receptor which is highly expressed in the testis. *FEBS Lett.* 348:268-272.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. (1995) AFLP – a new technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids*

Res. 23, 4407-4414.

- WALKER A.H., NAJARIAN D., WHITE D.L., JAFFE J.M., KANETSKY P.A., REBBECK T.R., (1999). Collection of genomic DNA by buccal swabs for polymerase chain reaction-based biomarker assays. *Environm. Health Perspectives*, 107, 517-520.
- WALSH, P. S., METZGER, D. A., HIGUCHI, R., (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513.
- WEBER J.L., MAY P.E. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 388-396.
- WELSH J., McCLELLAND M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI A.J., TINGERY S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- WILLIS E.H., MARDIS E.R., JONES W. E LITTLE M.C. (1990). Prep-A-gene: A superior matrix for the purification of DNA and DNA fragments. *BioTechniques* 9, 1.
- WOMACK J.E., JOHNSON J.S., OWENS E.K., REXROAD C.E. 3RD, SCHLAPFER J., YANG Y.P. (1997) A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. *Mamm. Genome* 8, 854-856.
- WONG L.-J.C., LUETH M., LI X.-N., LAU C.C., VOGEL H., (2003). Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients. *Cancer Res.*, 63, 3866-3871.
- WRIGHT F.A., LEMON W.J., ZHAO W.D., SEARS R., ZHUO D., WANG J.P., YANG H.Y., BAER T., STREDNEY D., SPITZNER J., STUTZ A., KRAHE R., YUAN B. (2001) A draft annotation and overview of the human genome. *Genome Biol.* 2, 1-18.
- WRIGHT S. (1917) COLOUR INHERITANCE IN MAMMALS. *J. HERED.* 8, 224-235.S., FRIES R., GROSZ M.D., YOO J., BEATTIE C.W. (1994) A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136, 619-639.

## 9. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Vincenzo Russo, il Prof. Paolo Bosi e la Prof.ssa Roberta Davoli per il coordinamento scientifico del lavoro di ricerca e per la disponibilità sempre mostrata.

Ancora desidero ringraziare il Dott. Luca Fontanesi i buoni consigli, per avermi insegnato le tecniche di laboratorio che si sono rese necessarie per compiere questo lavoro, per l'aiuto durante la stesura di questa tesi, ma soprattutto per la pazienza avuta nei miei confronti in molteplici occasioni.

Inoltre desidero ringraziare, la Dott.ssa Francesca Beretti, la Dott.ssa Michela Colombo, la Dott.ssa Camilla Speroni, la Dott.ssa Viviana Valastro, la Dott.ssa Silvia Braglia, la Dott.ssa Irma Nisi, la Dott.ssa Sara De Filippi, il Dott. Paolo Trevisi, il Dott. Marco Comella, per l'aiuto e l'impeccabile collaborazione fornitami.

Ringrazio l'A.I.A, l'A.N.A.Bo.Ra.Re. nella stimata persona del Dott. Clinio Villa, l'A.N.A.R.B., l'A.N.A.P.R.I. nella persona della Dott.ssa Sara Dal Mas, l'A.P.A. di Verona nelle persone del Dott. Adriano Bosco, Marco Ulivieri, Dott. Franco Benato e tutto lo staff tecnico, nonché Diego Celebron dell'A.P.A. di Vicenza, e tutti gli allevatori per la disponibilità concessami durante le operazioni di campionamento.

Ancora desidero ringraziare l'A.N.C.I. ( Associazione Nazionale Coniglicoltori Italiani) per la disponibilità dimostrata durante le operazioni di campionamento.

Un particolare ringraziamento va al Prof. Oreste Franci, al Dott. Riccardo Bozzi e al Dott. Alessandro Crovetto dell'Università di Firenze.

Grazie a tutto lo staff dell'University of Illinois department of Animal Science, nelle persone del Prof. Jonathan Beever and Lawrence Schook, Brandy Marron, Alysta Markey, Stacey Meyers, Erin Wagner, per l'ospitalità dimostratami e per la pazienza infinita nei miei confronti.

Ringrazio il piccolo Francesco per l'aiuto fornitomi nella stesura di questa tesi, e per avermi fatto capire che non vale la pena arrabbiarsi se non si riesce a trovare un coniglio nero...

Il ringraziamento più grande, però, va ai miei genitori Giancarlo ed Anna per avermi sostenuto sempre ed incondizionatamente, per tutti i loro sacrifici, ma soprattutto per quello che mi hanno insegnato che va ben oltre qualsiasi laurea o dottorato di ricerca.