

LA TRACCIABILITÀ DI RAZZA DELLA CARNE OVINA CON METODOLOGIE DI GENETICA MOLECOLARE: RISULTATI PRELIMINARI

THE BREED TRACEABILITY OF SHEEP MEAT BY USING MOLECULAR GENETICS METHODS: PRELIMINARY RESULTS

Bramante A.¹, Cecchi F.¹, Ciani E.², Castellana E.², D'Andrea M.S.³, Pilla F.³, Ciampolini R.¹

¹Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa, Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti

²Facoltà di Scienze Biotecnologiche dell'Università di Bari, Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale

³Facoltà di Agraria, Università degli Studi del Molise, Dipartimento SAVA

SUMMARY

Safety and quality foods of animal origin are extremely important for consumers. The aim of this work was to evaluate the feasibility of a method to track the breed origin of sheep meat all along the production chain using molecular genetics tools. A total of 800 samples evenly distributed among seven Italian sheep breeds have been typed at 19 STR markers, together with 90 samples from both imported sheep animals and local crossbred animals withdrawn at slaughterhouses. A maximum likelihood assignment test was adopted to evaluate STR ability to allocate samples to their true breed of origin. Sarda animals were all correctly allocated, as well as more than 98% of samples from the other breeds. Only slightly worst allocation performances were observed for imported and crossbred animals. Preliminary results seem quite promising, though further analyses will be needed in order to better understand the statistical power of such an assignment test before implementation in the sheep meat production chain.

KEYWORDS

Breed traceability, STR markers, probabilistic approach, likelihood, sheep products

INTRODUZIONE

L'ovinicoltura gioca un ruolo di estrema importanza sul territorio nazionale, soprattutto per le aree interne ed insulari svantaggiate e marginali, con importanti ripercussioni dal punto di vista sociale, economico ed ambientale. La garanzia di sicurezza e qualità del prodotto alimentare di origine animale è un problema estremamente sentito dai produttori, trasformatori, distributori e soprattutto dai consumatori. Nonostante alcuni accorgimenti, il sistema attualmente applicato è esposto a rischi, per la possibilità di interferire sulla filiera con deviazioni dolose o colpose, non sempre facilmente evidenziabili. Un sistema di tracciabilità del prodotto, effettuato con metodiche di genetica

molecolare può essere risolutivo dal momento che il DNA rappresenta una vera e propria etichetta indelebile ed inalterabile che accompagna l'animale dalla nascita alle tavole del consumatore, e permette di risalire dalla carne in qualunque stadio della catena produttiva e distributiva, all'identità dell'animale che l'ha prodotta e/o alla sua razza d'origine. I risultati di questa ricerca contribuiscono alla protezione della carne ovina italiana integrando un sistema di certificazione e di controllo dei processi e dei prodotti mediante metodologie genomiche per la rintracciabilità delle razze allo studio. Con la presente ricerca si è inteso realizzare un sistema di rintracciabilità della carne ovina basato sulla tipizzazione di marcatori genetici in tessuti o tagli di carne, prelevati nei diversi li-

velli della filiera produttiva e distributiva.

MATERIALI E METODI

Oggetto della ricerca sono state le maggiori razze autoctone dell'Italia meridionale continentale: Altamura, Bagnolese, Gentile di Puglia, Laticauda, Leccese, Sarda e Comisana; sono stati inoltre campionati capi di importazione di provenienza estera reperibili sul mercato italiano. A partire dalle informazioni raccolte attraverso le indagini aziendali e dai dati provenienti dal Libro Genealogico, è stato individuato, per ogni razza, un campione costituito da soggetti non imparentati almeno fino alla terza generazione, assortito in modo da assicurare la maggiore rappresentatività sul territorio di ciascuna realtà genetica. Per ogni razza oggetto di studio sono stati campionati 100 soggetti provenienti da più aziende rappresentative dell'intera area di allevamento. Al fine di effettuare le analisi di rintracciabilità genetica sui prodotti, che comunemente si trovano realmente in commercio in periodi stagionali di massima richiesta del mercato, sono stati campionati in date diverse, campioni biologici di DNA di soggetti di importazione di origine razziale ignota, unitamente a soggetti meticcii di provenienza nazionale prodotti di incrocio, provenienti da zone di vendita diverse, per un totale di 90 capi.

Per ciascun soggetto sono stati prelevati 2 ml di sangue periferico, conservato a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA effettuata mediante utilizzo del kit GenElute Blood Genomic Dna Kit Minipreps (Sigma-Aldrich).

Sono stati considerati 19 marcatori genomici STR selezionati dal panel proposto dalla Commissione ISAG/FAO per la "Measurement of Domestic Animal Diversity" (1). Per ognuno di essi sono state elaborate delle reazioni teoriche di amplificazione in multiplex e considerate eventuali sostituzioni, sulla base delle valutazioni e delle informazioni ottenute dalle banche genomiche.

L'analisi dei marcatori STR è stata condotta con 5 reazioni di multiplex-PCR utilizzando il kit commerciale Multiplex PCR Kit (Cat. N° 206143, QIAGEN). Gli amplificati sono stati separati ed analizzati in elettroforesi capillare mediante sequenziatore automatico ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Per ogni campione, sono state ottenute le taglie alleliche dei 19 marcatori analizzati. Il dato molecolare grezzo è stato categorizzato e sottoposto all'analisi statistica relativa ai parametri di genetica di popolazione. Quest'analisi preliminare è necessaria al fine di valutare la fattibilità di un test di assegnazione di razza (2). Il metodo proposto richiede infatti il rispetto dell'equilibrio di Hardy Weinberg, l'assenza di linkage disequilibrium tra loci, oltre

ad un minimo grado di separazione tra le razze, parametro importante per la precisione di assegnazione (3). Mediante il software Arlequin sono stati calcolati l'eterozigosi osservata e attesa e la significatività della differenza tra questi valori (deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg per ogni marcatore, per ogni razza), il numero di alleli per marcatore, per razza ed il test di assegnazione degli individui alla popolazione di appartenenza. Il software Arlequin analizza i profili allelici degli individui e restituisce un valore di likelihood (verosimiglianza) di ogni individuo, di appartenere ad ognuna delle razze analizzate. Il valore più alto corrisponde alla razza alla quale è più probabile che l'individuo appartenga. I valori di likelihood restituiti dal software sono stati confrontati tra razze, soggetto per soggetto, allo scopo di identificare la presenza di errori di assegnazione. Mediante una funzione implementata su foglio di calcolo Excel, per ogni individuo è stato verificato che il valore di likelihood più alto corrispondesse alla probabilità di appartenere alla razza corretta piuttosto che a qualsiasi altra tra quelle analizzate. La verifica è possibile in questa fase di ottimizzazione della metodica dato che il lavoro è condotto su campioni di cui è nota la provenienza. Al fine di determinare l'appartenenza o meno di un determinato campione biologico ad una specifica razza, è stata inoltre utilizzata la funzione di Tracciabilità Razziale implementata nel Software "TraceDNA2" creato dal nostro gruppo di ricerca (dati non ancora pubblicati).

Il Software TraceDNA2 ha confrontato i genotipi multilocus ottenuti dai campioni biologici dei prodotti commercializzati prelevati sul mercato, con i genotipi multilocus delle razze presenti nel database oggetto di confronto.

RISULTATI

Per i 19 marcatori analizzati è stato evidenziato un buon grado di polimorfismo, con un totale di 338 alleli, un numero di alleli per marcatore variabile tra 10 (locus BM1824) e 31 (locus MAF214), ed un numero medio di alleli per locus pari a 17,79 ($\pm 4,95$) (Tabella 1).

Adottando l'approccio di *maximum likelihood* per il campione relativo alla popolazione complessiva, costituito dai dati genotipici, tutti i soggetti di razza Sarda (N=99) sono assegnati correttamente alla razza d'origine e per tutte le altre razze le percentuali di corretta assegnazione superano il 98%. I loci STR mostrano di avere una buona *performance* di corretta attribuzione per la coppia di razze campane. A titolo di esempio in figura 1 è riportato il risultato relativo a 4 razze oggetto di studio. Come è possibile osservare le razze Sarda e Altamura sono

perfettamente discriminate, mentre le razze Bagnolese e Laticauda vengono discriminate con un livello di precisione inferiore dovuto alla for-

te similarità genetica esistenza tra le due popolazioni.

Tabella 1 Localizzazione Cromosomica marcatori STR e numerosità allelica riscontrata nelle razze allo studio

Marcatori STR	BM1824	BM8125	ILSTS11	ILSTS5	ILSTS28	INRA063	MAF214	MAF65	MAF70	MAF209	
Localizzazione Cromosomica	1	17	9	7	3	14	16	15	4	17	
Totale Nr. alleli riscontrati	10	11	14	18	24	20	31	12	21	18	
Marcatori STR	MAF33	MCM140	OarAE129	OarJMP29	OarFCB128	OarFCB193	OarFCB304	OarJMP58			
Localizzazione Cromosomica	9	6	5	24	2	11	19	26			
Totale Nr. alleli riscontrati	18	17	14	21	16	18	21	20	Media	Deviazione Standard	
									17,79	4,95	

Figura 1: Grafici dei valori di *log-likelihood ratio* ottenuti mediante analisi con loci STR per le coppie Altamura vs Sarda (a) e Bagnolese Laticauda (b)

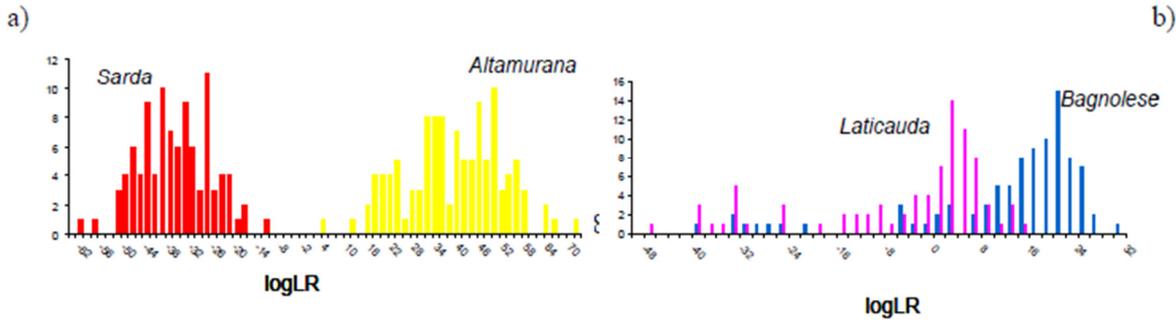


Figura 2: Risultato di Attribuzione di Identità Razziale per i Capi di importazione provenienti dalla Romania.

Campione	V2805TEST	
razza	-78,03924424	Leccese
razza	-93,06991151	Altamura
razza	-64,28024345	Capi importazione Romania
razza	-76,10302345	Sarda
razza	-80,05473186	Capi importazione Spagna
Campione	V2802TEST	
razza	-64,93766817	Capi importazione Romania
razza	-58,4713582	Merinizate
razza	-58,12356547	Laticauda
razza	-65,74419031	Sarda
razza	-59,45667307	Comisana
razza	-66,36230049	Altamura
Campione	V2804TEST	
razza	-70,69617389	Laticauda
razza	-76,25011641	Leccese
razza	-69,23132385	Comisana
razza	-81,11127848	Capi importazione Spagna
razza	-78,97838756	Altamura
razza	-69,96181223	Bagnolese
razza	-74,38366529	Guazzabuglio
Campione	V2806TEST	
razza	-67,84707512	Altamura
razza	-77,42949458	Capi importazione Ungheria
razza	-62,46343982	Bagnolese
razza	-64,77848672	Agnelli Trimeticci
razza	-64,25870468	Sarda

In figura 2 si riporta a titolo esemplificativo un file di output del Software riguardante l'attribuzione di identità razziale dei capi di importazione provenienti dalla Romania. Possia-

mo notare che il Software riconosce nel soggetto V2802 la razza Laticauda, nel soggetto V2804 la Comisana e nel soggetto V2806 la Bagnolese. Per quanto riguarda i capi di importazione pro-

venienti dalla Spagna, Ungheria e agnelli trimeticci, il Software non ha attribuito questi soggetti ad alcuna delle razze pure presenti nel database, mentre ha riconosciuto come pecore Comisane alcuni dei soggetti presenti nel gruppo delle Merinizzate e dei capi di importazione.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sono incoraggianti, tuttavia, al fine di saggiarne la solidità e la conseguente applicabilità all'interno di una filiera alimentare, si rendono necessari ulteriori analisi di conferma. Il passo successivo sarà quindi quello di effettuare una più approfondita analisi della potenza statistica del test alla base della metodica attraverso test mirati. La metodica che proponiamo per la rintracciabilità razziale prodotta con i risultati di questa ricerca, potrebbe costituire un valido sostegno alle produzioni delle razze oggetto dello studio, nel caso in cui queste venissero protette da un disciplinare che sancisse uno status di prodotto monorazza relativo ai prodotti carnei tradizionali e tipici.

BIBLIOGRAFIA

1. ISAG/FAO Standing Committee. 2004. Secondary Guidelines for Development of National Animal Genetic Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (Mo-DAD): Recommended Microsatellite Markers. Recommendations of joint ISAG/FAO Standing Committee. <http://dad.fao.org/> Accessed Jan. 26, 2009. ISAG/FAO per la "Measurement of Domestic Animal Diversity" (2004).
2. Mburu D.N., Ochieng J.W., Kuria S.G., Jianlin H., Kaufmann B., Rege J.E., Hanotte O. (2003). Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel (*Camelus dromedarius*) populations: implications for their classification. *Anim Genet.* 34(1):26-32.
3. Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M. (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153(4):1989-2000.