



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SANITÀ E PRODUZIONI ANIMALI:
SCIENZA, TECNOLOGIA E BIOTECNOLOGIE**

DOTTORATO DI RICERCA IN PRODUZIONI ANIMALI

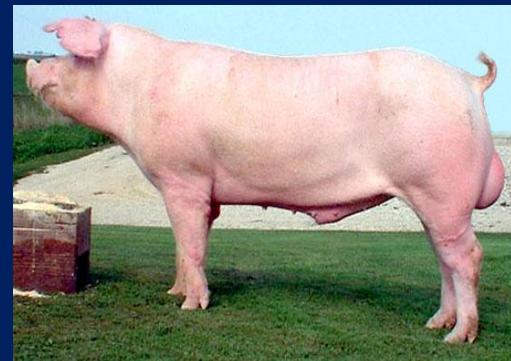
**RICERCA E VALIDAZIONE DI SNP IN GENI CANDIDATI PER LA
QUALITÀ DELLA CARNE E APPLICAZIONE DELL'ANALISI
GENOMICA ALLA SPECIE SUINA**

Tesi di: Marta Raschetti

Docente guida: Giulio Pagnacco

Correlatore: Bianca Castiglioni

Ciclo: XXIII



Anno accademico 2009-2010



Università degli Studi di Milano

Facoltà di Medicina Veterinaria

Dipartimento di Scienze e tecnologie veterinarie per la Sicurezza Alimentare

Scuola di dottorato di ricerca in “Sanità e Produzioni Animali: Scienze, Tecnologia e Biotecnologia”

**RICERCA E VALIDAZIONE DI SNP IN GENI CANDIDATI PER
LA QUALITÀ DELLA CARNE E APPLICAZIONE
DELL’ANALISI GENOMICA ALLA SPECIE SUINA**

Curriculum: Metodologie e biotecnologie applicate alla genetica animale

Docente Tutor: Prof. Giulio Pagnacco

Correlatore: Bianca Castiglioni

Dott.ssa Marta Raschetti

Matricola: R07789

Homo Faber Fortunae Suae

Sommario

SUMMARY	1
PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO	3
INTRODUZIONE.....	4
La Suinicoltura Italiana	5
Patrimonio suinicolo e andamento del mercato	5
Sistema italiano di produzione suinicola	7
Tecniche di allevamento dei suini.....	8
Tipi genetici utilizzati per la produzione di duino pesante e leggero	11
Large White italiana.....	12
Landrace italiana	13
Landrace belga	13
Duroc.....	14
Pietrain italiana	15
Razze a limitata diffusione in Italia	15
Hampshire italiana	15
Spot	16
Razze autoctone e Registro Anagrafico	17
Cinta Senese.....	18
Mora Romagnola.....	18
Nero di Sicilia	19
Casertana.....	19
Apulo-Calabrese.....	20
Sarda.....	21
Il Tipo Genetico Nero di Parma.....	22
Il Tipo Genetico Suino Nero di Garlasco.....	23
Disciplinare del Libro Genealogico e del Registro Anagrafico della Specie Suina	24
La tipicità della selezione italiana.....	25
Fattori che influenzano la qualità della carne	31
La selezione assistita da marcatori (MAS) e la sua integrazione nei piani di selezione.....	32
Il Genoma Suino	38
Analisi molecolare del genoma suino: dai QTL ai sistemi <i>high-throughput</i> di genotipizzazione.....	42
Il genome scanning nel suino.....	43
L'approccio del gene candidato nel suino.....	46
Nuove strategie per identificare i geni responsabili di caratteri complessi mediante l'analisi funzionale del genoma	52
Applicazioni di genomica funzionale per l'identificazione di geni per la qualità della carne	54
SNP discovery: approcci molecolari tradizionali per la rilevazione di mutazioni puntiformi.....	55
SNP discovery: tecnologie di sequenziamento massivo dei genomi	56
Metodi di genotipizzazione a bassa e media densità nel suino	58
Metodi di genotipizzazione ad alta/altissima densità nelle specie di interesse zootecnico	59
Prospettive per la selezione nella specie suina.....	63
MATERIALI E METODI.....	65
Ricerca e validazione di SNP in geni candidati per la qualità della carne suina	66
Campionamento	66
Raccolta dei fenotipi e del materiale biologico.....	66
Scelta dei caratteri fenotipici e degli animali per le successive sperimentazioni	68
Preparazione degli acidi nucleici per le analisi	69
Analisi Molecolari.....	73

Disegno dei primer per l'amplificazione a partire dal cDNA.....	73
Disegno di nuovi primer per l'amplificazione a partire dal DNA	84
Analisi molecolare mediante la tecnica PCR-SSCP	93
Sequenziamento	95
Analisi Statistiche e bionformatiche	95
Analisi delle sequenze.....	95
Tipizzazione dei polimorfismi identificati	95
Studi di associazione polimorfismo-fenotipo	96
Analisi genomica della specie suina	97
Campionamento	97
Preparazione degli acidi nucleici per le analisi	97
Analisi Molecolari.....	97
Analisi Statistiche e bionformatiche	98
RISULTATI.....	99
Ricerca e Validazione di SNP in geni candidati per la qualità della carne suina	100
Scelta dei geni per l'analisi sperimentale.....	100
Scelta dei campioni per l'analisi sperimentale.....	101
Strategia di scelta dei campioni	102
Estrazione di RNA totale dai campioni di tessuto muscolare.....	104
Estrazione del DNA	105
Analisi PCR-SSCP: messa a punto delle metodiche e analisi dei tracciati.....	106
Applicazione dell'analisi genomica alla specie suina.....	124
Statistiche per SNP.....	126
Statistiche per individuo.....	129
DISCUSSIONE.....	133
Ricerca e Validazione di SNP in geni candidati per la qualità della carne.....	134
Applicazione dell'analisi genomica alla specie suina.....	141
Indici di Tabelle, Figure e Box	143
Indice delle Tabelle	144
Indice delle Figure	145
Indice dei Box	146
BIBLIOGRAFIA	147
RINGRAZIAMENTI.....	168

SUMMARY

An important aim of pig selection in Italy is to obtain animals having a high aptitude for the PDO dry-cured ham production, such as Parma or S. Daniele ham. Over the past years, advances in the porcine genetic map have led to valuable gene and trait information being discovered. Since that time, sequences for the pig genome have been generated from various tissues, the sequencing of candidate genes, and more recently large scale genomic sequencing projects. These efforts are also being directed to SNPs identification for future large scale association studies. In the next years, the efficiency and accuracy of the traditional pig selection schemes could be improved by the implementation of molecular data into breeding programs.

In this work, seven swine candidate genes for meat quality were investigated in order to identify informative SNPs. Molecular analyses were performed on twenty-two animals representing the extreme tails of the Gaussian distribution for three selected phenotypes (muscle compactness, fat thickness and the principal component 1) of 231 Large White x Landrace individuals.

Among the nine identified SNPs, only two SNPs in the CRADD gene, two SNPs in the PTPRD gene and one SNP in the PIK3R2 gene showed a MAF (Minor Allele Frequency) more than 5% in the animals tested and therefore were considered for the subsequent association analysis.

Association analysis between these five SNPs and the three phenotypes considered in this study was carried out using the GML procedure. The SNP CRADD g343 [A/G] showed a good association with the compactness of the muscles ($P = 0,0498$), the SNP PTPRD g30194 [G/T] showed a good association with the compactness of the muscles ($P = 0,0195$) and fat thickness dorsal ($P = 0,0265$), the SNP PIK3R2 g.3008 [C/T] showed a very good association with the compactness of muscle mass ($P = 00,0014$) and thickness of backfat ($P = 0,0087$).

Therefore, the PIK3R2SNP g.3008 [C / T] was genotyped on all 231 animals of the population. The analysis showed a significant effect of this SNP on the following variables: marbling ($P < 0.0001$), fat cover ($P < 0.05$), fat thickness ($P < 0.05$), Prin1 ($P < 0.05$), Prin3 ($P < 0.01$); Prin4 ($P < 0.01$). In particular, the CC genotype was positively associated with marbling and fat cover.

Moreover, the SNP in PIK3R2 gene was tested on 600 samples of three different Italian breeds (Large White, Duroc, Landrace) obtained from the National Association of Pig Breeders of Italy. Within each breed, the 100 individuals with the highest and the 100 individuals with the lowest values for EBVs (Estimated Breeding Values) for average daily weight gain were analyzed, resulting this SNP polymorphic in each breed. The association analyses between this SNP and these extreme EBVs showed a good association with backfat thickness, average daily gain, feed conversion rate and thigh weight in Landrace individuals.

The two SNPs identified in CRADD gene and the two SNPs identified in the PTPRD gene were tested in another group of 560 Italian Large White animals with extreme EBVs for fat thickness. Three of the four SNPs resulted polymorphic also in this population. Then, association analysis between these three SNPs and EBVs for fat thickness were performed, showing the association of the SNP g29962[A/G] of PTPRD gene with thigh weight.

Another aim of this PhD thesis is the genetic characterization of a swine genetic type, the “Nero di Garlasco”, expressing both ancient and recent biodiversity.

Although in the last years admirable efforts have been made to recover pig biodiversity, extremely endangered, today only few Italian local breeds can withstand the competition with commercial foreign breeds (i.e. the Large White, Landrace and Duroc) and with the commercial crosses today more and more widespread in the market. To date, at the national Herd Book only few breeds are registered as the Cinta senese, Mora Romagnola, Nero Siciliano, Casertana, Apulo-Calabrese and the Sarda. A very limited number with respect to the tens of breeds and lines cited in the textbooks of agronomy of the second postwar period. The majority of the extinct pig breeds were adapted to free range breeding, and were characterized by dark coat color (to defend themselves from the sun), slow growth and extensive fat deposits. In recent years, an ancient genetic type barely still existing (*Razza di Garlasco*) is reconstructing in the province of Pavia (Lomellina). In this case, pig phenotypes consisted of dark coat color and, surprisingly, high growth rates, similar to the commercial breeds. These two characteristics made these animals well adapted for the non-industrial production, where animals can be bred in free range, because the dark color protects them from the sun. To achieve this goal, a genetic characterization of the model population should be conducted. The tight bottleneck, through which this small population has passed, allows the fixation of genetic markers that enable precise traceability of the fresh and transformed products. This can give an added value to the breeding of these animals that responds to the request for security and sustainability of the animal production system.

Thanks to innovative technologies, a population of 96 animals, belonging to the Nero di Garlasco breed, was analyzed using the PorcineSNP60 BeadChip, in order to screen about 60,000 SNPs. The obtained data allowed a first description of the genetic structure of this population, but further studies are required to characterize this swine genetic type.

PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO

Nel corso degli ultimi anni, gli studi genetici sulla qualità della carne suina sono diventati oggetto di sempre maggior interesse. L'aumento di consapevolezza da parte dei consumatori sulla qualità degli alimenti e il contemporaneo sviluppo degli strumenti della genomica, hanno portato gli allevatori a porre maggior attenzione alle caratteristiche qualitative dei prodotti, includendole come parte integrante dei programmi di selezione. La qualità della carne è un carattere complesso, difficile da definire in modo semplice ed univoco. E' infatti influenzata da numerosi fattori, tra cui: le caratteristiche del muscolo, i fattori di produzione ed ambientali, le condizioni pre e post-mortem e la genetica dell'animale. La suinicoltura italiana, rispetto a quella degli altri paesi, è orientata in larga parte alla produzione di prosciutti DOP, quali Parma e San Daniele, oltre che a numerosi altri prodotti trasformati di alta qualità. La qualità della carne e della carcassa rappresentano aspetti fondamentali per queste produzioni. Il miglioramento di queste caratteristiche oltre all'efficienza dei caratteri riproduttivi sono obiettivi della selezione nel suino italiano. Nonostante l'ereditabilità dei caratteri che influenzano la qualità della carne sia bassa, la conoscenza del genoma rappresenta uno strumento importante per introdurre rilevanti innovazioni nel campo del miglioramento genetico dei suini. L'identificazione di marcatori molecolari utili per il miglioramento genetico della produzione e della qualità della carne suina e l'integrazione di queste informazioni con i sistemi di selezione tradizionali potranno infatti portare ad importanti innovazioni nel settore suinicolo, con vantaggi sul piano dell'efficienza della selezione. L'obiettivo di questo studio è stato quello di identificare marcatori SNP (Single Nucleotide Polymorphism) in sette geni candidati per la qualità della carne suina, identificati in uno studio precedente di genomica funzionale, e verificarne l'associazione sia con caratteri fenotipici rilevati alla macellazione e alla rifilatura delle cosce sia con EBV (Estimated Breeding Value) di caratteri legati alla qualità della carne.

Un altro obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare l'unicità di un nuovo tipo genetico, il suino Nero di Garlasco, mediante la ricerca di alleli e/o di combinazioni alleliche uniche, utili per la successiva messa a punto di una strategia per l'utilizzazione economica di questi animali ai fini produttivi. Nell'area della Lomellina, in provincia di Pavia, è infatti in corso un intervento teso a recuperare una antica razza autoctona, la razza di Garlasco, che un tempo popolava questa zona. Scopo del lavoro è stata quindi la ricerca di "Firme Genetiche", ovvero di SNP caratteristici di questi animali. A questo fine una popolazione costituita da 96 soggetti appartenenti al Nero di Garlasco è stata sottoposta ad uno screening genomico di circa 60.000 polimorfismi noti mediante l'utilizzo del PorcineSNP60 BeadChip. I dati ottenuti hanno permesso una prima descrizione della struttura genetica di questa popolazione.

INTRODUZIONE

LA SUINICOLTURA ITALIANA

Patrimonio suinicolo e andamento del mercato

Nel 2001 il patrimonio suinicolo italiano era stimato in 8.766.000 capi, collocando il nostro Paese al sesto posto per consistenza di capi allevati in ambito europeo, e rappresentava il 5,7% del totale dei capi presenti (De Roes et al., 2004). Nel 2002 è iniziata una congiuntura sfavorevole per il comparto, dovuta a una costante flessione delle quotazioni dei capi suini vivi che non ha permesso agli allevatori di compensare i costi espliciti di produzione. Inoltre, la situazione poco brillante del settore è stata ulteriormente appesantita dall'impennata dei prezzi delle materie prime per i mangimi e per la scarsa disponibilità di mais sul mercato europeo e mondiale. Tale circostanza ha determinato speculazioni di prezzo sul mercato anche sugli altri alimenti per gli animali, come la crusca, il frumento, l'orzo e la soia (ANAS Notizie, 2004). Nonostante ciò, nel 2002 si è verificata una forte crescita del patrimonio suinicolo e le consistenze, intorno a 9,1 milioni di capi, si sono mantenute agli stessi livelli anche nel 2003 (De Roes et al., 2004). Nel 2005 si è registrata una contrazione delle produzioni rispetto al 2004, pari al 4,3%, ma tale calo riguarda solo le produzioni diverse da quelle per i prosciutti DOP. Secondo i dati dell'indagine ISMEA-Nielsen, nel primo semestre del 2007 si è consolidata la flessione dei consumi di carne suina e salumi: nel periodo dal 7 gennaio al 23 giugno 2007 il calo è stato 4,2% rispetto al primo semestre del 2006. In particolare, i consumi di carne suina fresca e le preparazioni di carni suine sono diminuiti rispettivamente del 6,4% e del 6,1%, mentre le vendite di salumi sono scese del 2,6% (-0,7% i salumi DOP). Il volume di affari è calato complessivamente dell'1,3%. In particolare, il valore degli acquisti domestici della carne suina fresca nel 2007 è inferiore del 6,4% rispetto al primo semestre 2006, quello delle carni suine lavorate del 4,9%. Migliora invece il dato relativo ai salumi, il cui volume di affari è aumentato dello 0,3%, con una nota negativa per i salumi DOP che registrano invece un calo dello 0,8% rispetto allo scorso anno (tabella 1).

Tabella 1: Acquisti domestici di carni suine.

Periodo gennaio-giugno '07	Quantità (t)	Diff. % 07/06	Valore (.000 €)	Diff. % '07/'06
TOTALE CARNI SUINE	223.568	-4,2	2.260.281	-1,3
- naturale	61.848	-6,4	366.454	-6,4
- elaborata	30.302	-6,1	197.926	-4,9
- salumi	131.421	-2,6	1.695.903	0,3
di cui salumi DOP	11.811	-0,7	209.954	-0,8

Sempre secondo i dati ISMEA-Nielsen, il prezzo medio della carne suina fresca è aumentato dello 0,8% negli esercizi al dettaglio tradizionale, mentre è calata dello 0,3% nei canali della Grande

Distribuzione Organizzata (GDO). Al contrario, per quanto riguarda i salumi, gli aumenti di prezzo più consistenti si sono registrati negli esercizi della GDO, mentre al dettaglio tradizionale l'aumento è decisamente più contenuto (+0,8%). Nel segmento dei salumi DOP i prezzi hanno subito una netta flessione al dettaglio tradizionale (-3,4%) e negli altri canali di distribuzione (-7,2%), mentre si registrano aumenti nella GDO (+0,9%) (tabella 2).

Tabella 2: Prezzo della carne suina nel 2007.

Prodotti e canali di distribuzione	Prezzo €/kg	Diff. % 07/06
CARNE SUINA	6,12	+ 0,4%
GDO (iper, super, liberi servizi, hard discount)	5,82	- 0,3%
Dettaglio Tradizionale	6,96	+ 0,8%
Altri canali	6,30	+ 3,9%
SALUMI	12,90	+ 3,0%
GDO (per, super, liberi servizi, hard discount)	12,80	+ 3,5%
Dettaglio Tradizionale	14,38	+ 0,8%
Altri canali	11,56	- 0,6%
SALUMI DOP	17,78	- 0,1%
GDO (per, super, liberi servizi, hard discount)	17,33	+ 0,9%
Dettaglio Tradizionale	21,83	- 3,4%
Altri canali	15,33	- 7,2%

Nel 2009 i suini nati in Italia erano 12.922.000 (-0,8% rispetto al 2008, dato ISTAT), di cui certificati per le DOP 8.707.362 (-4,5% rispetto al 2008) (dato IPQ-INEQ), corrispondente al 67% della produzione nazionale. La percentuale di auto-provvigionamento di carne suina era pari al 68,9%, in calo dello 0,8% rispetto al 2008 (dati ISTAT). Tuttavia, mentre il grado di auto-provvigionamento per le cosce era pari al 35%, il grado di auto-provvigionamento per i lombi era del 90%. Pertanto, mentre per le cosce suine l'Italia è dipendente dalle importazioni (nel 2009 in Italia il numero delle cosce fresche e congelate importate è stato di circa 55 milioni di pezzi, contro i circa 26 milioni di cosce prodotte a livello nazionale), per la carne suina fresca il nostro Paese è quasi autosufficiente.

Il nostro principale partner commerciale si conferma la Germania; seguono nell'ordine, la Francia, l'Olanda, la Danimarca, il Belgio, la Spagna e l'Austria. Questo mercato rappresenta circa il 21,5% del volume totale delle nostre esportazioni. I prodotti maggiormente esportati sono rappresentati prevalentemente da carni lavorate.

Si è inoltre registrato un andamento positivo sia per le esportazioni di prodotti trasformati sia per i consumi domestici di salumi, con particolare riguardo ai salumi DOP. Nel 2009 si è, infatti, registrato un aumento del 2,7% delle esportazioni delle carni lavorate rispetto al 2008 (+3,5% i prosciutti crudi e lo speck).

Anche gli acquisti domestici di carne suina e salumi hanno mantenuto un livello elevato e costante negli ultimi anni, come mostrato in tabella 3.

Tabella 3: Acquisti di carne suina e salumi in Italia nel biennio 2008-2009 (Fonte: ISMEA-Nielsen).

	2008	2009
Acquisti in quantità (t)		
Carne suina e salumi	491.897	491.018
Carne suina naturale	131.773	126.259
Carne suina elaborata	61.989	61.930
Salumi,	293.760	298.389
di cui DOP	21.025	21.623
Acquisti in valore (000 €)		
Carne suina e salumi	5.019.399	5.018.273
Carne suina naturale	800.970	764.690
Carne suina elaborata	397.852	401.495
Salumi,	3.786.582	3.816.582
di cui DOP	440.877	445.654

Sistema italiano di produzione suinicola

La suinicoltura italiana si caratterizza per un sistema di produzione di tipo intensivo consistente in un basso numero di aziende con un elevato carico di capi. I dati relativi all'ultimo censimento generale dell'agricoltura (tabella 4) mostrano che poco più dell'1% delle aziende detiene l'80% per cento degli animali.

Tabella 4: Numerosità delle aziende suinicole per classi di consistenza e capi (Fonte: ISTAT, 2000).

Classi di consistenza	Nr. Aziende	% sul totale	No. capi	% sul totale
0-499	192.159	98,4	1.046.811	12,2
500-999	1.068	0,5	745.612	8,7
≥ 1000	2.098	1,1	6.821.593	79,2
Totale	195.325	100,0	8.614.016	100,0

La generale riduzione del numero di aziende zootecniche avvenute fra il 1990 e il 2000 è stata particolarmente marcata nel settore suino i cui allevamenti sono diminuiti tra il 51% e il 56% in tutte le circoscrizioni, ad eccezione del sud dove la contrazione (-39%) risulta più attenuata (INEA, 2003). Ciononostante il settore si è evoluto rispetto al 1990. Infatti, il numero di capi suini è aumentato del 2,5%. Per effetto di questa dinamica il numero di capi di bestiame allevati per azienda e le dimensioni medie delle aziende risultano significativamente maggiori nel 2000 rispetto al 1990 e il numero medio di capi allevati è salito da 23,5 a 44,1 (ISTAT, 2002). L'incremento si è registrato soprattutto in Lombardia, Emilia-Romagna, Piemonte, Veneto. Infatti, osservando la

distribuzione geografica delle aziende e del numero di capi sul territorio nazionale, si rileva che le regioni del nord sono caratterizzate da una suinicoltura intensiva con una forte concentrazione del numero di capi e un'elevata automazione; viceversa nel centro e nel sud si ha un'estrema polverizzazione delle aziende con un basso rapporto capi/allevamento e una modesta meccanizzazione.

L'aumento del numero di capi suini ha avuto dinamiche alquanto differenti nelle varie aree geografiche. Nel nord-ovest, area nella quale l'allevamento dei suini è tradizionale e molto diffuso, si sono verificati aumenti consistenti (30,1%), mentre nel centro si sono registrate riduzioni molto pronunciate (-38,7%), così come nelle isole (-34,3%). Nel nord est, altra area di allevamenti suinicoli, all'incremento dei capi registrato in Veneto (20,7) hanno fatto riscontro le diminuzioni dei capi registrate in Emilia Romagna (-18,1%).

Tecniche di allevamento dei suini

In Italia esiste un'importante suddivisione nell'allevamento suinicolo che dipende dalla finalità per cui vengono allevati gli animali. Si distinguono, infatti, un suino "pesante", macellato quando raggiunge un peso vivo compreso tra i 150 e i 180 kg, e un suino "leggero", macellato quando raggiunge un peso vivo compreso tra i 100 e i 110 kg. L'Italia orienta tipicamente la propria produzione suinicola verso il suino pesante, destinato prevalentemente all'industria salumiera, che provvede alla trasformazione delle sue carni in prodotti stagionati di alta qualità, in particolare verso i prodotti tipici, quali il prosciutto crudo, che rientra nelle protezioni tutelate e riconosciute in ambito UE come prodotti DOP. In Italia, la maggiore priorità dell'industria moderna è proprio la produzione di prosciutto crudo. Il comparto di trasformazione assume un ruolo di estrema importanza nell'intera filiera suinicola. Questo è ben evidenziabile attraverso l'incidenza economica del valore delle cosce (128 Euro circa) rispetto al valore dell'intero animale prima della macellazione (costo del suino a peso vivo, 255 Euro circa), o al valore della carcassa (costo a peso morto di 333 Euro circa) che raggiunge rispettivamente il 50% e il 38% del valore economico del soggetto macellato.

Per questa peculiarità produttiva, che prevede il raggiungimento del peso di circa 160 kg in 10-12 mesi, il maiale italiano richiede specifiche tecniche di allevamento, alimentazione e gestione della genetica. La metodologia di allevamento prevede la suddivisione del ciclo produttivo in varie fasi, ognuna delle quali è caratterizzata da un diverso piano alimentare:

- fase di allevamento dei lattonzoli: in questa fase i suini svezzati raggiungono un peso vivo di 30 kg; la loro alimentazione deve essere razionata per contenere un eccessivo ingrassamento

che, nelle fasi successive, può provocare un ritardo nell'accrescimento e portare ad un allungamento del ciclo produttivo;

- fase di magronaggio: in cui gli animali arrivano ad un peso di circa 90 kg; il suino viene preparato all'eccessiva fase di ingrasso dove riceverà grossi quantitativi di alimento; in questo caso il razionamento alimentare è di tipo quali-quantitativo (ricorso ai cruscami per limitare il contenuto energetico della razione) per stimolare lo sviluppo dell'apparato gastrointestinale e scheletrico;
- fase di ingrasso: il suino è portato alla maturità commerciale, circa 160 kg di peso vivo; il piano alimentare, generalmente, prevede la somministrazione dell'alimento sotto forma di pastone in due pasti giornalieri.

Suino Pesante

Il suino pesante è caratterizzato da taglia piuttosto grande rispetto a quella dei suini degli altri Paesi e deriva da razze lungamente selezionate dal Libro genealogico italiano. Esso è allevato in Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli, Emilia Romagna, Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzo, Molise ed è alimentato esclusivamente con cereali nobili, farine vegetali e siero di latte e possiede carni mature, sapide, profumate e affidabili sotto il profilo igienico-sanitario. Il circuito interessa circa 5.000 allevamenti che destinano alla certificazione DOP circa 8 milioni di suini (ANAS notizie, 2004).

Riguardo al suino pesante, allevato anche in diverse aree del Sud, va menzionata la realtà calabrese, che ha già ottenuto il riconoscimento per quattro salumi DOP e quindi costituisce un importante modello di riferimento, ma manca una più organica strategia di tutela. Pertanto è emersa la necessità di prevedere l'adozione di strumenti per la valorizzazione delle produzioni, al fine di promuovere alla pari dell'area del suino destinato ai prosciutti DOP le peculiarità delle carni suine e poter così difendere anche la redditività dell'attività di impresa anche nelle meno avvantaggiate realtà meridionali. Dal punto di vista genetico si è arrivati a un tale risultato dopo anni di ricerche e incroci che hanno finito per selezionare un animale idoneo a conferire ai prodotti lavorati e stagionati quelle caratteristiche organolettiche che caratterizzano la salumeria italiana.

Per il suino pesante i criteri selettivi sono originali e unici al mondo, in quanto tengono conto della destinazione delle carni, in gran parte DOP. Infatti, la selezione italiana, a differenza di quelle straniere, punta all'esaltazione della qualità, e persegue il miglioramento delle prestazioni degli animali e delle quantità prodotte in una misura compatibile con essa. La strategia è di realizzare prodotti con precise caratteristiche qualitative (*speciality*), valorizzandone i contenuti di tipicità, in netta alternativa alle produzioni indifferenziate e di basso valore commerciale (*commodity*), (ANAS notizie, 2004). Per valorizzare le carni del suino pesante le tre maggiori organizzazioni professionali

agricole (CIA, Coldiretti, Confagricoltura), insieme a ASSICA., ai Consorzi dei Prosciutti di Parma e San Daniele, ad UNAPROS e ed ANAS, hanno predisposto il progetto SUIT "Suino tradizionale italiano" in modo da promuovere anche dei tagli diversi dalle cosce destinate al circuito DOP. Questa è un'iniziativa di enorme importanza per l'intera filiera suinicola italiana, perché completa la valorizzazione e tutela di tutta la carne ottenuta da suini nati in Italia ed allevati nel rispetto dei Disciplinari dei prosciutti di Parma e San Daniele, che sono le produzioni di riferimento del sistema (ANAS notizie, 2004).

Le organizzazioni si ripromettono tre principali obiettivi:

- permettere al consumatore di identificare immediatamente all'acquisto i tagli freschi e i prodotti trasformati derivanti da tali carni, oggi invece indifferenziati;
- valorizzare la qualità unica della carne attraverso la garanzia d'origine ottenuta con un sistema di tracciabilità dalla nascita del suino al consumo dei relativi prodotti, che annovera allevatori, macellatori, trasformatori, confezionatori;
- assoggettare tutti ad un rigido controllo da parte di organismi autonomi incaricati dal Ministero delle Politiche Agricole;
- dar vita in tempi rapidi a uno specifico consorzio di tutela che dovrà divenire punto di riferimento indispensabile per l'intera filiera suinicola.

Suino leggero

La produzione di un suino leggero è finalizzata alla produzione di carni consumate fresche. A questo scopo si propone di valorizzare la produzione suinicola italiana nelle regioni del Sud e in particolare il programma di certificazione delle carni suine da banco con il marchio "Suino Mediterraneo". Tale programma prevede una specifica attività di selezione e un'operatività di produzione disciplinata (genetica, alimentazione, benessere) messa a punto nel 1995 e incentrata sulle prove presso il centro genetico, svolta dall'ANAS, attraverso uno schema di selezione nazionale. La soluzione individuata prevede la richiesta di una tutela comunitaria (DOP) dei tagli derivanti da suini, che in analogia a quanto avviene per il circuito DOP dei salumi calabresi, vengono macellati a un'età e peso rispettivamente di almeno 8 mesi e 140 Kg e hanno un'origine genetica ben definita, strettamente connessa all'attività del Libro genealogico italiano (ANAS notizie, 2003).

L'obiettivo è mettere gli allevatori in grado di poter contare su una genetica nazionale specializzata di buon livello, capace di produrre un suino leggero "Mediterraneo", che sappia occupare l'interessante mercato già esistente in Italia, ma attualmente dominato da produttori di altri Paesi. Un'ulteriore opportunità per il programma è di poter costituire un'iniziativa catalizzatrice dello

sviluppo della suinicoltura in aree del Paese a scarsa densità di allevamento, quali sono diverse realtà del Sud Italia (ANAS notizie, 2002). L'iniziativa per la valorizzazione del prodotto è stata ideata nel corso del 1999, sulla base dei primi incoraggianti risultati della selezione. La strada intrapresa è quella dello sfruttamento dell'origine del prodotto (suini nati, allevati e macellati in Italia) abbinata a una precisa caratterizzazione produttiva legata principalmente alle razze utilizzate nel programma di produzione e in seconda battuta a una corretta gestione delle condizioni di allevamento rispettose del benessere degli animali e dei loro fabbisogni nutritivi. I risultati raggiunti, ovvero l'accresciuta potenzialità produttiva ed esaltazione delle caratteristiche qualitative del prodotto, confortano sul fatto che la genetica italiana può giocare a pieno titolo il proprio ruolo per offrire un contenuto di differenziazione qualitativa alla filiera delle carni suine da banco. L'attività di miglioramento genetico, finalizzata alla messa a disposizione della filiera di tipi genetici idonei alla produzione di suini per la carne fresca di qualità, è incentrata sull'operatività di valutazione genetica condotta presso il centro genetico di Arezzo di proprietà della locale Camera di Commercio e gestito da ANAS. L'allevamento, la macellazione e i successivi trattamenti delle carni sono disciplinate da precisi protocolli e sottoposti alle verifiche di ANAS. Tutti i suini vengono tatuati dopo la nascita sul dorso con un marchio e il codice dell'allevamento. Le mezzene alla macellazione sono inequivocabilmente identificate oltre ad essere accompagnate da apposita certificazione di conformità per opera di allevamenti e macelli ubicati in Basilicata, Campania, Marche, Sardegna, Sicilia e Puglia con una potenzialità produttiva di circa 120.000 suini/anno (ANAS notizie, 2002).

Tipi genetici utilizzati per la produzione di duino pesante e leggero

L'Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS) gestisce il libro genealogico e il registro anagrafico della specie suina. Il libro genealogico della specie suina rappresenta lo strumento per il miglioramento genetico delle razze suine ed ha la finalità di indirizzare, sul piano tecnico, con particolare riguardo alla valutazione genetica dei riproduttori, l'attività di selezione delle singole razze, promuovendone nel contempo la valorizzazione economica. Il libro genealogico è distinto in singole divisioni per le razze Large White italiana, Landrace italiana, Landrace belga, Duroc italiana, Pietrain.

Il registro anagrafico della specie suina rappresenta lo strumento per la conservazione delle razze suine non sottoposte ad un piano nazionale di selezione.

Il registro anagrafico si distingue in:

- a) registro delle razze estere a limitata diffusione in Italia;
- b) registro dei tipi genetici autoctoni.

I tipi genetici utilizzati per la produzione di suini pesanti (tabella 5) derivano dalle tre razze attualmente riconosciute dai disciplinari di produzione dei prosciutti DOP ovvero la razza Landrace italiano, Large White e Duroc, mentre quelli utilizzati per la produzione di suini leggeri, “Suino Mediterraneo”, sono rappresentati dalle razze Pietrain e Landrace belga. I soggetti avviati alla macellazione possono essere di razza pura (con l’esclusione della Duroc) oppure frutto di incroci di tre razze. Tali soggetti rappresentano i cosiddetti “ibridi commerciali” ovvero soggetti derivati dall’incrocio di più razze e linee, secondo uno schema riproduttivo sviluppato e tenuto segreto da aziende di selezione animale, che producono le linee parentali e vendono gli ibridi con il proprio marchio. Gli ibridi commerciali beneficiano del fenomeno dell’eterosi, con un sensibile miglioramento della velocità di crescita e delle rese di macellazione, risultando così particolarmente adatti per la produzione del suino leggero da macelleria. Meno diffuso è l’impiego di tali ibridi per la produzione del suino medio e pesante da salumificio. L’incrocio più utilizzato per la produzione del suino pesante è quello industriale di prima generazione. Esso consiste nel far accoppiare un verro di razza carnaiola con scrofe di altra razza, generalmente con buone caratteristiche "materne". In Italia questo incrocio è realizzato usando verri di razza Landrace su scrofe di razza Large White.

Tabella 5: Tipi genetici dei suini conferiti per la macellazione. (Fonte: IPQ-INEQ)

Tipo genetico certificato	Quota sul totale delle certificazioni (%)
Large White (LW) o figli di verro LW	18,2
Landrace (LA) o figlio di verro LA	1,90
Figlio meticcio di verri di altre razze (Duroc per il 98%)	32,7
Figlio di verro ibrido	47,2

Large White italiana

Di origine inglese, originaria della contea di York dove si sarebbe formata nel XVIII secolo da scrofe locali e verri importati dall’oriente (figura 1), è stata introdotta in Italia nel 1873 e dalla valle

Figura 1: Soggetto di razza Large White



padana si è diffusa in tutto il territorio nazionale.

I soggetti presentano cute rosea senza macchie, mantello bianco con setole disposte sul corpo in modo uniforme, più folte nel verro; la testa di proporzioni armoniche fra cranio e faccia, è a profilo sub-concavo; le orecchie sono di media grandezza, orlate di setole fini, dirette in avanti e in alto; il collo è corto largo e ben attaccato al garrese. Il tronco è a forma di cilindro lateralmente depresso di eguale

larghezza alle spalle, ai lombi e alla groppa, la linea dorso-lombare è orizzontale. Gli arti sono robusti, di media lunghezza con cosce e natiche larghe, spesse e a profilo convesso. È caratterizzato da un alto grado di fecondità, di prolificità e da un'ottima indole materna e lattifera nelle scrofe. Possiede una buona velocità di accrescimento e un ottimo indice di conversione con un'eccellente qualità delle carni sia per il consumo fresco sia per l'industria di trasformazione (Balasini, 2001). Viene impiegata sia in purezza sia come razza incrociante, con soggetti di razza Landrace per la linea femminile, e con verri Duroc per quella maschile.

Landrace italiana

Di provenienza danese dove, sulla fine del secolo scorso, è stata creata incrociando femmine locali con verri Large White importati dall'Inghilterra e sottoposta poi a rigorosa selezione per ottenere il soggetto ideale per la produzione di bacon (Balasini, 2001). La razza si è diffusa in molti Paesi dove, selezionata con differenti criteri, ha costituito diversi "ceppi" (olandese, francese, tedesco, inglese, belga e italiano). In Italia sono allevati due "tipi" di Landrace: la Landrace italiana e la Landrace belga, per i quali esistono due differenti Libri Genealogici. I soggetti appartenenti alla razza Landrace italiana sono caratterizzati da un'elevata lunghezza del corpo.

La testa è a profilo rettilineo con orecchie lunghe dirette avanti e in basso, collo sottile e relativamente allungato (figura 2). La razza è a diffusione cosmopolita, ma in Italia la selezione ha portato a ottenere un animale che si discosta alquanto dal soggetto originale. Esso è caratterizzato

Figura 2: Soggetto di Landrace italiana

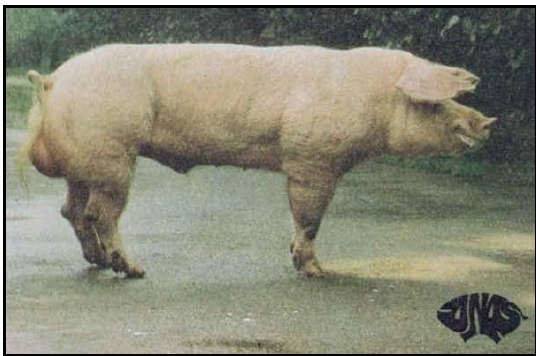


da un buono sviluppo corporeo in grado di raggiungere senza problemi gli elevati pesi di macellazione richiesti dal nostro mercato. Il suino Landrace viene in parte allevato in purezza, ma lo scopo prevalente del suo allevamento è quello di ottenere scrofe meticce dall'incrocio con la razza Large White, in modo da sfruttare l'eterosi soprattutto nei riguardi delle caratteristiche materne, dello sviluppo del prosciutto, della lunghezza dei lombi e del modesto spessore del lardo (Balasini, 2001).

Landrace belga

Gli animali di questa razza presentano taglia media e sono carnosì, con scheletro leggero ma solido e con prosciutti globosi, perché dotati di ipertrofia muscolare (figura 3). Possiedono un mantello

Figura 3: Soggetto di razza Landrace belga



bianco e cute rosea (Balasini, 2001). La Landrace belga è considerata una razza a sé stante. Possiede un'elevata frequenza dell'allele recessivo al gene alotano (responsabile della sindrome da stress suino) e scarsa prolificità. La Landrace belga è la razza base degli animali riproduttori per la produzione di carne perché presenta muscolatura larga nella spalla e nel prosciutto. I soggetti di sesso maschile di questa razza si usano frequentemente come verri terminali nei

programmi di produzione degli ibridi, date le eccellenti caratteristiche che trasmette alla sua discendenza. La selezione dei suini della razza Landrace belga si propone di migliorare le caratteristiche produttive e cioè: la robustezza di costituzione e l'attitudine alla produzione economica di carcasse ricche di tagli magri e con carne esente da miopatie e particolarmente adatta al consumo fresco e alle trasformazioni cotte.

Duroc

Proveniente dagli Stati Uniti d'America, nel New Jersey, anche se di origine piuttosto incerta (Balasini, 2001), è stata introdotta in Italia come razza incrociante, soprattutto per le sue doti di rapidità di accrescimento, elevata rusticità ed eccellente indice di conversione. È un animale di mole medio-grande, armonico, tendente al compatto, con cute color ardesia chiaro con tonalità più scure sul dorso, sui lombi, sulla superficie caudale degli arti posteriori al di sotto del garretto (figura

Figura 4: Soggetto di razza Duroc



4). Il grifo è nero ardesia e il mantello è costituito da setole rosse e nere dal sauro al marrone chiaro. Il profilo nasale è leggermente concavo, le orecchie sono piccole, corte e pendule, mentre il tronco è lungo e largo. Le doti di questa razza, quali la rapidità di accrescimento, la rusticità, la prolificità, l'eccellente indice di conversione e la robustezza generale hanno favorito l'espandersi dell'allevamento. In Italia è usato soprattutto per gli incroci (Balasini, 2001).

Pietrain italiana

È una razza originaria del Belgio e derivante dall'incrocio e successivo meticciamiento di suini di origine francese appartenenti a una razza pomellata precoce, con suini Berkshire e Tamworth. È una razza di media mole, con scheletro leggero, mantello bianco sporco con pezzature nere irregolari, testa leggera a profilo rettilineo, orecchie corte larghe portate in avanti, collo corto e muscoloso, prosciutti globosi e discesi, arti brevi e robusti (figura 5). È caratterizzata da un'ipertrofia muscolare di origine genetica, che la porta ad avere elevata percentuale di tagli magri e pregiati; infatti, nella

Figura 5: Soggetto di razza Pietrain



produzione del suino leggero da macelleria dà ottimi risultati. Presenta, però dei difetti: scarsa velocità di accrescimento, indice di conversione alimentare sfavorevole, carcasse frequentemente caratterizzate dalla sindrome mioessudativa (PSE), bassa prolificità (Balasini, 2001). Il Libro genealogico ha puntato all'eradicazione dalla popolazione italiana dell'allele recessivo del gene alotano (responsabile della

sindrome mioessudativa) grazie all'attività di selezione iniziata nel 1995. Attualmente la popolazione di Pietrain selezionata in Italia, è probabilmente a livello europeo quella con la maggior frequenza di riproduttori "stress resistenti" (ANAS notizie, 2004).

Razze a limitata diffusione in Italia

L'Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS) gestisce anche il registro delle razze estere a limitata diffusione. Questo registro conserva le informazioni genealogiche dei soggetti iscritti al fine di una loro corretta utilizzazione in piani di incrocio o per il loro impiego in eventuali futuri programmi nazionali di miglioramento genetico. Esso è composto da divisioni distinte per le razze Spot e Hampshire.

Hampshire italiana

Di origine statunitense, la Hampshire italiana è caratterizzata da un'elevata attitudine materna e una grande capacità di allattamento, che la rendono adatta agli allevamenti all'aperto, in quanto allo svezzamento i suinetti sono forti e ben cresciuti. È un'ottima pascolatrice, resiste bene alle avversità climatiche ed è poco propensa ad ammalarsi. È di colore nero, con fascia bianca che interessa garrese spalle e arti anteriori, come la Cinta Senese, dalla quale si distingue per la maggiore mole, il portamento eretto delle orecchie, le maggiori masse muscolari e la carne meno grassa (figura 6). La testa è di media dimensione, a profilo rettilineo, con orecchie piccole ed erette. Il collo è corto e

Figura 6: Soggetto di razza Hampshire



muscoloso, il tronco relativamente corto. Sono animali di media mole ad accrescimento rapido e buona conversione alimentare.

La fertilità e la prolificità sono medie. È apprezzata perché dà carne in grande quantità (netta prevalenza dei tagli carnosì su quelli adiposi e grande sviluppo delle masse muscolari della coscia) e di grande qualità (magra e asciutta). Il difetto grave che contraddistingue questa razza riguarda le sue carni che risultano acide ("effetto

Hampshire"). Ciò le rende poco adatte alla trasformazione industriale. La carne è acida quando il pH dopo la macellazione lentamente si porta a valori troppo bassi, sotto il 5,5. Il colore rimane leggermente più chiaro ma non manifesta altri segni percepibili (fenomeno simile alla PSE). Questo difetto è di grande rilevanza, ma è anche vero che ci sono suini appartenenti a questa razza che non manifestano questo grave inconveniente. I soggetti di questa razza sono molto utilizzati in incrocio per la produzione del suino leggero grazie all'elevato accrescimento che dimostrano nei primi mesi di vita. Se incrociata con suini di grande mole forniscono anche ottimi soggetti di peso elevato da trasformare.

Spot

È una razza derivata dalla Poland China americana, la quale è nata attraverso incroci praticati tra i maiali locali dell'Ohio e i riproduttori orientali. È un soggetto di media mole, con cute color rosa e nero ardesia a macchie (figura 7). Ha testa leggera, profilo rettilineo leggermente concavo, orecchie

Figura 7: Soggetto di razza Spot



pendule e piccole, grifo e labbra rosee. Il tronco è lungo ed elegante con masse muscolari della groppa ben sviluppate e linea dorso-lombare leggermente convessa. La selezione genetica della razza Spot Italiana persegue il miglioramento delle caratteristiche produttive della razza riprodotta in purezza e per la sua utilizzazione in incrocio (Balasini, 2001).

Il grasso di mazzatura è elevato, la resa al macello media e il colore della carne scuro. È adatta alla produzione del suino magro e fornisce carcasse ricche

di tagli pregiati. Rustica e resistente; è precoce e buona trasformatrice degli alimenti.

Razze autoctone e Registro Anagrafico

In Italia erano molto diffuse in passato numerose razze locali, tra le quali: la Mora (o Romagnola), la Cappuccia, la Cinta Senese e la Casertana. Negli ultimi anni alcune razze autoctone sono state recuperate, in particolare per la produzione di salumi di particolare pregio (Cinta Senese, Mora Romagnola, Nero delle Madonie, Casertana e altre).

Agli inizi del secolo scorso erano state censite in Italia ben 21 razze o genotipi locali. Questo numero documenta l'elevata ricchezza genetica suina nell'Italia di allora, anche se queste popolazioni, che assumevano di regola il nome della regione di origine e/o di allevamento, avevano un alto grado di rassomiglianza reciproca e quindi potevano essere considerate varietà di un più piccolo numero di razze differenti. Le trasformazioni socio-economiche del dopo guerra, le modifiche nell'utilizzo del territorio, l'intensificazione e l'industrializzazione dell'allevamento suino e l'utilizzazione massiccia delle razze estere più produttive e più rispondenti alle mutate esigenze del consumo hanno determinato in pochi decenni il declino dell'importanza delle razze italiane locali. Alcuni tentativi di miglioramento e di valorizzazione delle razze locali furono attuati in alcune zone con scarsi risultati. Un caso particolare è rappresentato dalla Cinta Senese per la quale dal 1934 fu messo in opera un piano di miglioramento della razza concomitante all'istituzione di un suo primo Libro Genealogico gestito dall'Ispettorato dell'Agricoltura di Siena e cessato negli anni '60. L'interesse per il recupero di questa razza, e più in generale per la conservazione dei tipi locali autoctoni, si è risvegliato negli anni '90.

In Italia esistono attualmente sei razze autoctone ufficialmente riconosciute. Il registro anagrafico dei tipi genetici autoctoni, tenuto dall'ANAS, conserva le informazioni genealogiche dei soggetti iscritti al fine della conservazione delle razze con particolare attenzione al mantenimento della loro variabilità genetica e promuovendone, al contempo, la valorizzazione economica. Attualmente l'attività del Registro Anagrafico riguarda le razze Cinta senese, Mora Romagnola, Nero siciliano, Casertana, Apulo-Calabrese e Sarda. Queste sei razze sono chiaramente definibili. Per queste razze, per le quali non è realizzabile un programma di selezione a causa della loro limitata consistenza, l'obiettivo prioritario è il recupero e la conservazione attraverso il mantenimento della loro variabilità genetica, il contenimento della consanguineità e la valorizzazione delle loro carni ottenute in condizioni di allevamento brado o semibrado.

Oltre a queste sei razze, sul territorio italiano sono state descritte più di trenta razze, popolazioni o varietà autoctone. L'avvio del programma di conservazione del Registro Anagrafico ANAS sta favorendo l'apertura e lo sviluppo di numerosi piccoli nuclei di allevamento e la definitiva messa in sicurezza di queste importanti risorse genetiche.

Cinta Senese

La zona di origine della razza è il comprensorio senese e i comuni di Monteriggioni, Sovicille e Poggibonsi, dove, fino a pochi decenni fa, erano allevate non meno di 20.000 scrofe e altrettante erano presenti in altre province e regioni vicine. La principale caratteristica etnica della razza (figura 8) 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 colore nero ardesia con setole nere corte e sottili. Il profilo del muso è lungo e rettilineo, tipico delle razze tardive. Gli arti sono solidi e relativamente lunghi e le orecchie, di media lunghezza, sono portate avanti e leggermente ricadenti (Balasini, 2001). È un'ottima pascolatrice, con spiccata attitudine materna e notevole capacità di

Figura 8: Soggetto di razza Cinta Senese



allattamento. I maschi possono raggiungere a un anno pesi superiori ai 150 kg (fino a 200 kg) e le femmine 140 kg. Si caratterizza per un notevole deposito di grasso in generale e di lardo dorsale in particolare, molto apprezzato per i produttori di lardo di Colonnata. Risulta indenne dai difetti quali PSS e PSE. Ottima nell'incrocio con verro Large White, da cui si ottengono dei grigi senesi apprezzati per la loro precocità all'ingrasso e attitudine carniola (Balasini, 2001).

Mora Romagnola

La Mora Romagnola era allevata in tutta la Romagna in particolare nella provincia di Forlì e Ravenna. Si distinguevano diversi tipi a seconda delle aree di allevamento e diverse gradazioni di colore, fra cui la Forlivese nera e la Faentina rossiccia. Oggi è ridotta a pochissimi esemplari

Figura 9: Soggetto di Mora Romagnola



concentrati in un unico allevamento, con elevati livelli di consanguineità. La linea dorso-lombare convessa con uno scheletro leggero ma in grado di sostenere un peso di 300 kg e oltre, arti lunghi. La testa presenta una taglia media, un muso lungo a profilo concavo, le orecchie sono portate in avanti parallele quasi ricadenti (figura 9). Il colore delle setole è rosso nei suinetti e diventa nero dallo svezzamento. Gli animali di una certa età presentano l'apice delle setole nuovamente

rosso. Le setole sono lunghe con presenza di numerose spighe. Fanno eccezione alcune zone, come

quella addominale e in prossimità dei genitali, dove sono corte, più sottili e quasi assenti. La pelle è pigmentata, ad esclusione della regione addominale che si presenta rosea. Questi suini, in possesso di discrete masse muscolari, a 18 mesi arrivavano a pesare anche 300 kg. È una razza robusta e rustica, che forniva carni particolarmente prelibate. Risulta ottima per l'incrocio con verro Large White.

Nero di Sicilia

Si tratta di una razza autoctona siciliana di origini antichissime, detta anche Suino Nero dei Nebrodi o Nero Siciliano, di colore nero uniforme (figura 10), anche se non mancano tra i soggetti puri

Figura 10: Soggetto di razza Nero di Sicilia



animali fasciati con una cintura simile a quella della Cinta Senese attuale. Di taglia medio-piccola (scrofe a fine carriera di 130 kg e verri meno di 150 kg), ha il muso allungato e gli arti lunghi, caratteristiche che lo rendono un buon pascolatore e camminatore. Gli zoccoli duri gli permettono di muoversi agilmente su qualsiasi terreno. L'aspetto vagamente selvatico è caratterizzato da una criniera che viene sollevata in caso di agitazione. Oggi è

presente un limitato numero di esemplari (circa mille scrofe pure e altre derivate) e continua ad essere allevato allo stato brado nelle Madonie e nei Nebrodi (Sicilia). La razza è precoce e longeva, è caratterizzata da un'interessante fertilità e vivinatalità (elevato numero di suinetti portati allo svezzamento), ed è resistente alle malattie e alle avversità climatiche. Le sue carni sono utilizzate sia allo stato fresco che insaccate, ottenendo prodotti di alta qualità. L'Istituto Sperimentale Zootecnico per la Sicilia (ISZS) sta conducendo attività di ricerca sul Suino Nero dei Nebrodi, allo scopo di salvaguardare la razza, diffonderne l'allevamento estensivo ecocompatibile, promuovere i prodotti tipici a base di carne suina di alta qualità e tipicizzare il salame prodotto con carni di suino Nero dei Nebrodi.

Casertana

La razza Casertana, detta anche Napoletana o Pelatella, ha origini antichissime. Ha contribuito alla formazione di importanti razze oggi largamente allevate, come la Yorkshire e la Berkshire, razze britanniche dalle quali discendono la Large White, la Landrace, la Duroc e la Pietrain. L'importazione di soggetti casertani in Inghilterra fu, infatti, effettuata a più riprese a partire dal XVII secolo. Ha la testa piccola, con orecchie parallele di medie dimensioni portate in avanti

(figura 11). Il profilo fronto-nasale è rettilineo o appena concavo. Ha arti brevi e solidi e scheletro leggero. La cute è pigmentata, di colore è scuro (nero o grigio-ardesia), spesso tendente al violaceo. È la razza più precoce e produttiva tra le razze italiane, in grado di produrre suini grassi che all'età di un anno raggiungono un peso anche superiore ai 150 kg. La situazione attuale della razza è critica in quanto sopravvivono soltanto pochi soggetti, alcuni dei quali non sono di razza pura.

Figura 11: Soggetto di razza Casertana



Rustica, ottima pascolatrice, frugale e precoce, possiede tutte le caratteristiche per essere allevata all'aperto. La scrofa è dotata di elevato istinto materno, ma di prolificità limitata, con una media di 4-6 suinetti per parto e punte massime di 10 suinetti. Le setole sono assenti o presenti in numero ridotto, da cui deriva il nome di "Pelatella". Altro elemento distintivo di questa razza è la presenza di lacinie (tettole o bargiglioni) sotto il collo, in numero di due.

Apulo-Calabrese

L'origine del suino Nero Calabrese (figura 12) risulta incerta. Un tempo era presente in vaste zone della Calabria ed era distinta in diversi "tipi" locali (Reggino, Cosentino, Lagonegrese e altri). Tutti questi animali avevano in comune la produzione di carne magra ideale per la produzione dei tipici

Figura 12: Soggetto di razza Calabrese



insaccati della zona. Attualmente la consistenza è ridotta a poche decine di soggetti veramente tipici e molti altri che richiamano più o meno da vicino il tipo originale. Come molte razze "colorate autoctone" le caratteristiche principali sono: la capacità di valorizzare alimenti poveri, la rusticità, l'adattabilità al pascolamento, il vigore sessuale per il verro e l'attitudine materna per la scrofa. Possiede una taglia

media, con masse muscolari non eccessivamente sviluppate, con struttura ossea solida e arti non troppo lunghi. Il profilo fronto-nasale è rettilineo con orecchie medio-grandi pendenti e portate in avanti. Il colore dominante è il nero, ma a volte nascono alcuni soggetti macchiati o con calzini bianchi. I maschi all'anno arrivano a pesare anche 150 kg, mentre le femmine ingrassate possono superare i 120 Kg. Fornisce tagli magri, mentre i prosciutti e le spalle sono di ottima pezzatura.

Sarda

Si tratta di una razza italiana di piccola mole originaria della Sardegna. Le prime descrizioni morfologiche del suino Sardo risalgono alla seconda metà del Settecento. La scomparsa progressiva dei boschi di querce, ha portato, nel corso del Novecento, a una forte contrazione dell'allevamento del suino brado, sostituito in parte dall'allevamento casalingo. Un'indagine recente, compiuta dall'Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna, ha verificato che la razza Sarda (figura 13) è diffusa oggi prevalentemente nelle zone montuose, mentre in pianura e bassa collina è stata

Figura 13: Soggetti di razza Sarda



sostituita da altre razze o dai loro incroci. Il colore del mantello degli animali di questa razza può essere nero, grigio, fulvo, pezzato. Le setole sono lunghe, numerose, ruvide ed in corrispondenza della linea dorsale formano una criniera. La testa è conica con profilo rettilineo ed orecchie piccole dirette in alto e di lato o pendenti. A volte può presentare "tettole" come la Casertana. Somaticamente ricorda molto il cinghiale con il quale

sovente si accoppia nella bassa macchia e nel sottobosco dove per lo più vive e pascola (<http://www.agraria.org/suini/sarda.htm>). Nel mese di marzo del 2006 la Commissione Tecnica dell'ANAS ha dato parere favorevole al riconoscimento del suino di razza Sarda e nel giugno dello stesso anno il DM n. 21664 ne ha sancito il riconoscimento ufficiale inserendo la razza Sarda tra le razze suine autoctone italiane. Inoltre, la razza Sarda è stata dotata, nel 2006, di Registro anagrafico, gestito dall'Associazione Nazionale Allevatori Suini (www.anas.it). I suini di razza Sarda sono allevati principalmente per la produzione di salumi tradizionali. Altrettanto importante è il consumo dei suinetti, macellati all'età di 35-45 giorni, che rappresenta uno dei piatti tradizionali della cucina tipica sarda.

Oltre alle razze del Registro Anagrafico sopra riportate è importante ricordare altre due popolazioni, il Nero di Parma e il Nero di Garlasco, che non possono essere ricondotte alle razze originarie perché estinte, ma sono validi tentativi di ricostruzione di una biodiversità antica. Infatti, sebbene negli ultimi anni siano stati fatti lodevoli sforzi per recuperare una biodiversità suina che sembrava persa irrimediabilmente, le sei razze autoctone oggi riconosciute a Registro Anagrafico sono un numero molto ristretto rispetto alle decine di razze e razzette citate nei testi di zootecnica del secondo dopoguerra. Le due popolazioni qui sotto descritte rappresentano quindi un esempio di intervento tendente a recuperare due antiche razze estinte da alcuni decenni, l'antica razza Parmigiana e la razza Garlasco. In entrambi i casi furono reperiti nel territorio soggetti riconducibili

anche parzialmente al rustico fenotipo delle razze originari, ma l'impossibilità di tracciarne geneticamente l'origine con una sicura genealogia agli ultimi discendenti della razza originaria, consigliò la creazione di nuovi tipi genetici; il tipo genetico del Nero di Parma, è stato recentemente iscritto al Registro Ibridi dell'ANAS, mentre nel caso del Nero di Garlasco l'iscrizione in questo Registro è in fase di istruttoria.

Il Tipo Genetico Nero di Parma

L'attuale Nero di Parma (figura 14), nonostante ricordi molto da vicino l'antica razza Nera Parmigiana o reggiana, attualmente estinta, deriva da una recente opera di selezione. La razza Nera Parmigiana ha un'origine antica e diversi documenti storici testimoniano come l'allevamento suino nel Parmense fosse un'attività radicata e documentata già alla fine del 1400 e come a quel tempo risultassero particolarmente apprezzati suini a mantello nero. E' del 1820 il primo documento che cita espressamente la razza Parmigiana, che viene descritta come animale caratterizzato da arti corti, setole quasi assenti, colore della pelle bruno tendente al nero, di peso ragguardevole, se paragonato alle altre allora allevate, potendo raggiungere i 190-240 kg, e produttore di carne squisita facilmente conservabile. Le mutate condizioni socio-economiche intervenute nel sistema produttivo agro-alimentare nella seconda metà dell'800 determinarono l'introduzione di alcune razze suine inglesi, che venivano reputate utili nel miglioramento delle popolazioni suine autoctone. Risale al 1873 la prima introduzione nella provincia di Parma dei suini Large White, seguita a breve distanza, nel 1876, da quella di riproduttori di razza Berkshire. Seguirono le razze Middle White, Large Black, Tamworth. La sostituzione della Nera Parmigiana con altre razze, la Large White in modo particolare, portò nel corso del secolo scorso alla sua completa scomparsa.

A partire dalla metà degli anni Novanta, fu attuata l'opera di ricostituzione di questa razza che

Figura 14: Soggetto di Nero di Parma



comprese all'inizio un capillare monitoraggio sul territorio da parte dell'Associazione Provinciale Allevatori, alla ricerca di soggetti che presentassero, almeno in parte, le caratteristiche riconducibili all'antica razza (www.suinoneroparma.it/).

I suini individuati vennero allevati e riprodotti in una struttura allestita appositamente a Santa Margherita e nel 2000 si ebbero i primi parti e si iniziò la selezione degli animali, che è stata orientata alla produzione dei

suini neri con un aspetto simile a quello dell'antica razza Nera Parmigiana; fu anche creato uno standard di razza, desunto dalla notevole bibliografia reperibile. Diversi nuclei di suini si sono costituiti sul territorio della provincia di Parma e attualmente i riproduttori della popolazione sono

stati collocati dall'ANAS in un Registro riproduttori ibridi, mantenuto presso l'associazione Provinciale Allevatori di Parma, denominato appunto "Nero di Parma". Nel gennaio 2006 è stato poi approvato da parte del competente Ministero l'istituzione di un Registro Anagrafico della razza Nera Parmigiana da parte dell'ANAS. La popolazione, a fine 2007, era costituita da circa 300 suini riproduttori. Il Nero di Parma presenta una prolificità discreta e la scrofa è dotata di buon istinto materno. Il numero medio di suinetti per nidiata è di circa 10. La conduzione degli allevamenti è di tipo familiare. Gli allevamenti sono nella maggior parte di tipo semibrado e solo poche realtà produttive si basano sul sistema di allevamento intensivo. La carne ottenuta dai suini di Nero di Parma è utilizzata prevalentemente per la trasformazione in salumi di pregio tipici della zona di allevamento, quali prosciutto crudo, culatello, coppa, pancetta, salami. In modo marginale viene utilizzata anche per il pronto consumo.

Il Tipo Genetico Suino Nero di Garlasco

Il tipo genetico del *Suino Nero di Garlasco* è stato costituito di recente allo scopo di recuperare una antica razza autoctona, la razza di Garlasco, citata da Mascheroni nel suo volume di zootecnia speciale dedicato ai suini (Mascheroni, 1927). Questa razza un tempo popolava parte del Piemonte, a sinistra del Po, nelle zone dell'alto Vercellese, e in Lombardia la Lomellina. A causa dell'introduzione di suini Yorkshire inglesi, l'area di allevamento della razza di Garlasco andò lentamente a restringersi, con la conseguente perdita di purezza, salvo piccole eccezioni costituite da soggetti allevati in purezza. Grignani, in un articolo pubblicato nel 1935 riguardante il suino di Garlasco, affermava che in diverse piccole località esistevano soggetti con le caratteristiche

Figura 15: Suino Nero della Lomellina



morfologiche, fisiologiche e funzionali dei soggetti puri (Grignani, 1935). Nel 1951 il professor Raimondo Raimondi, della Facoltà di Agraria di Torino, indagò sulla razza suina di Garlasco, stilando una relazione finale riguardo origine, area di allevamento, caratteri morfologici e fisiologici della popolazione presente a cavallo tra gli anni '40 e '50. Raimondi (1951) descrive un mantello costituito da setole ispide di colore nero, tendenti al rossiccio a livello della regione ventrale e della mammella; regione della fronte e del

naso, compreso il labbro inferiore, caratterizzate da peli bianchi, balzane bianche estese sia agli arti anteriori che posteriori e unghie bianchi-giallastri.

Queste caratteristiche si riscontrano nella popolazione oggi costituita per il recupero di questo tipo genetico (figura 15), che al febbraio 2009 risultava composta da 376 soggetti, nati fra il 2003 ed il 2009. I rilievi zootecnici (ad esempio, incrementi ponderali durante il ciclo di accrescimento e di ingrasso) effettuati su tale popolazione mostrano delle performance interessanti, con ritmi di crescita rapidi, e pertanto risultano adatti anche ad uno sviluppo industriale ma, in primo luogo, ad un uso in allevamento semi-brado in aree boschive e marginali dell'Appennino, dato che il mantello nero protegge i capi dal fenomeno di fotosensibilizzazione (Turri F., 2007). Similmente a quanto recentemente realizzato per il Nero di Parma anche per il Nero di Garlasco è stata richiesta l'istituzione di un Registro Anagrafico della razza Pursed Negar di Garlasco.

Disciplinare del Libro Genealogico e del Registro Anagrafico della Specie Suina

Il libro genealogico della specie suina rappresenta lo strumento per il miglioramento genetico delle razze suine ed ha la finalità di indirizzare, sul piano tecnico, con particolare riguardo alla valutazione genetica dei riproduttori, l'attività di selezione delle singole razze, promuovendone nel contempo la valorizzazione economica (www.anas.it). Il libro genealogico è distinto in singole divisioni per le razze Large White italiana, Landrace italiana, Duroc italiana, Pietrain.

Per quanto riguarda la finalità del libro genealogico per le diverse razze, la selezione dei suini delle razze Large White italiana e Landrace italiana si propone di mantenere la tradizionale copertura adiposa della carcassa e la qualità della carne per la trasformazione in prodotti tipici stagionati a base di carne suina. In secondo luogo la selezione si propone di migliorare i caratteri riproduttivi, con particolare riferimento alla prolificità ed all'attitudine materna. Infine, compatibilmente con le finalità sopra enunciate, la selezione mira ad aumentare la produzione economica di tagli carnosì e l'adattabilità dei suini alle condizioni di allevamento intensivo (www.anas.it).

La selezione dei suini della razza Duroc italiana si propone di contenere i depositi adiposi tra i fasci muscolari della coscia e di mantenere la tradizionale copertura adiposa della carcassa e la qualità della carne ai fini della trasformazione in prodotti tipici stagionati a base di carne suina. Inoltre, compatibilmente con le finalità sopra enunciate, la selezione mira ad aumentare la produzione economica di tagli carnosì e l'adattabilità dei suini alle condizioni di allevamento intensivo (www.anas.it). La selezione dei suini della razza Pietrain si propone di aumentare la produzione economica di tagli magri specificamente destinati al consumo fresco ovvero alla trasformazione cotta. Inoltre, la selezione punta alla completa eradicazione dalla popolazione iscritta del gene responsabile dell'ipertermia maligna (www.anas.it).

Le finalità della selezione vengono perseguite attraverso la rilevazione e l'elaborazione dei seguenti caratteri che costituiscono i criteri di selezione:

- **caratteri qualitativi** quali spessore del lardo sottocutaneo, calo di peso delle cosce durante la prima salagione, presenza ed estensione dei depositi adiposi intermuscolari;
- **caratteri quantitativi**, quali consumo degli alimenti, peso vivo e peso dei tagli ottenuti dal sezionamento della carcassa;
- **caratteri riproduttivi**, quali numero dei nati vivi e numero di mammelle;
- **genotipi**, ovvero rilevazione di genotipi ad effetto noto di particolare interesse.

Il registro anagrafico della specie suina rappresenta invece lo strumento per la conservazione delle razze suine non sottoposte ad un piano nazionale di selezione.

Il registro anagrafico si distingue in:

- a) registro delle razze estere a limitata diffusione in Italia;
- b) registro dei tipi genetici autoctoni.

Il registro delle razze estere a limitata diffusione conserva le informazioni genealogiche dei soggetti iscritti al fine di una loro corretta utilizzazione in piani di incrocio o per il loro impiego in eventuali futuri programmi nazionali di miglioramento genetico. Esso è composto da divisioni distinte per le razze Landrace Belga, Spot e Hampshire.

Il registro dei tipi genetici autoctoni conserva le informazioni genealogiche dei soggetti iscritti al fine della conservazione delle razze con particolare attenzione al mantenimento della loro variabilità genetica e promuovendone, al contempo, la valorizzazione economica. Esso è composto da divisioni distinte per le razze Cinta senese, Mora Romagnola, Nero siciliano, Casertana, Apulo-Calabrese, Sarda.

Per quanto riguarda le finalità del registro anagrafico dei tipi genetici autoctoni, la conservazione e la salvaguardia dei suini delle suddette razze si persegue mediante il consolidamento delle caratteristiche di rusticità anche attraverso il contenimento della consanguineità, nonché il miglioramento delle prestazioni produttive e riproduttive in condizioni di allevamento brado e semibrado mediante l'aumento delle capacità di sfruttamento delle risorse alimentari disponibili nelle aree marginali. Per quanto riguarda invece le finalità del registro delle razze estere a limitata diffusione in Italia, la conservazione dei suini delle razze Landrace belga, Hampshire e Spot si propone il mantenimento dei caratteri di razza in purezza.

La tipicità della selezione italiana

La qualità della carne delle cosce, la compattezza delle masse muscolari, la loro colorazione, la

copertura adiposa, la marezzatura ed altre caratteristiche fenotipiche contribuiscono a determinare, insieme agli aspetti tecnologici, la qualità di un prodotto che contraddistingue significativamente la produzione agroalimentare del nostro Paese. La selezione italiana persegue gli obiettivi comuni ai programmi di selezione di tutti gli altri paesi europei ed extraeuropei (ad esempio per quanto riguarda la sfera riproduttiva) con, tuttavia, alcuni limiti imposti dalla peculiarità della produzione del suino pesante e dalla necessità di parametri di qualità specifici (tabella 6) che la rendono idonea a soddisfare le esigenze di tutti coloro che la utilizzano (macellatori, trasformatori, distributori e consumatori). In particolare vengono prese in considerazione alcune caratteristiche che rendono la carne idonea alla produzione di salumi interi, quali ad esempio i prosciutti di Parma e San Daniele, per i quali la tecnologia di trasformazione non è in grado di correggere carenze e difetti originari. In altri termini sono utilizzati criteri di selezione correlati con l'attitudine alla salagione e alla stagionatura, intesa come capacità intrinseca delle cosce a determinare alte rese di trasformazione o bassi cali di stagionatura e a conferire ottime caratteristiche organolettiche ai prodotti stagionati.

Tabella 6: Obiettivi e criteri di selezione per la qualità della carne in razze italiane per la produzione del suino pesante

Obiettivi	Criteri
Eliminare PSE	-Test alotano (fino al 1995) -Mutazione C>T gene CRC
Evitare aumento/calò di stagionatura Migliorare le caratteristiche organolettiche	-Calò di prima salatura -Spessore del lardo dorsale
Ridurre il difetto di grassinatura (Duroc)	-GIV

Un primo obiettivo di selezione è stata l'eliminazione dell'allele recessivo del locus alotano responsabile del difetto PSE (Pale Soft Exudative) della carne, oltre che della sindrome da stress del suino (Porcine Stress Syndrome, PSS). La carne che presenta questo difetto è caratterizzata da masse muscolari di colore bianchiccio, flaccide, che lasciano trasudare dalla superficie di taglio notevoli quantità di liquido sieroso. Le conseguenze economiche sono molto rilevanti perché il difetto altera le più importanti caratteristiche qualitative della carne, quali il colore, la consistenza e il potere di ritenzione idrica ed interessa le masse muscolari che costituiscono i tagli più pregiati, come la lombata ed il prosciutto. Le caratteristiche anormali conferite dalla PSE rendono la carne meno attraente per il consumatore e meno idonea alla trasformazione in salumi tipici di alto pregio, quali sono i prosciutti crudi di Parma e di S. Daniele. Infatti, lo scarso potere di ritenzione idrica di queste carni provoca un aumento dei cali di stagionatura e della frequenza dei difetti di trasformazione (Russo e Nanni Costa, 1995). Inoltre la mortalità per PSS, soprattutto durante il trasporto, provoca notevoli perdite dal punto di vista economico. Il test fenotipico dell'alotano, che

consiste nel far inalare questo anestetico ai suini, utilizzato in Italia fino al 1995, si era rivelato utile per ridurre la frequenza dell'allele recessivo perché consentiva di distinguere ed eliminare dalla riproduzione i soggetti omozigoti recessivi nn, ma non ne permetteva l'eliminazione, perché non riusciva a distinguere gli omozigoti normali NN dagli eterozigoti portatori Nn (Russo et al., 1996). Ciò è stato reso possibile con l'utilizzo della genetica molecolare che ha individuato in una mutazione nel gene Calcium Release Channel (CRC), detto anche Ryanodine Receptor1 (RYRI), localizzato sul cromosoma 6 suino, la causa del difetto (Fujii et al., 1991). L'individuazione di questa mutazione, caratterizzata dalla sostituzione di un solo aminoacido (arginina con cisteina) della catena polipeptidica, dovuta alla sostituzione di una citosina con una timina al nucleotide 1843, ha aperto la strada allo sviluppo di un test rapido e sicuro basato sulla tecnica della PCR seguita da un'analisi con enzimi di restrizione (PCR-RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Partendo dai risultati di queste ricerche, anche in Italia è stato messo a punto un protocollo di analisi che utilizza la tecnica PCR per identificare il genotipo per la sensibilità all'alotano dei suini direttamente a livello di DNA (Russo et al., 1993). Il metodo consente una precisa identificazione del genotipo alotano. Inoltre permette di superare il problema dei falsi negativi e dei falsi positivi all'alotano, dovuti a penetranza incompleta del gene. L'eliminazione di questi errori diagnostici, pari al 4-6% per i falsi negativi e a meno dell'1% per i falsi positivi, e l'individuazione degli eterozigoti portatori del gene per la sensibilità all'alotano costituiscono un notevole vantaggio per la selezione volta ad eliminare la sindrome da stress ed il difetto PSE della carne nelle popolazioni suine. L'analisi può essere eseguita a partire da sangue, da piccolissime quantità di muscolo o grasso freschi e stagionati o da una singola setola (Russo et al., 1994). Dal 1995 il nuovo metodo viene utilizzato dall'ANAS e l'obiettivo dell'eliminazione dell'allele responsabile della predisposizione alla PSE nelle tre razze utilizzate per la produzione del suino pesante è stato pressoché raggiunto. Infatti, in base ai test effettuati nel 2004 questo allele non è stato più trovato nella razza Duroc e presenta una frequenza inferiore allo 0,01% nelle razze Large White e Landrace.

Un altro obiettivo della selezione è stato la riduzione del calo di stagionatura dei prosciutti. Per raggiungere questo scopo, in Italia si utilizza come criterio di selezione il calo di prima salatura, che misura la perdita di peso del prosciutto nei primi sette giorni di salatura. Si tratta di un parametro originale, messo a punto dalla ricerca italiana, che presenta una forte correlazione fenotipica (Russo et al., 1991) e genetica (Buttazzoni et al., 1993) positiva con il calo di stagionatura e per il quale sono stati trovati coefficienti di ereditabilità dell'ordine di 0,30-0,61 (Buttazzoni et al., 1993; Carnier et al., 1999; Ufficio Tecnico ANAS, 2003). Sfortunatamente il calo di prima salatura ha una correlazione elevata e positiva con il peso dei tagli magri ($r_g = 0,78$) e, di conseguenza, la selezione

per la sua riduzione implica come risposta correlata una riduzione di questi ultimi. Per evitare un eccessivo rallentamento nel miglioramento della quantità di tagli magri, la selezione si pone come obiettivo quello di mantenere costante il calo di prima salatura.

Contrariamente a tutti gli altri Paesi del mondo che si pongono l'obiettivo di ridurre lo spessore del lardo dorsale, in Italia la selezione per il suino pesante mira a mantenere costante questo parametro perché un'insufficiente copertura adiposa delle cosce determina un aumento del calo di stagionatura ed un peggioramento delle caratteristiche organolettiche del prosciutto. Anche questo obiettivo, come quello riguardante il calo di prima salatura, riduce il progresso genetico che si potrebbe ottenere per l'aumento dei tagli magri perché esiste una correlazione elevata e negativa tra questi e lo spessore del lardo dorsale.

Un ultimo originale criterio di selezione messo a punto dall'ANAS è rappresentato dal GIV (grasso intramuscolare visibile), che viene utilizzato per ridurre nella razza Duroc i cosiddetti difetti di "grassinatura" e di "noce" dovuti ad una elevata infiltrazione di grasso intra ed intermuscolare delle cosce (Ufficio Tecnico ANAS, 2003).

Relativamente agli obiettivi di selezione delle razze allevate per la produzione del suino pesante, se i dati esposti nella tabella 7 confermano da una parte l'efficienza del piano di selezione nazionale, dall'altra mettono in evidenza le difficoltà di dover selezionare contemporaneamente per caratteri antagonisti. Infatti, sia il calo di prima salatura che lo spessore del lardo dorsale sono correlati sfavorevolmente con la percentuale di tagli magri; di conseguenza l'aumento di questi ultimi, fortemente richiesto dall'industria di macellazione, condiziona il pieno raggiungimento dell'obiettivo di tener costante lo spessore del lardo dorsale e di non aumentare il calo di prima salatura.

Tabella 7: Risposta media annua alla selezione nelle razze per la produzione del suino pesante (Fonte: Ufficio Tecnico ANAS)

Indici	Large White	Landrace italiana	Duroc
Incremento ponderale giornaliero (g)	4	5	4
Indice di conversione	-0.017	-0.022	-0.021
Tagli magri (kg)	0.237	0.250	0.261
Spessore lardo (mm)	-0.300	-0.300	-0.400
Calo di prima salatura (g)	1	2	1
Grasso intramuscolare visibile (GIV)	-	-	-0.066
Indice di selezione	0.010	0.060	0.110

Tuttavia il risultato ottenuto dalla selezione italiana nel miglioramento di queste due caratteristiche determinanti per la qualità della carne destinata alla produzione di prosciutti DOP si può apprezzare

osservando i dati riguardanti gli indici genetici dei verri della razza Large White (tabella 8), nati da genitori italiani o da almeno un genitore proveniente da un libro genealogico estero.

Tabella 8: Indici genetici dei verri Large White con genitori italiani o esteri (Fonte: Ufficio Tecnico ANAS)

Indici	Italiani (340*)	Esteri (13**)
Calo	+10.0	+29.0
Spessore Lardo	-2.0	-4.8
Tagli Magri	+2.2	+3.1
IMG	+33.0	+59.0
ICA	-0.1	-0.2

* n. gruppi con entrambi i genitori nel Libro Genealogico italiano;

** n. gruppi con almeno un genitore nel Libro Genealogico estero

L'indice calo di prima salatura dei verri di provenienza esclusivamente dalla selezione italiana, seppur positivo, è circa tre volte inferiore a quello dei soggetti con almeno un genitore proveniente dalla selezione di altri Paesi. Analogamente, per lo spessore del lardo si osserva una minore riduzione di circa 2,8 volte più favorevole nei verri della selezione totalmente italiana. Al contrario, proprio per il sopradetto antagonismo, i verri con almeno un genitore di origine estera risultano superiori per la quantità dei tagli magri, per l'incremento ponderale giornaliero e per l'indice di conversione.

Questi dati mettono in evidenza le difficoltà della selezione per caratteri antagonisti, che i metodi attuali non sono in grado di risolvere completamente. Una prospettiva di risoluzione potrebbe venire dalla migliore conoscenza del genoma suino (argomento trattato più avanti), in particolare dall'individuazione, dal mappaggio e dalla conoscenza della fase associativa dei geni responsabili dei caratteri antagonisti.

Oltre alla qualità della carne, un altro importante obiettivo della selezione italiana riguarda il tasso di prolificità delle scrofe. L'efficienza del programma di selezione nel corso degli anni può essere valutata dai risultati conseguiti, riportati in tabella 9, i quali mostrano un andamento positivo dell'indice genetico medio (differenza nel numero di nati vivi al primo parto).

Tabella 9: Dati sull'indice genetico prolificità (Fonte Ufficio Tecnico ANAS)

Anno I parto	Landrace italiana		Large White italiana	
	N. parti di primipare	Media indici	N. parti di primipare	Media indici
1995	684	0.101	6513	0.017
1996	838	0.056	6107	0.030
1997	744	0.149	6794	0.043
1998	967	0.155	8551	0.038
1999	833	0.113	8694	0.055
2000	1219	0.146	7429	0.076
2001	1367	0.312	8039	0.088
2002	1268	0.235	8515	0.106
2003	1135	0.206	7592	0.119
2004	888	0.346	6341	0.153

In conclusione, la selezione in Italia, in particolare per quanto riguarda il suino pesante, ha raggiunto notevoli livelli mantenendo una sua tipica specificità legata alle esigenze della filiera orientata alla produzione di prosciutti DOP e in generale di prodotti di salumeria di alta qualità. Oltre alle sfide sopra descritte riguardanti la selezione di caratteri antagonisti, nel prossimo futuro, sulla base delle esigenze dell'industria suinicola, dovranno essere considerati possibili nuovi obiettivi della selezione. L'attenzione dovrà essere sicuramente rivolta agli aspetti qualitativi della carne e della carcassa identificando eventuali ulteriori parametri da considerare. Oltre a questi, particolare rilievo dovrà poi essere dato a caratteri legati alla resistenza alle malattie che presentano elevata difficoltà di rilevamento. Sono già stati descritti diversi geni associati a caratteristiche produttive, riproduttive o di resistenza alle malattie (tabella 10). Infine, è sicuramente da evidenziare che le innovazioni che derivano dal fronte della genomica avranno un impatto sempre più importante nella selezione suinicola. A questo scopo, la ricerca dovrà saper salvaguardare, valorizzare e difendere le specificità della selezione italiana nell'ambito delle innovazioni che saranno introdotte con l'applicazione delle nuove conoscenze

Tabella 10: Elenco dei principali geni associati ad alcune caratteristiche produttive, riproduttive o di resistenza alle malattie

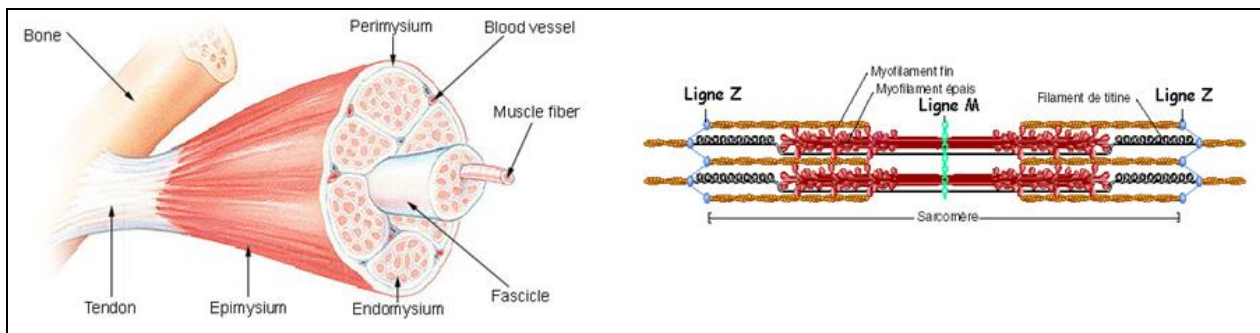
Cromosoma	Gene	Effetto	Bibliografia
1	ESR	Numero di suinetti nati	Rothschild et al., 1996
1	MC4R	Accrescimento, caratteristiche della carcassa	Kim et al., 2000
2	IGF2	Deposito grasso e muscolo	Van Laere et al., 2003
2	CAST	Tenerezza della carne	Ciobanu et al., 2004
6	RYR1	Qualità della carne, sensibilità allo stress	Fuji et al., 1991
6	FUT1	Resistenza alle malattie	Meijerink et al., 1997
15	PRKAG3	Qualità della carne	Milan et al., 2000; Ciobanu et al., 2001

Fattori che influenzano la qualità della carne

La qualità della carne è influenzata da un elevato numero di fattori, tra cui le caratteristiche del muscolo (tipo di fibra e dimensioni, grasso e tessuto connettivo), le condizioni di produzione, le condizioni ambientali (tasso di crescita, nutrizione, età, condizioni di macellazione e tempi di frollatura) e la genetica degli animali (razza, genotipo).

Le caratteristiche delle fibre muscolari giocano un ruolo centrale nella qualità della carne. La nascita e lo sviluppo della miofibra (ontogenesi) avvengono tra la formazione dell'embrione e il periodo post nascita e per molte specie (bovini, pecore e suini) il numero delle fibre muscolari è fisso (Picard et al., 2002). Il muscolo (figura 16) è uno dei migliori esempi di tessuto che ha ereditato l'abilità di adattarsi non solo per la sua attività locomotoria ma anche per sostenere svariati processi metabolici (Goldspink et al., 2002).

Figura 16: Struttura del muscolo scheletrico



Inoltre, la conversione del muscolo in carne coinvolge un gran numero di processi metabolici e cambiamenti strutturali. Le differenti fibre che compongono il muscolo scheletrico sono il risultato della coordinata espressione di un distinto set di proteine ed enzimi (Chang et al., 2003). Le proprietà contrattili e metaboliche del muscolo scheletrico influenzano fortemente l'energia metabolica per tutta la vita dell'animale (Hocquette et al., 1998) e a livello *post mortem*, durante la conversione del muscolo in carne (Monin & Quali, 1992). Alcuni studi effettuati nei bovini e nei suini (Eggert et al., 2002; Karlsson et al., 1999; Ryu & Kim, 2005) hanno dimostrato che esiste una correlazione tra le caratteristiche delle fibre muscolari e la qualità della carne e che la varietà della qualità della carne degli animali è dovuta alla differente composizione delle fibre muscolari (Ryu & Kim, 2006).

La genetica svolge un ruolo fondamentale nel designare la composizione della carcassa nel suino e la sua qualità. In generale, dal 10 al 30% delle variazioni nei caratteri qualitativi della carne e nei prodotti finiti (per esempio, pH, colore, capacità di trattenimento dell'acqua, tenerezza e marezza) è determinato dal background genetico dell'animale (Sellier et al., 1998). Purtroppo, i

caratteri che influenzano la qualità della carne hanno bassa ereditabilità e sono quindi difficili da migliorare con la selezione tradizionale. Inoltre, la loro rilevazione è difficile, costosa e possibile soltanto dopo la morte dell'animale. Infine, la mancanza di conoscenza del numero di geni che influenzano le singole caratteristiche qualitative della carne, degli effetti quantitativi dei singoli geni e delle loro interazioni, rappresenta un limite per il pieno sfruttamento delle opportunità di un piano di selezione. La genetica molecolare permette di superare questi limiti, offrendo nuove opportunità per il miglioramento della qualità della carne, in quanto fornisce gli strumenti per analizzare la variabilità genetica quantitativa direttamente a livello del DNA, fornendo la possibilità di identificare singoli geni che influenzano i caratteri qualitativi. I caratteri che influenzano la qualità della carne sono controllati da uno svariato numero di geni che mappano in regioni dette QTL (Quantitative Trait Loci), e alcuni di questi geni possono avere un effetto diretto per uno specifico carattere. Sono stati compiuti numerosi studi in questo senso per ricercare geni candidati o regioni cromosomiche responsabili della qualità della carne dei prodotti finiti. L'approccio comune nella ricerca genomica negli animali domestici in generale, consiste nel mappare e caratterizzare questi loci (Andersson et al., 2001; 2004). Tuttavia, ad oggi, la conoscenza dei geni e delle loro interazioni nel determinare le proprietà della carne sono ancora limitate e la comprensione delle basi genetiche della qualità della carne è scarsa.

La selezione assistita da marcatori (MAS) e la sua integrazione nei piani di selezione tradizionali

La maggior parte delle caratteristiche produttive e riproduttive degli animali di interesse zootecnico presentano un controllo di tipo poligenico poiché, oltre ai fattori ambientali, l'espressione del carattere stesso è determinata da una molteplicità di geni. Essi cadono in regioni del genoma denominate QTL (Quantitative Trait Loci), che consistono in loci genici o regioni cromosomiche che contribuiscono alla variabilità dei caratteri quantitativi ad ereditarietà complessa (Georges, 1998; Doerge, 2002). Un gene marcatore per un carattere quantitativo è definito come una sequenza di DNA variabile e compresente alla caratteristica quantitativa, o perché influenza direttamente il tratto o per l'associazione fisica ad un'altra sequenza nucleotidica che incide su di esso. Il numero totale di QTL che controllano uno specifico carattere non è assoluto, ma dipende da una soglia statisticamente significativa, al di sotto della quale l'effetto di un singolo locus è ritenuto troppo piccolo per essere considerato come un QTL (Johan et al., 1999). Fino a poco tempo fa si riteneva generalmente che l'architettura genetica dei tratti quantitativi consistesse di tantissimi geni, forse molte centinaia, ciascuno con un leggero effetto sul fenotipo. Se questo fosse vero, la descrizione

molecolare di un QTL non sarebbe granché vantaggiosa, perché le informazioni ottenute dalla caratterizzazione di ogni gene probabilmente non giustificerebbero l'ingente quantità di lavoro richiesta. Lo sviluppo di mappe genetiche ad alta densità dei marcatori polimorfici ha reso possibile evidenziare le caratteristiche genetiche quantitative in molte specie: i dati forniti dagli studi svolti finora hanno rivelato un'organizzazione genica molto più semplice di quella prevista. Le analisi di QTL che segregano negli incroci fra gli organismi appartenenti a linee pure, comprese piante, insetti ed animali, hanno indicato che in alcuni casi un numero limitato di geni contribuisce ad una grande proporzione della varianza di ogni tratto (Flint et al., 2001).

L'individuazione di associazione tra marcatori e QTL permette di frazionare un carattere quantitativo a variazione continua in un certo numero di loci mendeliani a variazione discontinua, chiaramente identificabili, e di attuare una selezione assistita da marcatori. Infatti, se un allele di un locus ad effetto quantitativo e un marcatore sono geneticamente associati, saranno trasmessi dai genitori ai figli in modo congiunto. Di conseguenza, utilizzando gli alleli dei marcatori per il carattere in selezione si potranno scegliere gli animali portatori delle varianti più favorevoli. Da ciò la selezione può trarre vantaggio, integrando gli attuali metodi matematico-statistici di valutazione genetica dei riproduttori con le informazioni sui geni maggiori o su marcatori associati a QTL. La selezione assistita da marcatori può influire favorevolmente su tutti i fattori che determinano il progresso genetico (accuratezza della selezione, intensità della selezione e intervallo di generazione) e può aumentare l'efficacia di quella attuata esclusivamente sulla base delle performance, soprattutto per caratteristiche che si esprimono in un solo sesso, come ad esempio la produzione del latte e il numero di nati per parto, o difficilmente misurabili sugli animali vivi, come le caratteristiche della carcassa e della carne. Inoltre, essa, potendo essere indirizzata verso specifici geni, consente di superare più facilmente i problemi posti dalle correlazioni sfavorevoli tra i caratteri obiettivi della selezione. Tuttavia, a questo proposito dovranno essere tenuti presenti gli eventuali effetti pleiotropici imputabili ad un medesimo locus e l'eventuale presenza di un elevato linkage disequilibrium tra alleli di più geni, aventi effetti opposti sui caratteri produttivi.

A seconda del tipo di informazioni disponibili è possibile utilizzare diversi approcci (Haley e Visscher, 2000):

a) Test diretti: utilizzano marcatori che identificano direttamente la mutazione funzionale. I test di questo tipo sono pochi perché richiedono la previa identificazione del gene e della mutazione responsabile della variazione. Tuttavia, essi caratterizzano in modo certo i singoli animali senza bisogno di altre informazioni sulla popolazione di origine e sulla famiglia, perché marcatori e QTL sono in completo linkage disequilibrium. Nella specie suina il gene *alotano* responsabile della

sindrome da stress del suino (PSS) e del difetto PSE (Pale Soft Exudative) della carne rappresenta un esempio di tale applicazione (Fuji et al., 1991; Otsu et al., 1991).

b) Test di associazione con marcatori in linkage disequilibrium: utilizzano un polimorfismo molto vicino alla mutazione funzionale e in linkage disequilibrium con questa. Si presuppone che il linkage disequilibrium sia molto forte e che ci sia una associazione generale tra marcatore e QTL nella popolazione. Questo tipo di associazione si può trovare più facilmente e più frequentemente, ma essa non è mai completa e diminuisce nel corso del tempo a causa della ricombinazione. La selezione basata sul locus ESR nel suino rappresenta un esempio di utilizzo dei test di associazione con marcatori in linkage disequilibrium. Rothschild e colleghi (1996) hanno trovato che questo locus è associato al numero di suinetti nati vivi. Nella razza cinese iperprolifica Meishan l'effetto dell'allele favorevole (allele B) è risultato pari ad 1,4 suinetti in più al primo parto e 0,5 in più nei parti successivi. Questi risultati non hanno trovato piena conferma nella razza Large White: infatti mentre Rothschild e colleghi (1996) hanno trovato un effetto di 0,4-0,5 suinetti in più per l'allele favorevole. Southwood e colleghi (1995) hanno osservato in alcuni casi un effetto positivo, in altri un effetto negativo. Questi risultati contraddittori nella Large White suggeriscono che probabilmente il locus ESR è soltanto un marcatore di un QTL che influisce sulla prolificità, di conseguenza l'effetto dell'allele B deve essere stimato di nuovo per ogni popolazione.

c) Test di associazione con marcatori in equilibrio da linkage: utilizzano marcatori delle regioni cromosomiche in cui si trova il QTL. In questo caso l'associazione esiste, ma varia entro famiglie. Perciò il test richiede la determinazione della fase di linkage in tutte le famiglie. Queste associazioni sono relativamente facili da trovare, ma il linkage disequilibrium diminuisce col tempo anche entro famiglie e per questo sono difficili da utilizzare nella MAS. Molti test per i QTL identificati mediante genome scanning hanno queste caratteristiche (Goddard et al., 2009)

Queste tre diverse tipologie di marcatori differiscono non solo in relazione ai metodi utilizzati per la loro individuazione, ma anche in relazione al loro impiego in ambito selettivo. Poiché i marcatori diretti e, in misura minore, anche i marcatori in linkage disequilibrium sono caratterizzati da una stretta associazione tra fenotipo e genotipo, essi consentono approcci selettivi finalizzati ad accrescere la frequenza di specifici alleli nella popolazione. Marcatori in linkage equilibrium sono caratterizzati da possibili diverse fasi di linkage in famiglie differenti appartenenti alla medesima popolazione animale. D'altra parte, per le diverse tipologie di marcatori, vi è una relazione diretta tra difficoltà di individuazione (alta per i marcatori diretti, intermedia per i marcatori in linkage disequilibrium, bassa per i marcatori in linkage equilibrium) e possibilità di utilizzo in ambito selettivo in programmi di MAS (alta per i primi, intermedia per i secondi e bassa per i terzi). Quindi, la situazione ideale per la MAS è l'utilizzo dei test diretti o, in alternativa, di marcatori in

linkage disequilibrium. Tuttavia l'ottenimento di tali marcatori può richiedere diversi anni di ricerche e grossi investimenti dal punto di vista finanziario. Per sfruttare nel miglioramento genetico le potenzialità di alcuni importanti QTL già localizzati, ma non ancora caratterizzati dal punto di vista molecolare, possono essere utilizzati gli altri tipi di test, ma prima è opportuno avere una conferma del fatto che l'effetto a loro associato sia reale. Infatti, Spelman e van Arendonk (1997) hanno dimostrato che l'utilizzo della MAS per un falso QTL causa una riduzione del progresso genetico rispetto ai metodi tradizionali. Per ottenere la conferma dell'associazione è opportuno ripetere l'esperimento in modo indipendente dal primo. La conferma può essere ottenuta nelle famiglie o linee già utilizzate oppure attraverso il monitoraggio della popolazione oggetto di selezione. È possibile che nelle popolazioni sottoposte da tempo a selezione fenotipica per un carattere quantitativo gli alleli favorevoli per determinati QTL siano già fissati. Perciò, un'altra informazione di particolare interesse per valutare il possibile utilizzo dei QTL nella MAS è la frequenza dei diversi alleli nella popolazione. I primi esempi di applicazione dei test diretti nelle specie di interesse zootecnico si sono avuti nel campo del controllo o eliminazione di alleli dannosi. L'utilizzazione dei marcatori molecolari in ambito selettivo consente di incrementare l'efficienza della selezione praticata entro razza o linea. In linea generale è possibile distinguere le seguenti strategie di utilizzazione dell'informazione genomica:

- a) selezione sequenziale: selezione dei candidati basata sull'informazione dei marcatori seguita dalla selezione basata sul valore stimato dei riproduttori (EBV, Estimated Breeding Value);
- b) selezione basata su un indice definito attribuendo pesi differenziati all'informazione dei marcatori e dell'EBV: $I = b_1 \text{Marcatori} + b_2 \text{EBV}$;
- c) preselezione in età giovanile basata sull'informazione dei marcatori o di un indice come in b) e successiva selezione basata su EBV più accurati ottenibili a età avanzate.

Si noti la costante presenza, in tutti gli approcci, di una stima (EBV) degli effetti del complesso poligenico ad azione additiva che quantifica l'effetto di tutti quei loci, non specificatamente considerati nell'informazione apportata dai marcatori considerati, che sottintendono all'espressione fenotipica del carattere quantitativo. L'incremento atteso di progresso genetico conseguibile con la MAS dipende dall'effetto che la selezione diretta per specifici loci o regioni cromosomiche esercita sulla risposta evidenziata dalla componente poligenica del carattere e sulla risposta ottenibile da altri caratteri inclusi nell'obiettivo selettivo generale. A questo proposito è opportuno sottolineare che la selezione sequenziale, pur rappresentando l'approccio selettivo più efficace in relazione alla fissazione di specifici alleli e genotipi ai loci cui l'informazione dei marcatori fa riferimento, determina risposte, a livello di complesso poligenico del carattere o di altri caratteri inclusi nell'obiettivo selettivo generale, nettamente più modeste rispetto a strategie selettive alternative. È

pertanto possibile che la selezione sequenziale, essendo, di fatto, una forma selettiva a soglie, conduca all'ottenimento di risposte selettive per il carattere e/o per l'obiettivo selettivo generale meno favorevoli rispetto a quelle garantite da approcci selettivi classici che non utilizzano informazioni su marcatori genetici. In linea generale, approcci selettivi basati su indici che combinano l'informazione dei tori con quella relativa alla componente poligenica risultano più efficienti.

La riduzione di efficienza che interventi selettivi di tipo sequenziale evidenziano rispetto ad approcci basati sull'utilizzazione di indici è funzione della dimensione degli effetti esercitati dai QTL cui l'informazione genomica fa riferimento. Se l'effetto aggregato dei QTL è molto grande in rapporto alla variabilità genetica-additiva del carattere oggetto di selezione, i due approcci presentano efficienze paragonabili. Allo stato attuale delle conoscenze e per la maggior parte dei caratteri di interesse selettivo nell'ambito della specie suina, l'informazione dei marcatori genetici disponibile è relativa a un numero limitato di QTL i cui effetti risultano essere di entità moderata. Tali considerazioni giustificano pertanto la preferenza accordata a forme selettive basate su indici, in grado di integrare l'informazione dei marcatori con quella relativa al complesso poligenico, rispetto a selezioni di tipo sequenziale. Una possibile eccezione a quanto sopra discusso è rappresentata da situazioni in cui non esiste contemporaneità in relazione alla disponibilità dell'informazione sui marcatori e quella fenotipica necessaria alla stima degli effetti additivi del complesso poligenico. In questi casi, l'effetto depressivo che l'uso dell'informazione sui marcatori esercita sulla risposta selettiva evidenziata dagli altri loci del complesso poligenico del carattere e dagli altri caratteri facenti parte dell'obiettivo selettivo generale, è ridotto ai minimi termini. Un esempio concreto per la specie suina, in seguito all'ampia diffusione delle procedure di valutazione genetica basate sul "sib test", è rappresentato dalla preselezione, effettuata nell'ambito di famiglie di fratelli pieni, dei candidati da inserire nei programmi di test. L'informazione genomica è in questo caso l'unico criterio disponibile per differenziare gli aspetti genetici individuali nell'ambito di famiglie di fratelli pieni. La valutazione genetica, operata mediante sib test, dei soggetti preselezionati fornisce successivamente il criterio sulla cui base operare la selezione tra famiglie. L'informazione dei marcatori genetici è in grado di fornire benefici all'attività di miglioramento genetico anche quando i marcatori non evidenziano associazioni significative con QTL a effetto sufficientemente ampio sui caratteri quantitativi di interesse. In tali casi, l'informazione sui marcatori genetici può essere utilizzata per incrementare l'accuratezza nella stima dei rapporti di parentela additiva utilizzati nell'ambito delle procedure BLUP Animal Model (Villanueva et al., 2005). La matrice dei rapporti di parentela additiva, utilizzata in tali procedure, viene comunemente determinata utilizzando esclusivamente informazioni genealogiche disponibili e contiene le

proporzioni attese di alleli identici per origine in comune tra individui diversi. L'utilizzazione dell'informazione genomica consente la stima delle proporzioni esatte in modo più preciso. In uno studio di simulazione, Villanueva e colleghi (2005) evidenziano che l'entità dei benefici, conseguiti all'utilizzazione dei marcatori genetici, stima della matrice dei rapporti di parentela additiva, dipende dalla dimensione del genoma (maggiore per genomi di dimensione contenuta) e dal numero di marcatori considerati (maggiore per numeri elevati di marcatori). L'utilizzazione di marcatori distribuiti secondo intervalli di mappa pari a 10 cM lungo il genoma garantisce il raggiungimento dei massimi benefici in termini di risposta alla selezione. L'impiego di routine dell'informazione genomica per la stima dei rapporti di parentela additiva nelle procedure BLUP è tuttavia condizionato a una riduzione dei costi delle tecnologie di analisi dei marcatori.

IL GENOMA SUINO

L'analisi del genoma suino ha inizio nel 1900 con i primi studi effettuati per identificare il numero dei cromosomi del cariotipo della specie (Wodsdalek, 1913). Solo successivamente, con l'introduzione delle moderne tecniche citogenetiche è stato possibile stabilire il corretto numero di cromosomi per *Sus scrofa domestica* ($2n = 38$) (Gimenez -Martin et al., 1962). Nel 1988 venne proposta una nomenclatura standardizzata, basata sul bandeggio G e R del cariotipo suino (Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig, 1988), la quale costituisce lo standard attualmente seguito. Decine di aberrazioni cromosomiche, aberrazioni numeriche e strutturali (traslocazioni e duplicazioni/delezioni), sono state descritte in letteratura, la maggior parte delle quali con effetti deleteri, in particolare sulle caratteristiche riproduttive di verri e scrofe (Chowdhary, 1998; Gustavsson, 1990). Oltre alle conoscenze relative alle possibili mutazioni cromosomiche, dal punto di vista applicativo ai fini del miglioramento genetico, il successivo passo fondamentale, seppur ancora di base, è stato quello di costruire mappe geniche contenenti marcatori del DNA e di agganciare questi marcatori a ciascuno dei 18 autosomi e ai cromosomi sessuali. I principali marcatori cromosomici sono rappresentati da polimorfismi che possono essere analizzati a livello proteico o direttamente a livello di DNA. Con l'introduzione delle tecniche di genetica molecolare è stato possibile identificare e analizzare un numero sempre più elevato di marcatori del DNA che a seconda del tipo di mutazioni o del metodo di analisi sono denominati RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), microsatelliti SSR (Simple Sequence Repeats), minisatelliti, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) e SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Il numero di marcatori individuati sulla mappa genica del suino è via via sempre più cresciuto grazie anche al pieno utilizzo della genetica molecolare. Nel 1985 il numero di geni mappati nel genoma suino era di 35 (Lalley e McKusick, 1985), nel 1989 era di 40 (Lalley et al., 1989) e nel 1992 era di 84 (Echard et al., 1992). Nel 1993 il numero di marcatori assegnati a cromosomi mediante analisi di linkage o mappaggio fisico e a gruppi di linkage non identificati su singoli cromosomi era di 172 (Andersson et al., 1993). Successivamente, grazie allo sforzo di diversi gruppi di ricerca europei e americani e grazie al lavoro del consorzio PiGMaP (che ha riunito un gran numero di laboratori di diversi paesi, fra i quali anche l'Italia) sono state pubblicate diverse mappe genetiche (di prima e seconda generazione) con una densità sempre più elevata di marcatori (Ellegren et al., 1994; Rohrer et al., 1994; Archibald et al., 1995; Rohrer et al., 1996). L'utilizzo delle tecniche di ibridazione *in situ* di sonde sul cariotipo suino (Chowdhary, 1998) e la costruzione di pannelli di ibridi di cellule somatiche

suino/roditore (Yerle et al., 1996; Zijlstra et al., 1996) hanno permesso di agganciare ed orientare le mappe genetiche ai singoli cromosomi e di costruire la mappa citogenetica (Yerle et al., 1995).

La maggior parte dei marcatori utilizzati inizialmente per la costruzione delle mappe genetiche o di linkage era rappresentata da marcatori microsatelliti che, per il loro elevato numero di alleli, risultavano particolarmente efficaci. In genere, però, i microsatelliti identificano regioni genomiche anonime. Il numero di marcatori che marcano regioni geniche integrati nelle mappe generiche disponibili, anche se inferiore rispetto a quello dei marcatori anonimi sta aumentando grazie all'identificazione di un elevato numero di SNP in geni espressi (Fahrenkruget al., 2002; Jungerius et al., 2003). Le informazioni riguardanti le mappe genetiche e citogenetiche del suino, come quelle per le 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 (RH-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'evoluzione successiva delle mappe genetiche e permettono un'alta risoluzione di mappaggio senza la necessità di identificare polimorfismi come nel caso delle mappe genetiche. Per quanto riguarda il suino, la comunità scientifica ha sviluppato inizialmente due RH-panel, il 7000 rad INRA/University of Minnesota Radiation Hybrid panel (IMpRH; Yerle et al., 1998) e il Pig T43 Whole Genome panel (Archibald & Goodfellow, disponibile presso il Research Genetics). Grazie a questi due RH-panel sono state costruite le prime Radiation Hybrid map (RH map) per la specie suina (Hawkenet al., 1999; Rattink et al., 2001; Rink et al., 2002). Un terzo pannello (SSRH, 5000 rad), sviluppato in Giappone ha permesso di ottenere una mappa RH a media risoluzione (Hamasima et al., 2003). Un quarto pannello, l'IMNpRH2 (Yerle et al., 2002), sviluppato grazie ad una collaborazione tra l'INRA, l'Università del Minnesota e l'Università del Nevada, è stato costruito utilizzando una dose di radiazioni maggiore (12000 rad) in modo da frammentare di più il genoma suino e quindi permettere una maggiore risoluzione di mappaggio. Questo pannello è stato infatti applicato per risolvere in modo più preciso alcune regioni del genoma suino e permettere una comparazione più fine con il genoma umano (Martins-Wess et al., 2003; Liuet al., 2005). Per poter passare direttamente dalle mappe genetiche o dalle RH map alla dimensione fisica effettiva del DNA, per consentire il sequenziamento di regioni delimitate da due marcatori e per costruire contig, anche nella specie suina sono stati sviluppati altri strumenti quali le librerie di larghi inserti: librerie YAC (Yeast Artificial Chromosome), BAC (Bacterial Artificial Chromosome) e PAC (Plasmid Artificial Chromosome), alcune delle quali sono disponibili anche commercialmente. Per la specie suina sono state costruite inizialmente diverse librerie YAC (Leeb et al., 1995; Alexander et al., 1997; Rogel-Gaillardet al., 1997) e successivamente gli sforzi sono

stati rivolti verso la costruzione di librerie BAC (Rogel-Gaillard et al., 1999; Anderson et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Fahrenkrug et al., 2001) che presentano minori problemi di chimerismo e riarrangiamento rispetto alle librerie YAC e una maggiore facilità di isolamento del DNA clonato. Grazie all'identificazione e al mappaggio di geni a funzione nota è emerso che per gruppi di geni vi è una conservazione di sintenia nei cromosomi tra diverse specie da cui nasce il concetto di mappaggio comparativo, che ha come obiettivo il trasferimento e il confronto delle informazioni relative alla posizione di geni tra le varie specie, con particolare riferimento al confronto tra uomo/topo e gli animali di interesse zootecnico (Gellin et al., 2000). Un metodo alternativo di mappaggio comparativo, detto Zoo-FISH o "chromosome painting" (Chowdhary et al., 1998), che prevede l'ibridazione di cromosomi di una specie al cariotipo di un'altra specie, ha permesso, anche in assenza di informazioni sul mappaggio di geni, di identificare 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. Questo metodo è stato utilizzato anche per il suino (Rettenberger et al., 1995; Goureau et al., 1996; Fronicke et al., 1996) ottenendo informazioni che sono state utilizzate come riferimento nel mappaggio comparativo di geni omologhi.

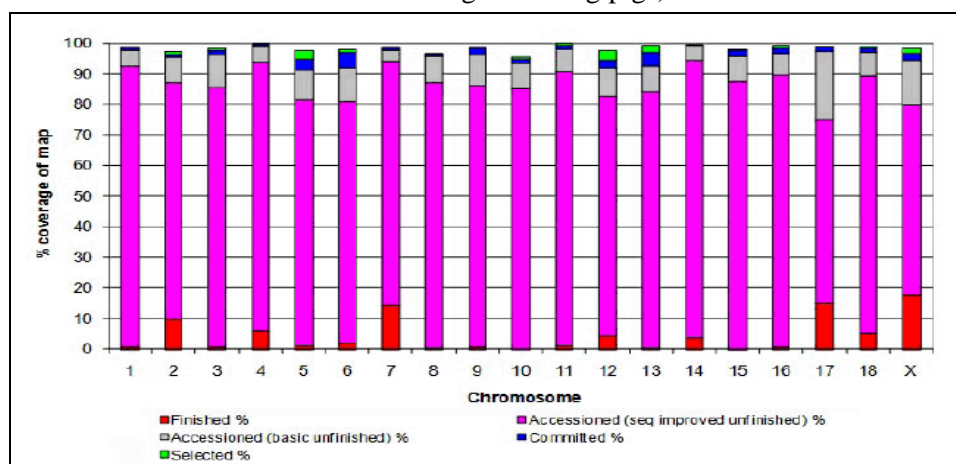
La costruzione della mappa genetica definitiva del suino si ottiene assemblando le informazioni relative alla sequenza completa del genoma con l'identificazione di tutti i geni. Come primo passaggio del sequenziamento del genoma del suino, sono state caratterizzate le regioni trascritte grazie al sequenziamento di Expressed Sequence Tags (EST). Le EST sono brevi sequenze di cDNA e rappresentano l'attività trascrizionale dei diversi tessuti e quindi i geni, spesso a funzione non nota, che pur costituendo una minima percentuale del DNA di un genoma, rappresentano la parte più importante. Nel suino sono state quindi costruite alcune librerie a cDNA tessuto specifiche tra le quali si possono ricordare quelle ottenute da intestino (Wintero et al., 1996; Dvorak et al., 2005), da vari tessuti riproduttivi femminili (Tosser-Kloppet et al., 1997; Fahrenkrug et al., 2002; Caetano et al., 2003), da cervello (Nobis et al., 2003), da tessuti collegati alla risposta immunitaria (Rink et al., 2002) o specifici dello stadio embrionale (Smith et al., 2001; Fahrenkrug et al., 2002) dalle quali sono state isolate una buona parte delle EST disponibili in banca dati per questa specie. In particolare, per quanto riguarda i tessuti direttamente correlabili con la qualità della carne, l'Università di Bologna ha costruito una libreria a cDNA da tessuto muscolare scheletrico di suino adulto dalla quale sono state isolate più di 1000 EST (Davoli et al., 1999; Davoli et al., 2002). Successivamente altri gruppi di ricerca hanno contribuito ad aumentare il numero di EST depositate in banca dati derivanti dal tessuto muscolare o da un altro tessuto importante per la qualità della carne, il tessuto adiposo (Yao et al., 2002; Mikawa et al., 2004; Pan et al., 2005).

Per il completamento sistematico del sequenziamento del genoma suino sono stati costituiti diversi consorzi internazionali. Tra questi, la cooperazione sino-danese è quella che ha contribuito maggiormente in termini di “trace records” depositati in banca dati. La copertura ottenuta da questo consorzio di 0.66X del genoma suino è derivata da circa 3,84 milioni di sequenze ottenute utilizzando la strategia di sequenziamento denominata “shot-gun” (Wernersson et al., 2005) per un totale di 2 miliardi di basi sequenziate. Partendo da questa enorme mole di sequenze è stato possibile compiere alcune valutazioni relative alla struttura del genoma suino che si è confermata più simile a quella dell’uomo, rispetto a quella di topo.

Un’altra strategia per arrivare al completamento del sequenziamento del genoma suino è stata quella utilizzata da alcuni gruppi di ricerca coordinati dall’Università dell’Illinois, USA. Il loro approccio ha permesso di generare mappe RH ad alta risoluzione ed ancorarle a cloni BAC, per facilitarne la costruzione di contig e l’integrazione con la mappa di linkage (Meyers et al., 2005).

Infine, un ulteriore passo avanti nel sequenziamento del genoma suino è stato compiuto negli ultimi anni dal Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC). Nel corso degli ultimi due anni, questo Consorzio ha elaborato linee guida per integrare le mappe fisiche e per definire una comune strategia di sequenziamento. Nel 2005, nel corso del convegno “Plant and Animal Genomics” (San Diego, CA) sono stati presentati i dati riguardanti il completamento del mappaggio comparativo uomo-maiale. Inoltre, grazie alla creazione di librerie shotgun di tutto il genoma (WG) è stato possibile raggiungere una copertura 3X del genoma suino, ponendo le basi per il successivo sviluppo del progetto 6X. I cromosomi suini sono oggi sequenziati al 90%, fornendo una copertura del genoma pari al 95,72% (figura 17). È attualmente in corso il sequenziamento dei cromosomi X e Y e a breve sarà completato un progetto che si pone come obiettivo una copertura di 10X del genoma suino (www.animalgenome.org/pigs).

Figura 17: Copertura della mappa genomica nei cromosomi suini (dati aggiornati al 1 gennaio 2010, www.animalgenome.org/pigs)



Analisi molecolare del genoma suino: dalla ricerca di QTL ai sistemi *high-throughput* di genotipizzazione

Le mappe genetiche rappresentano il punto di partenza per l'individuazione, il mappaggio e l'isolamento dei geni che hanno un effetto sulle caratteristiche produttive e riproduttive di interesse zootecnico. L'utilizzo delle informazioni relative ai QTL nei piani di selezione delle specie di interesse zootecnico riveste un importante aspetto innovativo, che si integrerà nel futuro con i metodi tradizionali di miglioramento genetico basati sulla genetica quantitativa.

L'analisi del DNA e l'impiego dei marcatori molecolari aiuta l'identificazione dei QTL. Due i possibili approcci per identificare i QTL:

- il genome scanning (scansione del genoma);
- l'approccio del gene candidato.

Con il genome scanning si analizza tutto il genoma dell'animale, tipizzando un certo numero di marcatori informativi, in genere microsatelliti anonimi. I microsatelliti sono tratti di DNA in cui sequenze di 1-5 nucleotidi sono ripetute un numero variabile di volte. Mediamente i microsatelliti presentano un numero elevato di alleli, caratteristica che rende questi marcatori altamente informativi. In genere i microsatelliti si trovano in regioni anonime del DNA, cioè in regioni che non codificano per un carattere. Mappe dense di microsatelliti contenenti oltre 1.000 marcatori sono state sviluppate per tutti i principali animali da allevamento (www.genome.iastate.edu).

L'efficacia del "genome scanning" dipende dal numero di marcatori che sono tipizzati, dallo schema sperimentale e dal numero di animali analizzati. Quindi, con opportuni approcci statistici si arriva a identificare una regione cromosomica, delimitata in genere da due marcatori anonimi, che ha un effetto rilevante sulla variabilità di un carattere produttivo.

L'approccio del gene candidato si basa sull'ipotesi che alcuni geni, in base alla loro funzione fisiologica e biochimica, possano influenzare direttamente o indirettamente un carattere produttivo. L'utilizzo di geni candidati può portare velocemente all'identificazione dei QTL in quanto si studiano direttamente associazioni tra polimorfismi (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) in questi geni e i caratteri produttivi senza analizzare completamente il genoma come nel caso del genome scanning.

Il "genome scanning" e lo studio del gene candidato sono in realtà complementari. L'informazione riguardante la posizione di un possibile gene candidato nella mappa rispetto alla posizione del QTL relativo permette di discriminare uno specifico gene tra tutti i possibili candidati. Combinando l'informazione che deriva dai numerosi esperimenti effettuati con incroci programmati per identificare QTL per i principali caratteri di interesse zootecnico con le informazioni relative al mappaggio dei geni nelle regioni cromosomiche che contengono i QTL, è possibile ridurre di molto

il numero dei geni candidati da considerare. Una volta individuato un set di marcatori molecolari in linkage con geni che hanno effetto su uno specifico carattere produttivo, è possibile usare questi marcatori in programmi di miglioramento genetico. Infatti, se un allele di un locus ad effetto quantitativo e un marcatore di DNA sono in linkage, questi co-segregheranno nelle generazioni successive. Di conseguenza, basandosi sugli alleli dei marcatori per il carattere sottoposto a selezione si potranno scegliere gli animali portatori delle varianti più favorevoli. Da ciò la selezione può trarre vantaggio, integrando gli attuali metodi matematico-statistici di valutazione genetica dei riproduttori con le informazioni sui geni maggiori o sui marcatori associati ai QTL.

La vasta ricerca, svolta da molti gruppi diversi al fine di ampliare le conoscenze di base per quanto riguarda i geni per i caratteri quantitativi, si riflette nel notevole aumento avvenuto negli ultimi anni del numero di geni depositati nelle banche dati. Fino ad oggi, diversi geni che influenzano la composizione corporea e la qualità della carne sono stati identificati nel suino utilizzando sia l'approccio del gene candidato che del genome scanning, come descritto nei capitoli successivi.

Schemi di selezione basati su marcatori del DNA associati a caratteristiche produttive non potranno però sostituire gli schemi di selezione attualmente utilizzati, ma questi marcatori molecolari potranno essere utili per un loro miglioramento.

Il genome scanning nel suino

Il "genome scanning" nel suino è stato compiuto in genere utilizzando marcatori microsatelliti distribuiti in modo da coprire tutto il genoma, o solo alcuni cromosomi, e tipizzati in popolazioni artificiali (back-cross e incroci a tre generazioni). Gli animali parentali di queste popolazioni in genere appartengono a razze divergenti per molti caratteri produttivi (Large White X Meishan, Landrace X Meishan, Large White X cinghiale, cinghiale X Pietrain, Meishan X Pietrain, Large White X Pietrain, Yorkshire X Berkshire, ecc.) in modo da massimizzare la potenza statistica per identificare regioni cromosomiche contenenti QTL.

È stata anche costituita una banca dati in cui sono riportati la maggior parte dei QTL identificati nel suino (PigQTL Database, www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html). Complessivamente in questa banca dati sono stati inclusi circa 6.000 QTL per 581 diversi caratteri. L'elevato numero dei QTL depositati deriva dal fatto che sono riportati studi effettuati utilizzando le stesse popolazioni sperimentali o perché differenti studi condotti analizzando popolazioni diverse identificano i QTL nelle stesse regioni genomiche, confermando quindi l'importanza di alcuni di questi in linee o razze diverse. Inoltre è da tener presente che in realtà, alcune regioni QTL hanno un effetto su più caratteri correlati tra di loro.

Tutti i cromosomi del suino contengono QTL. I cromosomi 1, 2, 4, 6 e 7 sono quelli per i quali sono stati effettuati più studi e per i quali, di conseguenza, sono stati riportati il numero più elevato di QTL. Nel 1994 Andersson utilizzò la tecnica del "genome scanning" per effettuare una ricerca di QTL in una popolazione di suini provenienti dall'incrocio di un cinghiale con femmine Large White: l'intento era quello di individuare i loci con effetto sull'incremento ponderale e sulla deposizione del grasso utilizzando due popolazioni fenotipicamente molto diverse per questi caratteri. Il risultato di questo esperimento fu l'individuazione di numerosi QTL sul cromosoma 4, riguardanti il tasso di crescita, il grasso e la lunghezza del piccolo intestino (Andersson et al., 1994). In particolare, questo studio ha permesso di identificare sul cromosoma 4 il primo importante QTL che influenza prevalentemente lo spessore del grasso dorsale. La presenza di questo QTL, denominato FAT1, è stato confermato in successivi studi effettuati sulle stesse popolazioni sperimentali (Knatt et al., 1998; Marklund et al., 1999). Altri studi tendono ad avvalorare l'ipotesi che più QTL con effetto sullo spessore del grasso dorsale e sull'accrescimento siano localizzati abbastanza vicini su questo cromosoma (Cepica et al., 2003; Mercadé et al., 2005).

Un altro importante QTL con effetto sullo spessore del grasso dorsale, identificato tramite diversi incroci sperimentali tra Meishan e altre razze commerciali, è stato localizzato sul cromosoma 7, in un'ampia regione che include anche il complesso maggiore di istocompatibilità (Bidanel et al., 2001). Questo QTL parrebbe essere di particolare interesse per la selezione nelle razze commerciali in quanto l'allele associato ad un maggiore spessore del lardo è quello che segrega nelle razze europee, a differenza di quanto ci si potrebbe aspettare dalle caratteristiche di maggiore adiposità della razza cinese Meishan (Bidanel et al., 2001).

Sul cromosoma 1 sono stati studiati QTL per molti caratteri ed anche alcuni geni candidati per l'accrescimento (MC4R) e per le caratteristiche riproduttive (ESR).

Il cromosoma 6 suino è stato uno dei primi ad essere intensamente studiato perché su questo, già utilizzando marcatori proteici, era stato localizzato il locus per la sensibilità all'alotano, che determina anche importanti effetti sulla qualità e quantità di produzione di carne (Sellier, 1998; Monin et al., 1999). Inoltre, alcuni studi ipotizzano che molto vicino al locus alotano siano presenti altri geni con effetto importante sui caratteri legati alla produzione di carne e perciò a questa regione del cromosoma 6 è stata data priorità nelle attività di costruzione di mappe comparative, sequenziamento ed assemblaggio delle sequenze.

Un altro cromosoma oggetto di intensi studi per l'identificazione di QTL è il cromosoma 2 sul quale, nella regione telomerica del braccio p in cui mappa il gene IGF2, è stato identificato un QTL con effetti sul deposito di grasso e l'accrescimento muscolare che manifesta imprinting paterno

(Jeon et al., 1999; Nezer et al., 1999). In altre regioni di questo cromosoma sono stati identificati QTL per lo spessore del lardo dorsale e la tenerezza della carne.

Sul cromosoma 8, invece, diversi studi hanno confermato la presenza di uno o più QTL per alcune caratteristiche riproduttive quali numerosità della nidiata, numero di embrioni, numero di corpi lutei, numero di uova liberate, età al primo estro, peso delle ovaie, peso e lunghezza delle corna uterine, livello plasmatico dell'FSH e numero di mammelle.

I 5.986 QTL attualmente identificati nel suino possono essere raggruppati anche per tipo di carattere. Quelli che sono riconducibili alle caratteristiche qualitative della carne sono i più numerosi, seguiti da quelli relativi all'efficienza produttiva e riproduttiva. Solo 16 sono i QTL fino ad ora identificati relativi alla resistenza alle malattie. I principali QTL per la qualità della carne sono riportati in tabella 11, quelli per i caratteri riproduttivi in tabella 12.

Tabella 11: Principali QTL per la qualità della carne suina

Cromosoma	Carattere	Varianza spiegata da QTL	Bibliografia
2	Capacità di ritenzione idrica (2 QTL)	5,85; 2,94	Malek et al., 2001
2	Tenerezza	3,08	Malek et al., 2001
4	% di grasso intramuscolare	-	de Koning et al., 1999
6	Capacità di ritenzione idrica	6,14	Malek et al., 2001
6	% di grasso intramuscolare	-	Ovilio et al., 2002
7	% di grasso intramuscolare (2 QTL)	-	De Koning et al., 1999
15	PH; potenziale glicolitico	5,61; 6,21	Malek et al., 2001 Ciobanu et al., 2001
18	Drip loss	-	de Koning et al., 1999
X	Percentuale di grasso intramuscolare	-	Harlizius et al., 2000

Tabella 12: Principali QTL per i caratteri riproduttivi femminili.

Cromosoma	Carattere	Bibliografia
1	Numero di mammelle	Cassady et al., 2001
4	Numero di suinetti nati morti	Wilkie et al., 1999
5	Numero di suinetti nati morti	Cassady et al., 2001
7, 8 e 12	Età al primo estro	Cassady et al., 2001
8	Numerosità della nidiata	King et al., 2003
8	Numero di uova liberate	Rathje et al., 1997
8	Numero di corpi lutei	Wilkie et al., 1999
8	Peso delle ovaie; peso e lunghezza di corna uterine	Rohrer et al., 1999
8, 9 e X	Livello plasmatico dell'FSH	Rohrer et al., 2001
9, 10 e 15	Numero di uova liberate	Rohrer et al., 1999
10	Età al primo estro	Rohrer et al., 1999
11	Numero di mammelle	Cassady et al., 2001
13	Numero di suinetti nati morti	Cassady et al., 2001

È interessante notare che solo un numero limitato dei QTL trovati sono stati ulteriormente indagati, al punto da essere ritenuti responsabili di una mutazione causativa. Questo discorso include il gene IGF2 (Jeon et al., 1999; Van Laere et al., 2003) per la muscolatura e il gene PRKAG3 (Ciobanu et al., 2001; Milan et al., 2000) per la qualità della carne, che si trova sul cromosoma 15. Inoltre, un altro QTL mappato sul cromosoma 2 e con effetto sulla tenerezza della carne è associato con il gene CAST, anche se la mutazione causativa responsabile del QTL non è stata ancora riportata (Ciobanu et al., 2004; Meyers et al., 2007).

Le ragioni per cui solo pochi QTL sono stati caratterizzati a livello genetico sono molteplici. Per esempio, la maggior parte degli esperimenti di rilevazione dei QTL sono stati condotti mediante incroci sperimentali, mentre sarebbe necessario invece eseguire il mappaggio degli stessi all'interno delle popolazioni commerciali (Dekkers et al., 2004). Un altro inconveniente è costituito dalla bassa risoluzione della mappa genetica utilizzata nella maggior parte degli esperimenti. Infatti, anche se la distanza media tra i marcatori è di circa 2-3 cM, sono ancora presenti grandi lacune nella mappa genetica di linkage dei suini (<http://www.marc.usda.gov/genome>). Un altro limite è determinato dal fatto che la dimensione dell'effetto osservato per un QTL può essere troppo piccolo per essere validato a causa dei costi e dei tempi necessari, influenzando così l'applicazione dei risultati sperimentali alle popolazioni commerciali (Wernersson et al., 2005; Dekkers et al., 2004).

Si può quindi concludere che il mappaggio dei QTL non ha avuto molto successo per l'identificazione di geni che determinano tratti complessi come la qualità della carne. Tuttavia, dal momento in cui è stato reso possibile mappare i QTL nei suini sono stati fatti numerosi progressi e sono stati pubblicati diversi lavori sull'argomento (Ovilo et al., 1999; Thomsen et al., 2004; Max et al., 2007). Inoltre, grazie alla recente disponibilità di mappe dense di marcatori e con i nuovi approcci di analisi è diventato possibile analizzare l'intero genoma per i marcatori in tutta la popolazione in linkage disequilibrium con i QTL (Hu et al., 2006; Liu et al., 2007).

L'approccio del gene candidato nel suino

Nello stesso tempo, la ricerca si è concentrata anche sullo studio di singoli geni potenzialmente coinvolti in modo più o meno diretto nella determinazione fenotipica di caratteri produttivi, ovvero dei geni candidati. Fino ad ora nel suino sono stati identificati e caratterizzati dal punto di vista molecolare solo pochi geni e mutazioni funzionali con effetti QTL, tra i quali si possono ricordare il gene della sensibilità all'alotano e della resa Napole, responsabili, rispettivamente della PSS e del difetto della carne acida, che sono già utilizzati in diversi programmi nazionali di selezione (Dekkers, 2004). Uno dei primi esempi riportati in letteratura riguarda l'identificazione del gene

responsabile della *Porcine Stress Sindrome* (PSS). La sindrome da stress si manifesta nella perdita di conoscenza o addirittura nella morte degli animali a causa di stress ambientali, quali ad esempio il trasporto dalle aziende agricole ai macelli. Le carni PSE si presentano invece pallide e acquose, a causa di una rapida diminuzione del pH e di una forte contrazione muscolare *post rigor mortis*.

La prima indicazione di una causa genetica per la *Porcine Stress Sindrome* venne fornita nel 1977 da uno studio di Smith e colleghi sulla reazione al test dell'alotano; il gene deputato, definito in un primo tempo HAL, mostrò una penetranza incompleta, ovvero gli eterozigoti, portatori sia dell'allele wild-type che di quello mutato, non presentavano nessuna reazione al test. Per questa ragione si rese indispensabile un test genetico che impedisse all'allele mutato di propagarsi all'interno della popolazione suina. Successivamente il gene fu trovato all'interno del gruppo di linkage dei geni per la fosfoesoso isomerasi (PHI) e la fosfogluconato deidrogenasi (PGD) (Gahne e Juneja, 1985), e in seguito localizzato sul cromosoma 6 suino (Davies et al., 1988). Nel 1991 Fujii e colleghi individuarono nel gene per il recettore della ryanodina (gene RYR1) una mutazione C→T, associata all'insorgenza della PSS. Questo recettore è un grosso canale ionico situato sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico del muscolo scheletrico ed è formato da quattro subunità identiche; il suo ruolo metabolico è quello di rilasciare Ca²⁺ all'interno del reticolo per indurre la contrazione. La mutazione puntiforme sul gene RYR1 causa una mutazione a livello della sequenza proteica (Arg615Cys), che si traduce in un rilascio incontrollato di Ca²⁺ e in un conseguente ipermetabolismo (Melzer e Ietze, 2001). Il ruolo di questa proteina nel rilascio del Ca²⁺ è stato studiato da Otsu e colleghi nel 1991. Un'analisi di linkage sul gene RYR1 per il canale di rilascio del Ca²⁺ ha confermato la presenza di questo gene all'interno del gruppo del gene HAL (Mariani et al., 1992). Infine nel 1993 è stato condotto da Houde e colleghi un “*restriction endonuclease assay*”, o REA, attraverso il quale è stato caratterizzato il polimorfismo del gene HAL: la mutazione è stata individuata sul nucleotide 1843. Questa mutazione si è diffusa tra le razze suine commerciali in seguito all'introduzione di programmi di selezione mirati alla riduzione di lardo e ad una maggiore resa magra ed è più frequente nella razza Pietrain rispetto ad altre razze suine. Dal momento che i portatori di questa mutazione possono determinare la formazione di carni PSE, mediante un test basato su PCR-RFLP è oggi possibile identificare i portatori di questa mutazione (Russo et al., 1993). Dal 1995 il metodo viene utilizzato dall'ANAS e l'obiettivo dell'eliminazione dell'allele responsabile della predisposizione alla PSE nelle tre razze utilizzate per la produzione del suino pesante è stato pressoché raggiunto. Infatti, in base ai test effettuati nel 2004 questo allele non è stato più trovato nella razza Duroc e presenta una frequenza inferiore allo 0,01% nelle razze Large White e Landrace (Fontanesi et al., 2007).

Un'altra famosa mutazione nella storia dello studio della qualità della carne suina è quella identificata per la prima volta in Francia nel 1986 da Neveau, all'interno di una popolazione mista di suini, appartenenti a due razze (Penshire e Laconie) derivanti da incroci con la razza inglese Hampshire: queste razze, le quali presentavano una carne acida nel periodo immediatamente successivo all'abbattimento, furono studiate andando a valutare il potenziale glicolitico muscolare, per quello che venne definito da Neveau "Rendement Napole"; l'allele mutato del gene, chiamato RN-, venne successivamente identificato da Le Roy e colleghi (1990) come una caratteristica propria della razza Hampshire. I suini portatori dell'allele dominante RN-, rispetto ai suini normali omozigoti recessivi rn^+rn^+ , presentano un più alto contenuto di glicogeno muscolare (più del 70%) che causa un basso pH_u il quale a sua volta determina minore capacità di ritenzione idrica, maggiori perdite di cottura e colorazione pallida della carne. Tuttavia, correlazioni statisticamente significative tra potenziale glicolitico e alcune caratteristiche tecnologiche della carne sono state evidenziate anche in suini pesanti che non presentano l'allele negativo a questo locus (Nanni Costa et al., 2000).

Per identificare il genotipo dei suini a questo locus è stata utilizzata la misura della resa Napole, la misura del potenziale glicolitico e il contenuto di glicogeno del muscolo *post mortem*. La resa Napole viene determinata come la differenza di peso tra il muscolo prima e dopo la cottura effettuata con procedure particolari. Il potenziale glicolitico esprime la quantità di composti glucidici presenti nel muscolo suscettibili di essere trasformati in acido lattico e si determina con la formula di Monin e Sellier (1985): potenziale glicolitico = [(glicogeno)+(glucosio-6-fosfato)+(glucosio)]*2+(acido lattico). I suini con potenziale glicolitico superiore a 180 pmol/g di lattato equivalente venivano classificati come portatori dell'allele RN-. Un'elevata correlazione è stata identificata tra il potenziale glicolitico e il contenuto di glicogeno del muscolo a 24 ore dalla morte e di conseguenza anche quest'ultima misura è stata utilizzata per identificare i suini portatori dell'allele RN-. Tutti questi metodi di analisi non sono precisi al 100%, richiedono analisi di laboratorio costose e devono essere effettuati sul muscolo *post mortem* (sebbene la misura del potenziale glicolitico possa essere determinata anche su materiale muscolare prelevato *in vivo* mediante biopsia). Utilizzando famiglie di suini e questi parametri per classificare gli animali sulla base del genotipo al locus RN, è stato possibile mappare questo gene sul cromosoma 15 di suino mediante la tipizzazione di marcatori del DNA che cosegregavano con l'allele RN- (Mariani et al., 1996; Milan et al., 1996; Loofr et al., 1996). Nel 2000 Milan e colleghi identificarono il gene RN come una mutazione non conservativa (R200Q) del gene PRKAG3, che codifica per un'isoforma muscolo-specifica della subunità regolatoria γ dell'AMPK (Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase). Un anno dopo Ciobanu e colleghi utilizzarono questo gene come candidato in uno

studio sul contenuto di glicogeno del muscolo scheletrico suino e sul miglioramento della qualità della carne, sulla base della scoperta di numerosi QTL riguardanti questo carattere nella zona del cromosoma 15 (Malek et al., 2001). Infine, in uno studio compiuto in una popolazione di incroci Berkshire x Yorkshire non fu rilevata la presenza dell'allele RN-, ma venne individuato un nuovo allele di PRKAG3 coinvolto nella determinazione del contenuto di glicogeno (Ciobanu et al., 2001). Anche in questo caso è stato messo a punto un metodo di analisi PCR-RFLP per identificare i suini portatori dell'allele negativo (Fontanesi et al., 2003). Più recentemente è stato condotto uno studio sul ruolo dell'AMPK γ 3, codificato da un allele mutato di PRKAG3, attraverso l'utilizzo di topi knock-out: il lavoro ha confermato l'associazione tra la mutazione e la patologia e ha fornito informazioni importanti sull'uso di questa isoforma proteica come target per la prevenzione dell'insulino-resistenza (Barness et al., 2004). Entrambi i geni PRKAG3 e RYR1 sono stati studiati in associazione per valutare il loro possibile effetto combinato in una popolazione generata a partire da verri Hampshire, eterozigoti per entrambi i geni, e scrofe Hampshire omozigoti per entrambi gli alleli *wild type*: il risultato di quest'indagine ha confermato un effetto negativo additivo su pH, colorazione e capacità di trattenere i liquidi degli individui portatori degli alleli mutati (Hamilton et al., 2000).

Recentemente, nel gene PRKAG3 sono state identificate altre tre mutazioni che determinano, ciascuna, un cambiamento di un aminoacido (T30N, G52S, I199V). Queste mutazioni influenzerebbero il pH_u e il colore della carne nelle razze Landrace, Large White, Duroc e Berkshire e in una linea sintetica di Duroc (Ciobanu et al., 2001). Benchè nelle popolazioni di suini commerciali analizzati fosse stato osservato un aumento della frequenza della mutazione RN, Fontanesi e colleghi (2003) hanno dimostrato che l'elevato valore del potenziale glicolitico non era dovuto alla presenza dell'allele RN nei suini esaminati. Tuttavia, i dati confermano l'effetto di altre mutazioni a livello del locus PRKAG3 (T30N e G52S) sulla qualità della carne. Inoltre, nello stesso studio era stato osservato che il contenuto di glicogeno muscolare dipendesse significativamente dal genotipo di PGAM2 (fosfoglicerato mutasi 2), (Ciobanu et al., 2001).

Un ulteriore esempio di studio di geni candidati per caratteri legati alla qualità e alla produzione della carne suina è quello sui geni CSTB (cistatina B) e CTSB (catepsina B) (Russo et al., 2002). I prodotti di questi due geni sono enzimi proteolitici deputati alla distruzione delle proteine durante la fase di stagionatura del prosciutto. Mediante la tecnica RFLP-PCR è stato investigato il polimorfismo di questi geni e la sua potenziale associazione con caratteri di importanza economica, quali ad esempio lo spessore del lardo dorsale, l'incremento ponderale medio giornaliero. La sequenza completa di questi due geni è depositata in banca dati (CTSB: Accession Number

AJ315559; CSTB: Accession Number AJ315561), e sono stati descritti diversi polimorfismi dovuti a mutazioni puntiformi con effetti sulla proteolisi.

Sempre a proposito della qualità della carne vale la pena ricordare una recente ricerca svolta sul gene calpastatina (CAST, GeneID: 397135). I processi di frollatura *post mortem* sono molto importanti per l'ottenimento di un prodotto di buona qualità. La tenerezza della carne è infatti fortemente legata al tasso di proteolisi di alcune importanti proteine strutturali del muscolo legate all'attività *post mortem* della calpastatina (Jones et al., 1998; Parr et al., 1999). La calpastatina (CAST) è un inibitore specifico della proteasi μ -e m-calpaina. Il sistema proteolitico calpaina-calpastatina è attivato dalla concentrazione di ioni Ca^{2+} e svolge un ruolo importante nella trasformazione del muscolo scheletrico, a causa della sua partecipazione alla degradazione di importanti proteine miofibrillari (Kocwin-Podsiadla et al., 2003).

Lo studio effettuato da Taylor e collaboratori (2005) ha dimostrato la presenza di diversi alleli del gene CAST, di cui uno associato alla minore perdita di tenerezza durante la cottura, all'elevata succosità e ad una maggiore qualità del prodotto dovuta a una diversa fosforilazione dell'enzima, che si riflette sul fenotipo finale del muscolo (Ciobanu et al., 2004). Collegata allo studio del fenotipo del muscolo della coscia nel suino adulto, è la ricerca di Davoli e colleghi (2003) sui geni candidati MYH4 (myosin heavy chain 2B) e HUMMLC2B (skeletal muscle myosin regulatory light chain 2), geni altamente espressi nelle fibre rapide del muscolo adulto. L'indagine riguardava lo studio del polimorfismo in una popolazione costituita da sette differenti incroci. Il risultato fu l'identificazione di un SNP in ciascun gene e l'indicazione di una possibile associazione con l'incremento ponderale nei suini di razza Large White.

Il tenore di grasso intramuscolare ha una grande influenza sulla qualità della carne nei suini, in quanto determina la marezza del muscolo. Le proteine FABP (fatty acy-binding protein) sono membri della superfamiglia delle proteine che legano i lipidi. Sono state identificate 9 FABP diverse con distribuzione tessuto-specifica: fegato (L-FABP), intestino (IFABP), muscoli e cuore (HFABP), adipociti (AFABP), cervello (BAFABP), mielina (MFABP) e testicolo (TFABP). Il ruolo primario di tutti i membri della famiglia FABP è la regolazione dell'assorbimento degli acidi grassi e il trasporto intracellulare. I geni che codificano per le proteine HFABP e le AFABP sono risultati essere geni candidati per la marezza. In particolare, nel gene che codifica per le HFABP è stata individuata una mutazione nella regione del promotore che causa una migliore marezza nelle razze Duroc e Meishan (Gerbens et al., 1999); nelle stesse razze questa mutazione è responsabile anche di un aumento dell'1% del contenuto di grasso (Gerbens et al., 2000 e 2001).

Il complesso dei fattori di crescita insulino-simili (IGF) svolge, insieme all'insulina, agli ormoni tiroidei, agli steroidi sessuali, e all'ormone della crescita, un ruolo chiave nella regolazione

dell'accrescimento. Il sistema IGF è costituito da due fattori di crescita insulino-simili (IGF1 e IGF2), due recettori, e sei proteine leganti (IGFBP 1-6) (Nedbal et al., 2000). L'effetto dell'ormone della crescita nello sviluppo, nella miogenesi e in alcune vie metaboliche è mediato da IGF1 e IGF2. L'utilizzo del gene IGF2 in uno studio volto ad aumentare l'uniformità di tagli magri nel suino (Sheller et al., 2002) ha dimostrato come verri omozigoti per l'allele favorevole al gene IGF2 siano più snelli e più uniformi rispetto ai soggetti eterozigoti e omozigoti per l'altro allele. Infatti, lo spessore del grasso è stato ridotto di 2,3 mm, mentre le percentuali medie di tagli magri sono aumentate dell'1,98%.

Per finire, esistono altri geni che sono stati indicati come possibili candidati per altri QTL; per esempio il gene per il recettore della prolattina (PRLR), il gene per il recettore degli estrogeni (ESR) e il gene per una proteina di legame con il retinolo (RBP4) sono stati scelti per uno studio di associazione con le dimensioni dei suinetti nati vivi (Drogemuller et al., 2001). Nessuna associazione è stata però identificata.

Come già detto, le conoscenze dei geni che controllano le singole caratteristiche qualitative della carne e degli effetti quantitativi dei singoli geni sulle stesse sono ancora limitate. Le nuove tecnologie molecolari oggi disponibili e che saranno descritte in dettaglio nei successivi capitoli forniscono però nuovi strumenti per analizzare la variabilità dei tratti genetici quantitativi direttamente a livello del DNA, rendendo oggi possibile rilevare i singoli geni che ne influenzano le caratteristiche qualitative (Davoli and Braglia, 2008). Si tratta di un approccio promettente, perché attualmente la genotipizzazione è sempre più facile e meno costosa da eseguire. Nella tabella 13 sono elencati i geni e i marcatori associati alla qualità della carne attualmente disponibili per la selezione nel suino.

Tabella 13: Principali marcatori associati alla qualità della carne nei suini (Rotschild et al., 2007)

Marcatore/gene	Carattere	Prima applicazione	Bibliografia
HAL1843 (RYR1)	SS; QC; produzione, ICA	1991	Fujii et al., 1991
MC4R	ICA; AG;	1998	Kim et al., 2000
RN-/rn+ (PRKAG3)	QC	1997	Ciobanu et al., 2001
GF2	Tagli magri	2002	Van Laere et al., 2003
MQ (several genes)	QC	2001	Knap et al., 2002
CAST	QC	2003	Meyers et al., 2007
RL, DA	LR DA	2003	Plastow et al., 2004

SS: suscettibilità allo stress; QC: qualità della carne; ICA: indice conversione alimentare; AG: accrescimento giornaliero; LR: longevità riproduttiva

Nuove strategie per identificare i geni responsabili di caratteri complessi mediante l'analisi funzionale del genoma

I recenti progressi tecnologici hanno creato nuove opportunità per studiare la complessa materia della qualità della carne nei suini, considerando una visione più olistica del sistema biologico in studio. Invece di concentrarsi solo sulla scoperta di singoli geni o di marcatori del DNA che co-segregano con caratteristiche qualitative della carne, in tempi recenti i ricercatori hanno concentrato le loro ricerche nel cercare di chiarire tratti complessi caratteristici di un processo biologico o di uno specifico fenotipo (Kim et al., 2000). Grazie allo sviluppo di tecnologie *high-throughput*, come ad esempio quella dei DNA microarray che ha permesso una visione simultanea dell'espressione di centinaia o migliaia di geni, è ora possibile aggiungere la genomica funzionale alla gamma di approcci utilizzati per la comprensione delle basi molecolari della qualità della carne suina (Skena et al., 2005; Weis, 2005). I DNA microarray, o DNA chip, consistono in disposizioni miniaturizzate di sonde nucleotidiche ad elevata densità legate ad una matrice solida ed usate per procedure di ibridazione ad elevato parallelismo con acidi nucleici marcati. La tecnica dei microarray è basata sull'ibridazione tra sonde e molecole target a singolo filamento, che ha luogo in virtù del principio di complementarità tra le basi nucleotidiche. Esistono due varianti di DNA chip: microarray a cDNA e microarray oligonucleotidici (Skena et al., 1995). Nel primo caso le sonde vengono prodotte per amplificazione mediante PCR di specifiche sequenze target, lunghe 200-600 pb, oppure provengono da librerie di cloni, e in tal caso ogni frammento può raggiungere la lunghezza di qualche migliaio di nucleotidi, con una dimensione media delle sonde compresa tra 0.6 e 2.4 Kb. Nel formato ad oligonucleotidi le sonde del microarray sono invece costituite da 20-80 residui nucleotidici. Tali molecole vengono poi applicate su superfici solide, come i vetrini da microscopia, a costituire i DNA microarray.

Le piattaforme microarray sono state impiegate sin dalla seconda metà degli anni Novanta, inizialmente per studiare i profili di espressione genica in ambito biomedico (De Risi et al., 1996; Khan et al., 1998; Hughes et al., 2001) e successivamente utilizzate per le specie di interesse zootecnico, in studi riguardanti i bovini (Coussens et al., 2002; Suchyta et al., 2003; Byrne et al., 2005; Tan et al., 2006;) e i suini (Bai et al., 2003; Lin and Hsu, 2005; Tae-Hun et al., 2006; Cagnazzo et al., 2006; Lockhart et al., 1996; de Saizieu et al., 1998; Notterman et al., 2001; El Atifi et al., 2002; Nuwaysir et al., 2002; Chang et al., 2003; Walker et al., 2005).

Generalmente un esperimento di analisi di espressione su piattaforme microarray è composto da diversi passaggi, quali:

- la formulazione del quesito biologico, che consiste nella definizione della tipologia di analisi, dei campioni oggetto dell'indagine e delle informazioni da estrapolare;

- la preparazione della piattaforma microarray, che dipende anche dalla tipologia di sonde che si vogliono impiegare;
- la preparazione e marcatura del materiale genetico da analizzare (target): i campioni consistono in mRNA estratto dalle matrici di interesse e retrotrascritto in cDNA; la marcatura viene effettuata attraverso l'impiego di nucleotidi marcati con opportuni coloranti fluorescenti, solitamente cianina 3 (Cy3) e cianina 5 (Cy5); il saggio può essere costituito da un'ibridazione "one-dye", oppure da un'ibridazione competitiva "two-dye"; in entrambi i casi, si effettua una analisi comparativa, dove i livelli di espressione di un determinato campione sono rapportati a quelli di un altro campione utilizzato come controllo;
- l'ibridazione del/dei target alle sonde sul microarray, che avviene solitamente mediante incubazione overnight;
- la rilevazione dei segnali di ibridazione e l'analisi delle immagini: i segnali fluorescenti di ibridazione vengono rilevati mediante scansione laser del DNA chip attraverso l'impiego di uno scanner connesso ad un microscopio confocale e una CCD (charge coupled device) camera con software di elaborazione dell'immagine, in modo tale da creare un'immagine digitale dell'array ibridato e convertire l'intensità luminosa degli spot in valori numerici sulla base di diversi parametri;
- l'elaborazione dei dati ottenuti con opportuni software: i valori conseguiti sono soggetti a normalizzazione, per eliminare gli errori sistematici e strumentali, e alla filtrazione dei dati ritenuti non significativi ai fini della ricerca in atto; infine viene applicata un'adeguata valutazione statistica, così da poter estrapolare delle inferenze biologiche dai valori numerici in analisi.

L'applicazione di questi nuovi strumenti di analisi genomica ha il vantaggio di generare informazioni in parallelo su più geni e prodotti genici, che a loro volta offrono la possibilità di individuare le possibili interazioni esistenti tra i geni in esame (Andersson et al., 2004; Tuggle et al., 2006; Hocquette, 2007). Lo sviluppo della tecnologia microarray ha permesso di ottenere informazioni nuove e interessanti sugli effetti epistatici dei geni ed ha aiutato a capire che una simultanea analisi funzionale genomica e strutturale è un prerequisito necessario per la spiegazione di processi complessi e interconnessi che interessano la variabilità fenotipica di un carattere quantitativo (Cox, 2005). Tuttavia, l'applicazione della tecnologia microarray presenta alcune limitazioni, la principale delle quali riguarda l'analisi dei risultati degli esperimenti (Lee et al., 2002; Kerr, 2003). Infatti, anche se sono stati stabiliti degli standard di base esistono tuttora alcune difficoltà nell'analisi e nell'interpretazione dei dati. Ad esempio, non esistono norme comuni che regolino il filtraggio dei dati, il che può generare discrepanze che limitano il grado di riproducibilità

degli esperimenti (Yang et al., 2002; Larkin et al., 2005). Come conseguenza di ciò, il confronto dei risultati microarray ottenuti da esperimenti diversi può risultare difficile. La normalizzazione dei dati microarray nelle prime fasi del processo di analisi è un altro passo limitante per la riproducibilità dei risultati. Solo con l'istituzione di protocolli comuni per tutti gli esperimenti, decisa dalla Microarray Gene Expression Data (MGED) Society, è oggi diventata possibile una cross-valutazione dei risultati ottenuti in esperimenti differenti (Bendixen et al., 2005; Larkin et al., 2005; Tuggle et al., 2007). Oltre alle questioni riguardanti la qualità degli esperimenti, l'interpretazione dei dati rimane il principale ostacolo nel campo delle analisi microarray. In particolare, l'integrazione automatica delle informazioni complementari in algoritmi di analisi non è molto ben definito. In parte, ciò è dovuto alla mancanza di una nomenclatura comune fra le diverse specie e alla memorizzazione dei dati in un formato difficile da interpretare.

La sfida attuale per la ricerca genetica riguardante i caratteri legati alla qualità della carne è quella di integrare la genomica strutturale con quella funzionale (Tuggle et al., 2006; Schadt et al., 2005) ed associare i dati ottenuti con i caratteri fenotipici. Questo processo è oggi facilitato dalla rapida evoluzione della bioinformatica, che ha seguito la rapida espansione della ricerca genomica, ed è diventata di cruciale importanza per l'analisi dei dati di espressione, con l'obiettivo finale di estrarre dalla lista dei geni differenzialmente espressi informazioni significative dal punto di vista biologico. Una varietà di strumenti bioinformatici sono oggi disponibili per il data mining, a seconda della domanda biologica a cui si vuol dare risposta (Tuggle et al., 2007; Hanai et al., 2006). Molti esperti hanno indicato che la bioinformatica costituirà anche per la specie suina una dei principali strumenti di analisi nei prossimi anni sia nella ricerca che nell'utilizzo pratico (Schook et al., 2007; Fadiel et al., 2005).

Applicazioni di genomica funzionale per l'identificazione di geni che influenzano la qualità della carne suina

Le tecniche *high-throughput* oggi disponibili rendono possibile scoprire le associazioni tra DNA o RNA e i tratti fisiologici di interesse. La genomica in generale e la trascrittomica in particolare costituiscono un nuovo campo scientifico a metà strada tra la genetica e la fisiologia, in grado di generare nuove ipotesi biologiche che possono poi essere ulteriormente studiate da un approccio più focalizzato (Andersson et al., 2004). Questo ha un impatto soprattutto sulla caratterizzazione dei tratti complessi, che sono disciplinati dalle interazioni fra geni con effetti di piccole dimensioni. Purtroppo, i dati di trascrittomica riguardanti studi nel suino sono piuttosto frammentari e scarsi. Inoltre, negli studi di espressione genica mediante DNA microarray sono state utilizzate piattaforme differenti, quali la piattaforma Qiagen-Operon contenente 13K sonde oligonucleotidiche, il

GeneChip suino da 20k e il GeneChip Affymetrix da 23K (Tuggle et al., 2007). Lo studio dei profili di espressione genica suina è stato utilizzato fino ad oggi per capire meglio i cambiamenti che avvengono durante la crescita muscolare e lo sviluppo (Zhao et al., 2005; Te Pas et al., 2005). L'identificazione di geni differenzialmente espressi per questi caratteri può essere di grande importanza anche per gli studi genetici e fisiologici legati alla qualità della carne. Il primo obiettivo quando si studia l'espressione genica nel muscolo è quello di ottenere una migliore comprensione delle caratteristiche biochimiche del tessuto che influenzano la qualità della carne.

Altri lavori pubblicati riguardano studi di espressione genica nei tessuti embrionali e riproduttivi (Zhao et al., 2003; Agca et al., 2006), nel cervello (Nobis et al., 2003), nel fegato e nel tessuto adiposo (Hausman et al., 2006). Esiste infine uno studio completo in cui viene effettuata l'identificazione di SNP all'interno di geni candidati, l'analisi di espressione mediante microarray e l'analisi di associazione per mappare fisicamente i geni che influenzano alcune caratteristiche della carcassa (Ponsuksili et al., 2005). L'approccio della genomica funzionale ha permesso quindi di indagare i cambiamenti globali dell'espressione genica nel muscolo e di associarli alle caratteristiche fenotipiche, generando nuovi geni candidati da testare per la selezione assistita da marcatori.

SNP discovery: approcci molecolari tradizionali per la rilevazione di mutazioni puntiformi nel suino

Gli SNP sono i marcatori più diffusi nel genoma animale (uno ogni 500-1000 nucleotidi); considerando che un genoma di mammifero è composto in media da circa 3 miliardi di nucleotidi, il numero di SNP presenti in ciascuna specie è di qualche milione. Questi marcatori, oltre ad essere i più frequenti nel genoma, sono biallelici e molto più stabili rispetto ai microsatelliti.

Le principali metodiche per l'identificazione di variazioni a singolo nucleotide (SNP discovery) all'interno del genoma suino sono:

- **Sequenziamento diretto delle regioni di interesse.** Ad esempio, Fahrenkrug et al., nel 2002, hanno sequenziato 403 EST suine identificando 1.650 SNP. Su larga scala però tale approccio è molto costoso e richiede il disegno di primer specifici per ogni SNP. È inoltre limitato a regioni di cui è nota la sequenza e, quando si presentano doppi picchi, come atteso negli eterozigoti, non è sempre facile discernere tra artefatti dovuti al sequenziamento e polimorfismi reali.
- **PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism):** questa tecnica permette di discriminare i diversi frammenti amplificati a singola elica di DNA in base alla diversa mobilità elettroforetica, che è conseguenza di una diversa conformazione che essi assumono,

determinata, a sua volta, da una diversa sequenza nucleotidica. Ad esempio, nel 2005, Goffauw e colleghi utilizzarono questa tecnica per identificare 40 nuovi SNP in una popolazione di 96 suini ibridi.

- **Ricerca *in silico*:** permette di individuare SNP attraverso l'allineamento e la comparazione di sequenze presenti in banca dati. Ad esempio, nel 2009, Fontanesi e colleghi hanno identificato SNP associati al deposito di grasso partendo dall'analisi *in silico* di geni noti per l'influenza dello spessore del grasso nel suino e nell'uomo, confermando poi i dati trovati mediante il sequenziamento dei marcatori SNP suini più interessanti.

SNP discovery: tecnologie di sequenziamento massivo dei genomi

Uno dei limiti principali nell'analisi dei caratteri economicamente importanti per le specie zootecniche è stata per lungo tempo la mancanza di un numero sufficiente di marcatori molecolari per lo sviluppo di saggi ad elevata densità e produttività per studi di associazione. La regolazione genetica dei tratti quantitativi è complessa e l'identificazione di geni alla base della variazione genetica richiede grandi quantità di marcatori genetici. La necessità di più marcatori è fondata anche sull'entità del Linkage Disequilibrium (LD) nel genoma suino. Si è previsto che sarà necessaria una frequenza di 5 – 10 marcatori per centimorgan (cM) per effettuare studi di associazione su tutto il genoma suino. Fino a poco tempo fa, l'identificazione massiva di tali marcatori era un obiettivo molto impegnativo e costoso da raggiungere. L'avvento delle nuove tecnologie di sequenziamento massivo ha recentemente reso fattibile la scoperta di SNP in tutte le specie, grazie alla capacità di queste tecnologie di generare grandi quantità di dati di sequenza in modo efficiente, sia in termini di tempo che di costo: solitamente queste tecnologie vengono definite di “Next Generation Sequencing” (figura 18). Queste tecniche sono state utilizzate con successo per sequenziare interi genomi e per l'identificazione di nuovi SNP mediante l'assemblaggio in contig delle sequenze generate. Ovviamente è necessario sequenziare molti soggetti di una stessa specie o razza con un'elevata ridondanza di sequenza per identificare con sicurezza i siti segreganti.

Tra le tecnologie oggi utilizzabili per il sequenziamento massivo ci sono il sistema Roche 454 FLX, il sistema Genome Analyzer (o Solexa) della ditta Illumina e l'approccio “SOLiD” della ditta Applied Biosystem (ora Life Technologies).

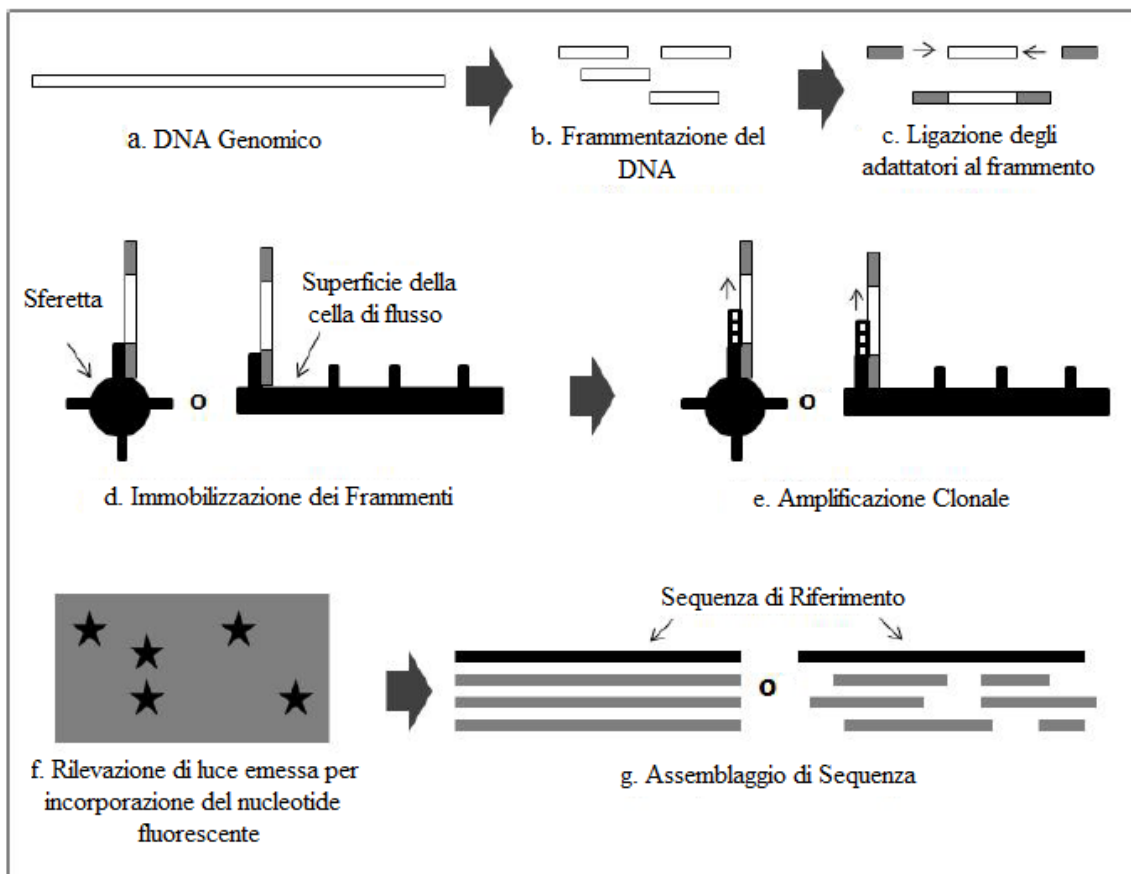
Il metodo Roche 454 FLX consiste in un sistema di pirosequenziamento massivo in parallelo capace di sequenziare circa 400-600 Megabasi di DNA in 10 ore di corsa. Tale approccio è stato utilizzato nel suino dai gruppi di ricerca di Wiedmann e Ramos per l'identificazione ad alta

processività di SNP nell'intero genoma (Wiedmann et al., 2008; Ramos et al., 2009); utilizzando questi SNP è stata poi realizzata la dissezione genetica di tratti fenotipici oggetto di selezione, quale ad esempio il sistema melanocortico, alla base del metabolismo energetico e della colorazione del mantello nel suino (Hwang et al., 2009).

La procedura SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) produce 60 Gigabasi di dati nucleotidici per ogni corsa e permette di generare miliardi di sequenze lunghe 50 pb. Questa tecnologia è stata impiegata in genomica animale solo per la specie avicola, in uno studio dei polimorfismi coinvolti nel determinismo delle migliori varianti fenotipiche produttive selezionate durante il processo di domesticazione (Rubin et al., 2010).

L'Illumina Genome Analyzer, o Solexa, è una piattaforma avanzata che si basa sul processamento massivo di milioni di frammenti in parallelo ed è in grado di generare un totale di 20 Gigabasi di dati per corsa. Questa piattaforma è stata utilizzata per progetti di sequenziamento di interi genomi animali, tra cui quello suino (Archibald et al., 2010). Questa tecnologia, insieme alla metodica di pirosequenziamento Roche, è stata inoltre sfruttata per l'identificazione dei 64.232 SNP suini con cui è stato recentemente messo a punto il *PorcineSNP60 BeadChip* (Ramos et al., 2008; Ramos et al., 2009) per la simultanea genotipizzazione di più di 60.000 SNP.

Figura 18: Schema di funzionamento delle Tecnologie Next Generation Sequencing



La possibilità di identificare una vasta mole di marcatori genetici, in particolare SNP e piccole “InDel” (inserzioni/delezioni) grazie all’impiego di questi sequenziatori di ultima generazione, permetterà di raggiungere una conoscenza sempre più approfondita dei genomi animali e di sfruttare tali conoscenze per compiere una dissezione sempre più accurata dei caratteri ad ereditarietà complessa.

Metodi di genotipizzazione a bassa e media densità nel suino

Le principali metodiche di genotipizzazione a bassa e media densità, utilizzate anche nella specie suina, sono qui di seguito descritte.

PCR-RFLP. Questa metodica permette di evidenziare SNP localizzati internamente ad un sito di restrizione. Il diverso pattern di restrizione può essere visualizzato su gel d’agarosio previa digestione con specifici enzimi di restrizione. Nel suino questa metodica è stata utilizzata da numerosi ricercatori per genotipizzare in modo rapido ed economico polimorfismi legati alla qualità della carne. Ad esempio, Liu e colleghi (2003) la utilizzarono per trovare due polimorfismi nel gene IGF2 legati allo spessore del grasso nella carne; Zao et al., (2010), hanno invece recentemente utilizzato la PCR-RFLP per confermare la presenza di polimorfismi associati al grasso intramuscolare nel gene HFABP.

PCR-SSCP. Questa metodica permette di discriminare i diversi frammenti amplificati a singola elica di DNA in base alla diversa mobilità elettroforetica, che è conseguenza di una diversa conformazione che essi assumono, determinata, a sua volta, da una diversa sequenza nucleotidica. Anche in questo caso si tratta di una metodica a basso costo e di facile attuazione. Ad esempio, Fernandèz et al.(2004) hanno utilizzato questa metodica per genotipizzare, in animali appartenenti alle razze Duroc ed Iberica, un nuovo SNP identificato nel gene MC1R.

Saggi Real Time TaqMan. Si tratta di reazioni Real-Time che utilizzano una sonda nucleotidica al cui 5' è legata una molecola reporter che emette fluorescenza e al 3' una molecola quencher che l'assorbe; l'amplificazione sonda-specifica causa la rottura di questa e la conseguente emissione della fluorescenza. L'interpretazione dei risultati è automatizzata. Questa metodica è stata utilizzata nel suino da Van Laere e colleghi (2003) per genotipizzare un polimorfismo nel gene IGF2 in animali appartenenti ad incroci fra le razze Pietrain e Large White, cinghiale e Large White, Meishan e Large White, Hampshire e Landrace.

Metodo KASPar. È un metodo di sequenziamento degli SNP basato sull’utilizzo di PCR allele-specifiche (Nijman et al., 2008). Rispetto ai metodi tradizionali di sequenziamento, il metodo KASPar è in grado di ridurre notevolmente il numero di aspecifici ottenuti dalla variazione di un

singolo nucleotide fornendo dati precisi ed affidabili. Nel 2010 questa metodica è stata utilizzata da Duijvesteijn e colleghi per la genotipizzazione di SNP in quattro diverse razze suine.

Genotyping microarray. I microarray rappresentano un sistema di analisi in parallelo, che velocizza considerevolmente l'esplorazione genomica. La tecnologia microarray permette di esaminare contemporaneamente un ampio numero di polimorfismi genetici a costi relativamente contenuti, se rapportati al numero di SNP analizzabili per esperimento. Come descritto in un capitolo precedente, un microarray è composto da un grande numero di brevi sequenze di DNA a singola elica, chiamate sonde, disposte su un supporto solido, generalmente un semplice vetrino da microscopia, a formare una matrice ordinata, in modo che la localizzazione di ciascuna sonda sull'array sia precisamente identificata. Questa tecnologia sfrutta la capacità del DNA di denaturarsi e riapparsi in modo specifico (ibridarsi) ad una sequenza nucleotidica complementare (che può essere un tratto di DNA precedentemente amplificato) per formare nuovamente la doppia elica. In alcuni casi l'ibridazione può essere associata a reazioni enzimatiche che possono avvenire sul vetrino, oppure in una fase liquida preliminare. Il materiale genetico sotto esame o i prodotti della reazione enzimatica devono essere opportunamente marcati con molecole fluorescenti in maniera tale che possano essere riconosciuti i frammenti che si sono ibridati alle sonde del microarray.

Un esempio di utilizzo della tecnologia microarray nel suino in saggi di genotipizzazione a media densità è il microarray oligonucleotidico denominato SNIPOK (Kamiński et al., 2008), consistente in un pannello di 90 SNP selezionati tra quelli direttamente o potenzialmente associati alle caratteristiche produttive delle carni. Grazie a questo strumento è possibile la genotipizzazione simultanea di circa un centinaio di SNP per studiare le interazioni tra i geni e conseguire una migliore comprensione del retroscena genetico alla base della resa e della qualità delle carni suine. Esso può essere impiegato anche per studi evolutivi, per la valutazione delle distanze genetiche tra razze selvatiche e domestiche, per realizzare test di tracciabilità e costituisce un punto di partenza per le analisi di paternità.

Attualmente esistono piattaforme microarray commerciali, come quella chiamata Golden Gate fornita dalla ditta Illumina, che permettono di effettuare saggi di *custom genotyping* a media densità per identificare, in un solo esperimento, da 96 a 1.536 SNP. Ad esempio, nel 2009 Hindrik e colleghi hanno utilizzato il sistema Golden Gate per genotipizzare 163 SNP in diverse razze suine.

Metodi di genotipizzazione ad alta/altissima densità nelle specie di interesse zootecnico

Le metodiche di sequenziamento massivo oggi disponibili (Howard et al., 2009) hanno permesso di produrre in breve tempo un'enorme mole di dati. Attualmente il numero totale di SNP identificati e

depositati presso dbSNP, l'apposita banca dati istituita dall'NCBI, consiste in oltre 200 milioni, distribuiti tra più di 90 specie di organismi animali e vegetali. Soltanto la specie suina presenta oltre 544.000 mutazioni puntiformi sottomesse fino ad ora, di cui ben più di 376.000 depositate con l'ultima versione del settembre 2010 (NCBI dbSNP Sus Scrofa, release 128, September 2010, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Inoltre, l'avanzamento tecnologico rende oggi disponibili anche strumenti in grado di tipizzare in modo estremamente economico e rapido centinaia di migliaia di SNP in uno stesso animale. Ad oggi sono disponibili diverse tecnologie capaci di analizzare un numero superiore a 100.000 SNP. Affymetrix e Illumina offrono i sistemi più densi, con la possibilità di testare rispettivamente fino a 1,8 e 1,2 milioni di SNP. I diversi protocolli disponibili sono basati generalmente sulla frammentazione del DNA e sulla successiva amplificazione mediante primer degenerati, ovvero primer contenenti sequenze aspecifiche, in grado di legarsi in punti casuali del genoma e di amplificarne regioni di dimensioni variabili fra i 200 e 2.000 nucleotidi. In particolare, la tecnologia sviluppata da Illumina permette l'analisi di migliaia di SNP senza la necessità della PCR, ossia dell'amplificazione preliminare delle regioni del DNA dove risiedono gli SNP. L'*Illumina iSelect BeadChip* costituiscono quindi il modo più funzionale per genotipizzare grandi quantità di SNP e realizzare saggi ad alta densità che includano decine di migliaia di mutazioni puntiformi distribuite lungo tutto il genoma. Questi "chip" di SNP rappresentano una risorsa utile per studi genetici in ambito zootecnico, tra i quali la selezione genomica, la rilevazione di QTL o studi di diversità (<http://www.illumina.com/applications.ilmn>). In particolare, queste piattaforme di genotipizzazione ad alta processività sono impiegate per la tipizzazione di gruppi di migliaia di individui appartenenti a razze differenti per l'identificazione e la localizzazione precisa (fine-mapping) dei QTL. Ad esempio, il pannello commercializzato da Illumina da oltre 50.000 SNP oggi disponibile per la specie bovina, riconosce due alleli presenti nel genoma ogni 60.000 paia di basi circa e, in termini medi, consente una prima lettura, anche se certamente imperfetta, del genotipo individuale praticamente ad ogni gene. Gli SNP tipizzati non pretendono di essere le mutazioni causative di differenze fenotipiche; essi sono per la maggior parte mutazioni anonime, ma la breve distanza che li separa dà buone garanzie che siano in stretto Linkage Disequilibrium con possibili mutazioni causative presenti nelle vicinanze. Di fatto nella specie bovina è oggi pertanto possibile tipizzare ad un costo contenuto oltre 50.000 SNP in un gruppo di animali provvisti di fenotipo o di un EBV accuratamente misurato, elaborare i risultati, selezionando gli SNP che mostrano un effetto diverso da zero per quel fenotipo o quell'EBV, e stimare infine per ogni SNP un effetto associato ai tre genotipi osservabili. Una volta in possesso di queste stime degli SNP che contano, è possibile assegnare un Breeding Value Genomico (GEBV) ad animali di cui ignoriamo fenotipo o EBV. Sarà

sufficiente sommare gli effetti presenti in un certo animale che sia stato sottoposto a genotipizzazione con lo stesso chip da 50.000 SNP. Questa nuova procedura di selezione, che permette una valutazione del singolo animale fondata unicamente su una base molecolare, prende il nome di Genomic Selection (Meuwissen et al., 2001; Goddard and Hayes, 2007). In questo modo quindi è possibile ricostruire il Breeding Value sommando gli effetti misurati ad ogni regione genomica, secondo una logica che in realtà non è molto diversa da quella del modello infinitesimale (Meuwissen, 2009). Se col modello infinitesimale si stimava la somma a partire dal fenotipo, ora la si stima a partire dai singoli addendi, stimando l'effetto degli SNP in modo accurato e quindi su molti animali. Per fare questo è necessario tipizzarne almeno qualche migliaio con fenotipo o un accurato EBV.

Quando una mutazione favorevole avviene all'interno di una popolazione soggetta a selezione artificiale è molto probabile che la frequenza dell'allele favorevole aumenti con il procedere delle generazioni. Siccome il DNA è una molecola lineare e la probabilità di ricombinazione tra punti differenti è inversamente proporzionale alla loro distanza, anche la frequenza dei nucleotidi immediatamente adiacenti alla mutazione favorevole tenderà ad aumentare. Questo fenomeno è noto come *Selective Sweep*, che significa letteralmente “trascinamento genetico” (Maynard, Smith and Haigh, 1974; Barton, 2000; Fai e Wu, 2000). In genetica di popolazione, una sostituzione nucleotidica che esercita un effetto diretto e positivo sul fenotipo di un individuo ne migliora la fitness riproduttiva, aumenta quindi la probabilità di trasmettere la variante genica alla progenie. Questo evento è definito selezione positiva. A seconda della dimensione della popolazione in cui è sorto, l'allele favorevole si diffonde con una velocità più o meno elevata e la sua frequenza raggiunge valori estremamente elevati, fino alla fissazione. Ciò determina una riduzione di variabilità non solo presso il locus genico selezionato ma anche nei loci neutri fisicamente associati ad esso, i cui alleli vanno ugualmente incontro a selezione e ad un aumento delle frequenze. Se la regione del genoma in cui è ricaduta la mutazione presenta un ridotto grado di ricombinazione, allora l'area in linkage risulta più estesa ed il fenomeno di *hitchhiking* perdura per molte generazioni ed agisce in modo completo nel rimuovere la variabilità tra le varianti alleliche nei siti neutri, con una maggiore probabilità di fissazione anche per gli alleli in queste posizioni. Questo ha una notevole influenza sul background genetico delle popolazioni, cosicché particolari gruppi etnici che presentano tratti fenotipici caratteristici possiedono varianti alleliche fissate non soltanto presso i loci responsabili per il carattere ma anche nelle posizioni nucleotidiche circostanti. Se queste risultano essere differenziate rispetto a quelle presenti nelle altre popolazioni di riferimento per la specie costituiscono delle vere e proprie *Signatures of Selection* o “firme di selezione”. Esse sono perlopiù caratterizzate da distribuzioni di nucleotidi attorno alle mutazioni favorevoli che

differiscono statisticamente da ciò che è atteso per effetto del caso (Kim and Stephan, 2002). La rilevazione delle firme genetiche può incrementare la comprensione dell'evoluzione e della biologia che sono a fondamento di un determinato fenotipo, soprattutto per caratteri ad ereditarietà complessa, e fornire un ulteriore strumento per migliorare l'efficienza di selezione. Molti sono i metodi statistici sviluppati per la rilevazione di "firme genetiche", perlopiù basati sulla comparazione della distribuzione di frequenze alleliche in genotipi costituiti da gruppi di SNP, onde determinare varianti che ricorrono con cadenza particolarmente elevata. Tra di essi figurano il calcolo di parametri statistici di popolazione, che sono funzione delle frequenze alleliche o genotipiche, quali l'indice statistico F_{ST} (Weir et al., 2006; The Bovine Hap Map Consortium et al., 2009), il Linkage Disequilibrium (Parsch et al., 2001; Przeworski, 2002; Kim and Niesen, 2004; Ennis, 2007) ed il composite log likelihood (CLL), (Stella et al., 2010). Una ulteriore possibilità di utilizzo dei *BeadChip* consiste quindi nella ricerca di *Signatures of Selection*, cioè di quelle regioni genomiche in cui sono particolarmente significative le differenze genetiche tra popolazioni. Queste possono essere utilizzate per caratterizzare la struttura genetica di una razza per un determinato carattere, rendendola distinguibile da tutte le altre della stessa specie.

Una recente applicazione del chip bovino da 50K SNP è stata proprio la ricerca di *Signatures of Selection* in tre razze francesi da latte, la Holstein, la Normande e la Montbéliard, svolta dal gruppo di Flori e collaboratori (2009). In queste razze è stata effettuata una scansione del genoma, attraverso l'indagine di 42.846 SNP, per l'identificazione delle principali regioni influenzate dalla forte selezione artificiale degli ultimi 50 anni. L'indagine ha permesso di identificare 13 regioni altamente significative, alcune delle quali contenenti geni con mutazioni aventi un forte effetto sui tratti di produzione del latte (GHR) e della colorazione (MC1R). Per una migliore interpretazione delle "firme di selezione" osservate è stata realizzata l'annotazione dei geni differenziati in accordo ai valori dell'indice F_{ST} di SNP localizzati al loro interno o in stretta prossimità (Flori et al., 2009). Un lavoro simile è stato svolto anche da Qanbari e collaboratori su capi di razza Holstein, presso i quali sono state rilevate firme di recente selezione presso sette loci candidati e QTL coinvolti nel determinismo di resa e composizione del latte ma anche di tratti riproduttivi e comportamentali (Qanbari et al., 2010).

Un altro esempio di ricerca di *Signatures of Selection* riguarda la specie ovina dove, mediante l'utilizzo dell'*OvineSNP50 BeadChip* Illumina che contiene più di 50.000 SNP, è stato possibile identificare "firme di selezione" in razze ovine che presentavano differenti masse muscolari e presenza/assenza di corna in corrispondenza dei loci Myostatin ed Horn sui cromosomi 8 e 10 (Kijas et al., 2010). Inoltre, questo strumento è stato utilizzato recentemente in uno studio volto a chiarire le relazioni esistenti tra la popolazione ovina di razza Sarda e la popolazione Sarda

denominata “Pecora nera di Arbus” (Piras et al., 2009), conservatasi in alcune aree marginali della Sardegna senza subire la pressione selettiva della restante parte della popolazione Sarda e conservando dunque alcune caratteristiche peculiari, quali il vello nero, la presenza di corna e il padiglione auricolare ridotto o assente. Tale confronto è consistito nell’analisi della differenza media delle frequenze alleliche di gruppi di 11 SNP adiacenti.

La disponibilità di strumenti per il sequenziamento massivo dei genomi ha permesso di mettere a punto una procedura di rilevazione di nuovi polimorfismi anche per la specie suina (Ramos et al., 2009). I campioni di DNA utilizzati per il sequenziamento sono stati prelevati da soggetti appartenenti a cinque razze, ossia Duroc (DC), Pietrain (PI), Landrace (LD), Large White (LW) e cinghiale selvatico (WB, Wild Boar), costruendo un pool genico per ognuna di esse che fosse rappresentativo della distribuzione mondiale delle razze. L’insieme finale degli SNP comprendeva tutti quelli identificati che hanno passato tutti i filtri, sottoposti ad opportuna convalida e sottomessi in banca dati dbSNP. Oltre a questi, il gruppo finale di SNP porcini comprende anche SNP identificati in precedenza e già disponibili presso fonti pubbliche. Su 549.282 SNP ottenuti è stata quindi effettuata una selezione informatica che ha permesso di prendere in considerazione 64.232 marcatori, utilizzati per l’allestimento del pannello oligonucleotidico ora commercialmente disponibile con il nome di *PorcineSNP60 BeadChip*. Del numero totale di polimorfismi selezionati, 45.510 sono stati mappati in loci cromosomici specifici della versione numero sette del genoma di *Sus Scrofa* (Chen et al., 2007), mentre 18.722 non sono stati mappati, anche se per ben 4.193 tra questi ultimi è stata predetta la locazione tramite mappaggio comparativo sul genoma umano. Eccetto che per il cromosoma X, la distanza media tra gli SNP è compresa tra i 30 e le 40 Kb, anche se sono presenti gap maggiori, fino a 250 Kb ed oltre.

Tenendo conto del fatto che le razze impiegate per la scoperta di questi SNP includono quelle maggiormente utilizzate nella produzione suinicola mondiale, risulta evidente che il *BeadChip* suino è altamente funzionale per studi sulla selezione genomica e sulla tracciabilità suina.

Prospettive per la selezione nella specie suina

I programmi di selezione in corso, come discusso precedentemente, hanno raggiunto notevoli risultati. Tuttavia rimangono alcuni problemi irrisolti, come già in parte accennato, fra i quali si possono richiamare l’antagonismo quantità e qualità della carne e il miglioramento dei caratteri a bassa ereditabilità o di difficile o costosa rilevazione come ad esempio i caratteri riproduttivi e quelli di resistenza alle malattie.

L'applicazione dei nuovi strumenti di genomica oggi disponibili e l'integrazione delle informazioni che derivano dallo studio del genoma suino con i sistemi di selezione tradizionali potranno portare ad alcune innovazioni nel settore con vantaggi sul piano dell'efficienza della selezione

MATERIALI E METODI

RICERCA E VALIDAZIONE DI SNP IN GENI CANDIDATI PER LA QUALITÀ DELLA CARNE SUINA

Campionamento

Raccolta dei fenotipi e del materiale biologico

La popolazione utilizzata per il presente lavoro di tesi è costituita da 231 suini come riportato in tabella 14. Sono soggetti di genealogia nota ottenuti da un incrocio Landrace x Large White, allevati nelle stesse condizioni e macellati nella stessa struttura, alla stessa età e allo stesso peso presso il macello Levoni (Marcaria, MN).

Tabella 14: Elenco dei soggetti della popolazione campionata. A colore uguale corrispondono fratelli pieni.

ID	Madre	Padre	ID	Madre	Padre	ID	Madre	Padre	ID	Madre	Padre
6	123T	B1	64	B423	B1	11	B79	B1	58	0B36	B2
26	123T	B1	72	B423	B1	27	B79	B1	85	0B36	B2
40	123T	B1	24	B606	B1	28	B79	B1	1	0B49	B2
52	123T	B1	35	B606	B1	41	B79	B1	5	0B49	B2
17	250T	B1	55	B606	B1	50	B79	B1	51	0B49	B2
21	250T	B1	57	B606	B1	54	B79	B1	54	0B49	B2
25	250T	B1	21	B659	B1	78	B79	B1	56	0B49	B2
34	250T	B1	30	B659	B1	4	B870	B1	58	0B49	B2
38	250T	B1	9	B660	B1	34	B870	B1	26	227T	B2
39	250T	B1	20	B660	B1	4	P2933	B1	31	227T	B2
40	250T	B1	25	B660	B1	6	P2933	B1	43	227T	B2
42	250T	B1	35	B660	B1	11	P2933	B1	43	227T	B2
86	250T	B1	53	B660	B1	12	P2933	B1	48	227T	B2
18	354T	B1	10	B661	B1	43	P2933	B1	51	227T	B2
22	354T	B1	15	B661	B1	55	P2933	B1	76	227T	B2
44	354T	B1	66	B661	B1	59	P2933	B1	4	84T	B2
46	354T	B1	67	B661	B1	3	T278	B1	13	84T	B2
27	B107	B1	3	B670	B1	14	T278	B1	20	84T	B2
36	B107	B1	16	B670	B1	17	T278	B1	62	84T	B2
41	B107	B1	33	B670	B1	48	T278	B1	75	84T	B2
54	B107	B1	52	B670	B1	50	T278	B1	6	B24	B2
87	B107	B1	18	B672	B1	60	T278	B1	7	B24	B2
45	B12	B1	22	B672	B1	12	0B28	B2	14	B24	B2
2	B123	B1	24	B672	B1	74	0B28	B2	23	B24	B2
32	B123	B1	41	B672	B1	4	0B36	B2	37	B24	B2
49	B123	B1	50	B672	B1	24	0B36	B2	57	B24	B2
7	B269	B1	61	B672	B1	26	0B36	B2	59	B24	B2
12	B269	B1	2	B70	B1	31	0B36	B2	69	B24	B2
59	B269	B1	13	B70	B1	38	0B36	B2	16	B485	B2
28	B423	B1	29	B70	B1	39	0B36	B2	19	B485	B2
34	B423	B1	42	B70	B1	45	0B36	B2	20	B485	B2
55	B423	B1	43	B70	B1	47	0B36	B2	71	B485	B2

ID	Madre	Padre
5	B662	B2
15	B662	B2
14	B664	B2
41	B664	B2
52	B664	B2
15	B76	B2
32	B76	B2
46	B76	B2
60	B76	B2
21	0B28	B3
25	0B28	B4
29	0B28	B5
18	.	BMW
22	.	BMW
23	.	BMW
29	.	BMW
36	.	BMW
37	.	BMW
47	.	BMW
48	.	BMW
49	.	BMW
3	B124	BMW
17	B124	BMW
19	B124	BMW
39	B124	BMW
28	B647	BMW
39	B647	BMW
46	B647	BMW
50	B647	BMW
30	B668	JERRY
34	B668	JERRY
60	B668	JERRY
62	B668	JERRY
6	B303	RAS
10	B303	RAS

ID	Madre	Padre
23	B303	RAS
32	B303	RAS
42	B303	RAS
45	B303	RAS
57	B303	RAS
63	B303	RAS
7	B69	RAS
11	B69	RAS
16	B69	RAS
17	B69	RAS
25	B69	RAS
38	B69	RAS
44	B69	RAS
49	B69	RAS
5	B692	RAS
16	B692	RAS
27	B692	RAS
30	B692	RAS
52	B692	RAS
56	B692	RAS
8	P2879	RAS
9	P2879	RAS
13	P2879	RAS
44	P2879	RAS
46	P2879	RAS
62	P2879	RAS
1	280T	TEO
32	280T	TEO
3	B292	TEO
37	B292	TEO
40	B292	TEO
44	B292	TEO
88	B292	TEO
2	B621	TEO
5	B621	TEO

ID	Madre	Padre
8	B621	TEO
53	B621	TEO
55	B621	TEO
2	B83	TEO
15	B83	TEO
49	B83	TEO
10	272T	ZAC
12	272T	ZAC
20	272T	ZAC
24	272T	ZAC
47	272T	ZAC
62	272T	ZAC
7	B446	ZAC
9	B446	ZAC
19	B446	ZAC
28	B446	ZAC
47	B446	ZAC
48	B446	ZAC
51	B446	ZAC
11	B665	ZAC
19	B665	ZAC
33	B665	ZAC
53	B665	ZAC
56	B665	ZAC
61	B665	ZAC
61	B665	ZAC
8	B686	ZAC
27	B686	ZAC
31	B686	ZAC
35	B686	ZAC
40	B686	ZAC
58	B686	ZAC
64	B686	ZAC

Alla macellazione e alla rifilatura delle cosce si sono raccolti i seguenti dati fenotipici:

- spessore del lardo dorsale (misurato in mm),
- peso della coscia rifilata (misurato in kg),
- compattezza delle masse muscolari (assegnato un punteggio da 1, ottimale a 5, insufficiente),
- difformità di colorazione (assegnato un punteggio 1-5),
- marezatura (assegnato un punteggio 1-5),

- rete venosa (assegnato un punteggio 1-5),
- copertura del grasso in corona (assegnato un punteggio 1-5),
- spessore lardo sottonoce (misurato in mm).

Come riportato sopra, alcuni fenotipi sono stati analizzati attraverso dei giudizi espressi sulla base di valutazioni specifiche operate attraverso la seguente scala di punteggi lineari da 1 a 5: 1 (ottimale), 2 (buono), 3 (medio), 4 (scarso), 5 (insufficiente), in maniera tale da poter essere utilizzati nelle successive fasi di elaborazione statistica dei fenotipi. Ogni coscia ha così ricevuto una serie di punteggi atti a stabilirne il giusto inserimento nel processo produttivo. Lo spessore del lardo dorsale è invece stato misurato in millimetri, mentre il peso della coscia rifulata è espresso in kg.

È stata poi effettuata una valutazione finale mediante l'assegnazione di un punteggio da 1 (ottimo) a 6 (insufficiente).

Da ognuno dei 231 suini, al momento della macellazione, sono stati raccolti campioni di tessuto muscolare. Questi tessuti sono stati prelevati durante il passaggio in catena da un operatore del macello. I tessuti sono stati quindi immediatamente sminuzzati con l'ausilio di attrezzi chirurgici quali forbici, pinzette e bisturi, in modo da ridurre il loro spessore a non più di 0,5 cm e posti in provette da 50 mL contenenti RNA later (Ambion). Quest'ultimo è un reagente di conservazione che contiene guanidina tiocianato, un potente inibitore di RNasi, che permette di proteggere l'integrità dell'RNA dei tessuti per diversi anni a -20°C. Lo sminuzzamento in piccole parti è necessario affinché il reagente penetri nei tessuti e agisca a livello di cellula muscolare. Questa operazione è stata eseguita nel minor tempo possibile, al fine di limitare la degradazione dell'acido nucleico, tenendo in considerazione che dal momento della morte sino al prelievo del campione, trascorrono circa 35 minuti. I campioni sono stati stoccati alla temperatura di -20°C in attesa della successiva analisi

Scelta dei caratteri fenotipici e degli animali per le successive sperimentazioni

Sulle otto valutazioni fenotipiche sopra elencate (si esclude la valutazione finale) è stata effettuata un'analisi delle componenti principali, la quale consiste in una procedura matematica che trasforma un certo numero di variabili correlate nel più piccolo numero di variabili non correlate denominate componenti principali. La prima componente principale la quota maggiore della variabilità dei dati e ogni componente successiva rappresenta quote via via minori della variabilità restante (Boersma e Weenink D., 2000).

Questo strumento statistico può essere utilizzato per ridurre il numero di variabili correlate tra loro; un test di analisi multivariata può cominciare con un sostanziale numero di queste variabili: il suo compito è quello di ridurre un ampio insieme di informazioni in uno più piccolo che però ne

contenga ancora la maggior parte. Il ristretto gruppo di variabili che si ottengono, chiamati fattori principali, è molto più agevole da analizzare e interpretare.

Al termine dell'analisi abbiamo scelto quindi di studiare individui estremi nella distribuzione di tre caratteri:

- la prima componente principale,
- lo spessore del lardo,
- la compattezza delle masse muscolari.

Si è così analizzata la distribuzione degli animali in archivio rispetto ai tre caratteri selezionati.

Per ogni carattere considerato sono stati selezionati inizialmente sei individui appartenenti alla coda positiva e sei appartenenti a quella negativa, da utilizzare per la ricerca di variabilità per l'identificazione di polimorfismi informativi per la qualità della carne. A causa delle forti correlazioni che legano questi caratteri, anziché $6 \times 2 \times 3 = 36$ animali da analizzare, ne sono stati esaminati 22, otto per la coda positiva e quattordici per la coda negativa delle distribuzioni per i tre caratteri, in quanto alcuni animali sono estremi per più di un carattere.

Preparazione degli acidi nucleici per le analisi

Estrazione dell'RNA

Quando è iniziato il presente studio, le informazioni disponibili sul genoma suino erano spesso frammentarie. In particolare, le informazioni in banca dati per quel che riguarda le sequenze dei geni candidati si limitavano al solo RNA messaggero. Così, dai 22 animali appartenenti alle due code estreme per i tre caratteri considerati è stato estratto in un primo momento l'RNA. A questo scopo, per ogni animale considerato, sono stati pesati 200 mg di tessuto muscolare senza tendini e grasso e sono stati aggiunti 5 mL di Trizol (Invitrogen, Milano, Italia) nelle proporzioni di circa 1 mL per ogni 50 mg di tessuto. Si è lasciato il tutto in ghiaccio per 5 minuti usando i tubi con fondo conico da 13mL, al fine di garantire una corretta omogeneizzazione. Si è poi aliquotato 1 mL di soluzione in 5 diverse provette da 50 mL (Eppendorf, Milano, Italia) e si è centrifugato a 4°C per 15 minuti a 1400 rpm. Si è poi prelevato il surnatante, contenente l'RNA e le proteine, e si è incubato a temperatura ambiente per 5 minuti. Sono stati aggiunti 0,2 mL di cloroformio per ogni mL di Trizol e si è vortexato per 15 secondi. Dopo aver lasciato il tutto a temperatura ambiente per 10 minuti circa, si è centrifugato di nuovo a 4°C per 15 minuti a 1400 rpm. Si è così ottenuta una soluzione costituita da tre fasi. Di queste, è stata prelevata la fase superiore che appariva incolore. Sono stati aggiunti 0,5 mL di isopropanolo freddo per ogni mL di Trizol usato inizialmente e 5 µg di glicogeno quale carrier per la precipitazione. Si è incubato a temperatura ambiente per 10 minuti, ai quali è seguita nuova centrifugazione. A questo punto è stato possibile osservare un pellet bianco

sul fondo della provetta. Si è rimosso il surnatante e si è lavato il pellet con 500 mL di etanolo al 75% freddo. Si è centrifugato a 4°C per 10 minuti a 1400 rpm e si è rimosso con cautela il surnatante. Si è ulteriormente centrifugato il tutto per 1 minuto e sono state rimosse le ultime gocce di surnatante. Il pellet è stato fatto così asciugare per circa 10 minuti ed è stato risospeso in 15 µl di H₂O-DEPC.

Retrotrascrizione

L'RNA è poi stato retrotrascritto in cDNA utilizzando il kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, USA).

Le provette eppendorf da 0,2 mL sono state inserite in ghiaccio prima di iniziare la reazione. Dopodichè si sono assemblati, sempre in ghiaccio, RNA e i primer per il cDNA in acqua “nuclease free” fino ad un volume finale di 5 µl per ogni reazione di Reverse Transcription (RT). Le eppendorf sono state poi inserite in un termoblocco preriscaladato ad una temperatura di 70 °C per 5 minuti e successivamente in ghiaccio per altri 5 minuti. Dopo una centrifuga di 10 secondi, le provette sono state poste di nuovo in ghiaccio fino al momento dell'aggiunta della “reverse transcription mix”. La “reverse transcription mix” è stata preparata in quantità sufficiente per retrotrascrivere tutti i campioni, in base alle quantità indicate nella tabella 15.

Tabella 15: reagenti necessari per la retrotrascrizione

Reagenti	Volume µL
Nuclease-free water	5,8
ImPro-II™ 5X Reaction Buffer	4,0
MgCl ₂ (concentrazione finale 1.5-8 mM)	1,2
dNTP Mix (concentrazione finale 0.5 mM per ogni dNTP)	1,0
dCTP(32P)	1,0
Recombinat Rnasin Ribonuclease Inhibitor	1,0
ImPro-II™ Reverse Transcriptase	1,0
Volume finale	15,0

La mix di reazione è quindi stata miscelata accuratamente utilizzando il vortex e se ne sono aliquotati 15 µl in ogni eppendorf, sempre in ghiaccio, prestando attenzione alle possibili contaminazioni. Infine, sono stati aggiunti 5 µl di RNA e i primer per il cDNA ad ogni reazione fino ad un volume finale di 20 µl. A questo punto è stata effettuata la reazione di retrotrascrizione vera e propria mediante incubazione a 25°C per 5 minuti ed estensione a 42°C per 1 h. Ottenuto così il DNA, l'enzima reverse transcriptase è stata inattivata mediante riscaldamento a 70°C per 15 minuti.

Estrazione del DNA

Mentre era in corso la presente ricerca, sono aumentate notevolmente le informazioni in banca dati sul genoma suino di cui è ora disponibile in rete l'intera sequenza genomica, pur con alcuni "buchi". Mediante una ricerca nella banca dati Ensembl (www.ensembl.org) sono state quindi trovate le informazioni sulla sequenza di DNA dei geni candidati oggetto del presente studio. Si è quindi reso necessario estrarre il DNA dai campioni in esame, da utilizzare per le successive analisi a livello genomico.

Poiché i campioni di tessuto erano conservati in RNAlater (Ambion), è stato necessario mettere a punto nuovi protocolli di estrazione da muscolo che permettessero di ottenere DNA di buona qualità. I due protocolli messi a punto si basano su una estrazione manuale, con guanidina tiocianato e resina di silice, e una estrazione automatizzata mediante l'utilizzo dell'apparecchiatura "Maxwell™ 16, Automated Genomic DNA Purification" e del kit dei reagenti "Maxwell™ 16 Tissue DNA purification Kit" (Promega Corporation, Madison, USA).

In entrambi i casi il DNA genomico estratto si è rivelato di buona qualità e facilmente amplificabile.

Estrazione manuale

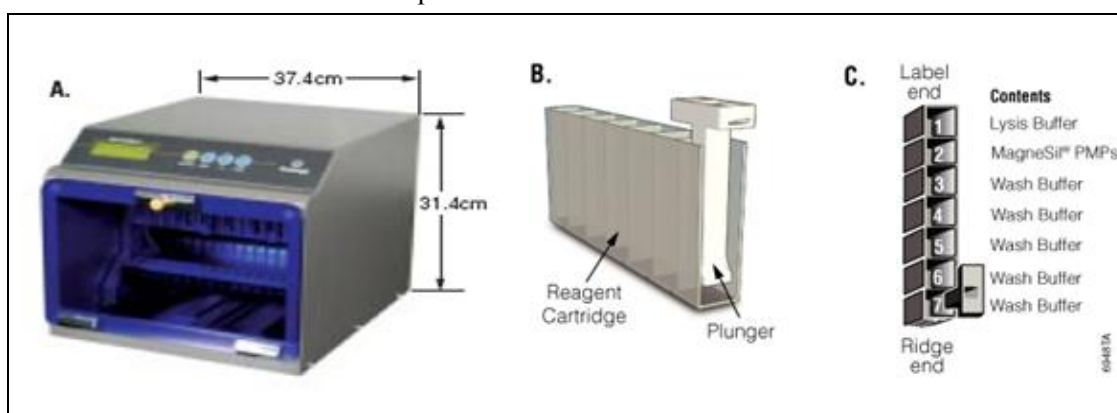
La tecnica di estrazione utilizzata è quella descritta da Cremonesi e colleghi (2006). L'estrazione è avvenuta direttamente in provette Eppendorf da 0,5 mL (Eppendorf, Milano, Italia). Sono stati pesati circa 50-60 mg di muscolo di suino e sono stati aggiunti 500 µL di soluzione salina sterile (NaCl 0,9%); dopo opportuna omogeneizzazione con vortex per circa 2 minuti si sono aggiunti 300 µL di soluzione di lisi (guanidina tiocianato 3M, 20mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 6.8), 40 mg/mL Triton X-100, 10 mg/mL DL-ditiotreitolo) e 200µL di soluzione binding (40 mg/mL di silice sospesi nella soluzione di lisi, Sigma Aldrich, Milano, Italia), si è lasciato tutto ad incubare per 5 minuti a temperatura ambiente e si è centrifugato per 30 secondi a 3500 rpm. Dopo aver eliminato il surnatante, si è ottenuta una resina, alla quale sono stati aggiunti 200 µL di soluzione di lisi; si è di nuovo centrifugato per 30 secondi a 3500 rpm ed eliminato il surnatante. Dopo aver aggiunto 200 µL di soluzione di lavaggio (25% absolute ethanol, 25% isopropanol, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8) si è centrifugato per 30 secondi a 3500 rpm ed eliminato il surnatante. Quest'ultimo passaggio è stato ripetuto una seconda volta, dopodichè sono stati aggiunti 200 µL di etanolo e si è centrifugato per 30 secondi a 3500 rpm. Dopo l'eliminazione del surnatante, è stata fatta seccare la resina utilizzando lo speed vacuum (Eppendorf, Milano, Italia). Infine sono stati aggiunti 100 µL di soluzione di eluizione (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) e le provette sono state incubate per 15 minuti in un bagnetto a 65°C. Dopo un'ultima centrifugazione a 4000 rpm per 5 minuti, si è recuperato il surnatante contenente il DNA estratto in un'eppeendorf pulita.

Estrazione con estrattore automatico

Oltre che con la metodica sopra descritta, il DNA è stato estratto dal muscolo anche mediante l'utilizzo dell'estrattore automatico "Maxwell™ 16, Automated Genomic DNA Purification" (figura 19) e del kit dei reagenti "Maxwell™ 16 Tissue DNA purification Kit" (Promega Corporation, Madison, USA). Si è partiti da un quantitativo di campione pari a circa 100 mg. Il campione è stato inserito direttamente nella prima celletta della cartuccia contenente il buffer di lisi. In posizione 7 è stato inserito un plunger che consente, grazie al movimento meccanico, di miscelare il campione esponendone una maggior superficie alla soluzione di lisi.

L'estrazione degli acidi nucleici effettuata da questo strumento è basata sull'utilizzo di particelle paramagnetiche (MagneSil® Paramagnetic Particles, Promega Corporation, Madison, USA). Queste forniscono una fase solida mobile a cui il DNA viene attaccato. Le particelle vengono quindi automaticamente spostate dallo strumento nei diversi reagenti, in cui avvengono le varie fasi di lisi, cattura e lavaggio. Dopo circa 45 minuti il DNA genomico è estratto e pronto per le successive analisi.

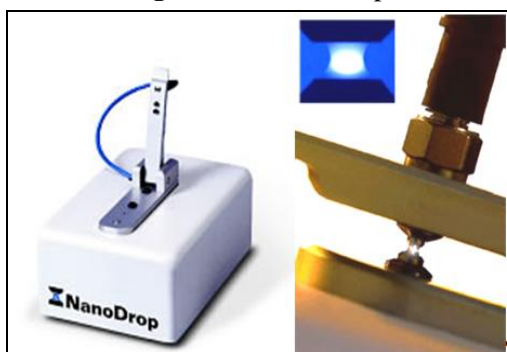
Figura 19:A) Maxwell™ 16, Automated Genomic DNA Purification. B e C) cartucce contenenti i reagenti per l'estrazione del DNA.



Analisi Spettrofotometrica

La qualità e la quantità di cDNA e di DNA ottenute sono state valutate utilizzando lo strumento NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Il NanoDrop (figura 20) è uno spettrofotometro UV-Visibile, capace di lavorare con microvolumi di campione, fino a 1 µl. Fornisce una quantificazione molto accurata ed una misurazione della densità ottica del campione, in quanto tutte le procedure di preparazione non devono essere più effettuate. Lo strumento, fornendo la lettura dei campioni a 230, 260 e 280 nm di lunghezza d'onda, permette di determinarne con una minima perdita di campione e senza ulteriori diluizioni la concentrazione e il

Figura 20: NanoDrop



grado di purezza. La determinazione della purezza è fondamentale in quanto l'interferenza dovuta a contaminanti può rendere difficoltose le successive analisi degli acidi nucleici. Essa può essere evidenziata mediante il calcolo dei "rapporti". Il primo rapporto, 260/280, è usato per stimare la purezza degli acidi nucleici rispetto alle proteine, dal momento che esse assorbono a 280 nm. Il secondo rapporto, 260/230, evidenzia invece la contaminazione del campione

dovuta alla presenza di sostanze come carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici. Un DNA puro dovrebbe avere un rapporto 260/280 di circa 1,8 e un rapporto 260/230 di circa 2,2. Valori di purezza intorno a 1,8 sono ideali, ma si possono considerare preparazioni di DNA o RNA di buona qualità anche quelle che presentano un rapporto rispettivamente compreso tra 1,5 e 1,8 e superiore a 1,7.

Analisi Molecolari

Disegno dei primer per l'amplificazione a partire dal cDNA

Per ciascun gene considerato sono stati disegnati primer che amplificassero frammenti di una lunghezza di circa 200 paia di basi (pb) da analizzare con la tecnica PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). I primer sono stati disegnati sulla sequenza di cDNA dei geni di interesse (tabella 16) disponibile nella banca dati dell'NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) utilizzando il programma bioinformatico Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Di seguito sono riportate le sequenze dei geni ed i primer disegnati per ciascuna di esse (Box 1-10). Il loro numero varia a seconda della lunghezza del frammento e della complessità della sequenza nucleotidica.

Tabella 16: numero di coppie di primer disegnate per ciascun gene per l'analisi PCR-SSCP

Gene	Lunghezza del cDNA	Nr. di coppie di primer
PIK3R2	1346 pb	4
INPP1	1637 pb	5
PLCG	4855 pb	19
CAPNS1	1930 pb	6
CDKN1C	472 pb	2
CRADD	1026 pb	4
PTPRD	1358 pb	11

Box1: Sequenza di mRNA del gene PIK3R2 e disegno dei primer

PIK3R2 (NM_005027)

```

1 atccacgata gccgcacaaa gctggagcag gagctgcggg cacaggcctc tgacaaccga
61 gagattgaca agcgcatgaa tagcctcaag ccagacctca tgcagctgcg caagatccga
121 gaccagtatc ttgtgtggct cactcagaaa ggtgcccggc agaagaaaat caacgagggg
181 gtggggatca aaaacgagac cgaggaccag tactcgctga tggaggatga ggatgacctt
241 ccccaccatg aggaacgcac atggtatgta ggcaagatca accgcacaca agctgaagaa
301 atgctgagtg gcaagcggga tggcaccttc ctcatccgtg agagcagcca gcggggctgc
361 tatgcctgct ctgtggtggt ggacggcgac accaagcact gcgtcatcta ccgcacggcc
421 acaggcttcg gcttcgcgga gccctacaac ttgtacgggt cctgaagga gctggtgctg
481 cactatcagc acgcctcgct ggtgcagcac aacgatgcgc tcaccgtcac ctcgcccac
541 ccagtgcgcy ccccgggccc tgggccccca cctgctgcc gctgagcgtg gagcaggaga
601 accggctccg gatcagagcc acccccagcg ccagaggcta gggtggcagc tgcacccggg
661 atctctatct ttctgaatct gtctcttctt tcttaggttt tctctgtctg tctctttgtg
721 aatctctccc agtgaatctc catttgacag ttctatcagt ctttcctcca agtctgctg
781 tctctctgtc tccctctgtc actattctgt ctctttctag ttccatctgt cctcttttct
841 tctcttggtc tctgttctc tgtgtatctg tgttgggggt cccgcctccc cccagccctc
901 atcccccttc cccactggca ccgctctccc tacggctctg gccaccacg acgaccctgt
961 gtctctcccc gccctgcag gcccccgggg tccccacaag cccacactgg ctgcacctgc
1021 catggtttaca gaggccccct gggctgcgca gccccagcct gggtgccccg attttttaag
1081 ccatagacct ggggtcgggg caggaaggaa cttcgctcgg ccaactccaa gaacctcagc
1141 cgtgacattt gggggccaggc gggacctgcc ccacagacc caacttcccc ttccaacct
1201 gaagtgaaac ccagcactgg gttatcccca cgatggggct gctgccaaga agtaaccccc
1261 ctgaaaagaa aataattaa aataaactcc tgagccgacc ccaggcctcc aaggattcga
1321 ggcagccagc acctctgggg cggct

```

PRIMER	Product	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
PIK3_F1	221 pb	65	20	59.98	45.00	6.00	2.00	ttgacaagcgcatgaatagc
PIK3_R1		285	20	60.10	50.00	4.00	3.00	gcggttgatcttgccctacat
PIK3_F2	277 pb	393	20	59.47	55.00	5.00	0.00	caagcactgcgtcatctacc
PIK3_R2		669	20	59.61	55.00	7.00	2.00	gatagagatcccggtgagc
PIK3_F3	266 pb	765	20	59.99	60.00	3.00	1.00	cctccaagtctgcctgtctc
PIK3_R3		1030	20	60.72	50.00	5.00	2.00	tgtaaactgagcaggtgagc
PIK3_F4	246 pb	1013	20	59.72	50.00	5.00	2.00	gcacctgccatgtttacaga
PIK3_R4		1258	20	59.88	55.00	3.00	3.00	gggttacttcttggcagcag

Box2: Sequenza di mRNA del gene INPP1 e disegno dei primer

INPP1 (AK232018.1)

```

1 gtttctggag ggaaagactg cagcctcctc ctgcgctccg catcccggct taggtaatac
61 gttttcctcc gtaagctccc ttcgccccag caccacaacc tcctttcctg ctcgatctg
121 ggtcccgagg ctgggcgaac tgtacacacc cttcacctct ccggacacta gctgaccgcc
181 cagaggggtg gtgctgattc caccagctgc tgcatctgta aagccaggtt cagaaatgtc
241 agatatacctt cgggagctgc tctgtgtctc tgagaaagct gccaacattg cccgggcatg
301 caggcagcag gaagccctct tccagctgct gatagaagaa aagaaagagg gagaaaagaa
361 caagaagttt gcagttgatt tcaagaccct ggctgatgta ctggtacagg aagttataaa
421 acagaatatg gagaacaagt ttccaggctt ggggaaaaaa atttttggag aagaatccaa
481 tgaatttact aatgatttgg gggaaaagat catcatgaga ctgtgtccaa cagaggaaga
541 aacagtagat cttctcaaca aagtccttaa tggtaacaag ttggcatctg aagcattagc
601 gaaggtggta catcaggacg tcgtctttac tgaccacagct ctggatttgg tagagatcaa
661 cattccacag gacatthttg gaatthgggt agatcccata gattcaactt atcagtatat
721 aaaaggttct gctgacatta aatccaacca agaatcttt ccaagtggac ttcagtgtgt
781 cactatthta attggtgtct atgacataca cacaggggtg cccctgatgg gagttatcaa
841 ccaaccttht gtatcgcaag acttaaacac cctcaggtgg aaaggacagt gctactgggg
901 cthttcttac atggggacca acatccattc acttctgctt tccatctcta caagaaacag
961 cagggaaacg cagagccaag agcccaaacc cctccgttct gaggcagaat gcccgacc
1021 gttctcagct gtcattagta ccagtgaaaa ggagaccatc aagactgctc tgtcccagg
1081 gtgtggagag cgagtattcc gggcagcggg ggacaggttac aagagcctct gtgttctct
1141 tggccttgta gacatttaca tcttctcaga agataccacg ttcaagtggg actcttctg
1201 tgctcacgcc atctcaggg ccatgggtgg gggaaatggtg gacttgaaag aatgcctgga
1261 aagaaatccc gatacagggc ttgacttgcc acagttggtg taccacgtgg gaaacgaagg
1321 tgctgctgga gtggatcagt gggccaaca gggaggtcta attgcataca gatcaaagaa
1381 gcagctggag gggttcctga gccgcctctt ccagtacctg ggcctgcag atgcatacac
1441 gtagatgagc tctgcctcct gtactcgaaa cccaactgtg aacctcgtt ccacatctcc
1501 atctthtgaa gaccacttht tctactgat ggtcaacatt cacctgcctc tthtgaggag
1561 aaththtcca tgatatgttc ataatgttaa tgtcaataaa tgaatgatat tcatgaagca
1621 aaaaaaaaaa aaaaaa

```

PRIMER	Product	start	len	tm	gc%	any	3' seq
INPP1-F1	220 pb	13	20	60.53	55.00	8.00	0.00 aaagactgcagcctcctcct
INPP1-R1		232	21	60.26	47.62	4.00	2.00 tgaacctggctttacagatgc
INPP1-F2	273 pb	240	20	59.79	55.00	6.00	2.00 cagatataccttcgggagctg
INPP1-R2		512	20	60.24	40.00	4.00	1.00 tgatctthttccccaaatca
INPP1-F3	312 pb	598	20	60.13	55.00	4.00	1.00 agcgaaggtggtacatcagg
INPP1-R3		909	20	59.84	50.00	4.00	0.00 taagaaaggccccagtagca
INPP1-F4	281 pb	924	20	60.20	50.00	2.00	0.00 tccattcacttctgccttcc
INPP1-R4		1204	20	60.06	55.00	3.00	3.00 agcagcacaagagctccact
INPP1-F5	313 pb	1175	20	60.01	55.00	7.00	3.00 accacgttcaagtgggactc
INPP1-R5		1487	20	60.01	50.00	3.00	0.00 cgaggttcacagttgggtt

Box3: Sequenza della regione 1-1860 di mRNA del gene PLCG e disegno dei primer

PLCG (NC_010459)

```

1 atggcactga ctggggagca ggtggagcat cgggagagga gaggacgttg gcttgggcat
61 caacaaaggt ccaagtgttag aggggctagc cctggagccc aagaagaacc aggaaaccag
121 gagaggttgt gggaagtcaa ggacagcttc cggcaggaga gaagggttag tcaacgtgcg
181 ggtggccctg agggtcagga gagaggaggc tggagaagtg acttgtgctc agtactctgg
241 ctccccaggc agcctgactg gggagcattt cattgggcct ttcgagatcc tggacacccc
301 gggactcggc cctcctgggc ccccagcctc ccctctgtag ccagtacatc tagaaagaac
361 tcgggcagca cggcctgcg ggcgagcaga ggtcagtgtg caaaggactg cccggagagt
421 cctctgggct caggcagaga ggctggggcc agcccctcgt cctcgtggcc actgttccct
481 cgggtgttga cggctggcag agggccccct tcccgcccc tcatccatcc gaaccccctt
541 tcccccaaac agccacactg cagcatcgat gccttggcct ccgtgatccc ctctggtggga
601 cctgagtcga gcgccccccc agacctgccg cctgcagaca ggcaccgtct cctgccccca
661 cctagtagta ggctgggtgc cgtggcaggg gacggggcct gctgtgctag cagagaggcg
721 aagctggctc tgagagcagc agtaccttca gttctgtggt tcaggcagct cgtcttatcc
781 ctgtccacccc tggccttgct tggtgtggtg atgtccacgc cactcctgaa gccagggagc
841 ctctgcgtgg gcctcgggga cctggtcctt ggagggataa gctctccctg gcttcggccc
901 cagcccggcc ttggcctcct cctgccttc ctagttgaca ttcgcgaaat caaggagatc
961 cgcccaggga agacctcccg ggactttgat cgataccaag aggatcctgc ttttcgacca
1021 gaccagtac actgctttgt catcctgtat ggaatggaat tccgcttga gaccctgagt
1081 ctgcaggcta cctctgagga cgaagtgaac atgtggatca agggcttgac ttggctgatg
1141 gaggacacgc tgcaggcggc cacgcctctg cagattgaga ggtggctgcg gaagcagttc
1201 tactcagtgg accggaatcg tgaggatcgt atatcagcca aggatctgaa gaacatgctg
1261 tcccaggtca actaccgggt cccaacatg cgcttcctcc gagagcggct gacggagctg
1321 gagcagcgca gcagcgacat cacctacgga cagtttgcac aactgtaccg cagcctcatgt
1381 tacagcgcccc agaagacgat ggacctccc ttcttggaag ccagtaccct aagggcaggg
1441 gagcggccag agctctgccc ggtgtccctt cctgagttcc agcagttcct cctcagtac
1501 caggggggagc tgtgggctgt cgaccggctc caggtgcagg agttcatgct cagcttcctc
1561 cgagacccct tgcgagagat agaggagact tacttcttcc tggacaagat gagccatctc
1621 gtcagcttcc tgttctccaa ggagaacagc gtgtggaact cttagctgga tgccgtgtgc
1681 ccagacacca tgaacaacc cctttcccac tactggatct cctcctctca caacacgtac
1741 ctgaccgggg accagttctc cagcagatcc tccctggaag cctacgcccg ctgcctgcgg
1801 atgggctgcc gctgcattga gttggactgc tgggacggcc cagacgggat gccggtcatt

```

PRIMER	Product	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
PLCG1_F1	242 pb	56	20	60.50	50.00	3.00	0.00	ggcatcaacaaagg ^{tccaag}
PLCG1_R1		297	20	59.65	55.00	5.00	0.00	gtgtccaggatctc ^{gaaagg}
PLCG1_F2	240 pb	327	20	59.30	60.00	3.00	2.00	cctcccctctgtag ^{ccagta}
PLCG1_R2		566	19	60.49	52.63	6.00	0.00	atgctgcagtgtg ^{gctgtt}
PLCG1_F3	207 pb	583	19	60.33	63.16	4.00	2.00	gtgatcccctctg ^{tggac}
PLCG1_R3		789	20	59.93	55.00	2.00	0.00	ggtggacagggata ^{agacga}
PLCG1_F4	234 pb	795	20	59.60	50.00	2.00	0.00	cttgettgggtgtg ^{gatgt}
PLCG1_R4		1028	20	59.85	55.00	4.00	2.00	gactggctctggtc ^{gaaaagc}
PLCG1_F5	225 pb	1053	20	59.65	40.00	8.00	3.00	aatggaattccg ^{cttgaaga}
PLCG1_R5		1277	20	60.56	60.00	4.00	3.00	cggtagttgacct ^{gggacag}
PLCG1_F6	200 pb	1362	20	60.74	55.00	4.00	2.00	actgtaccgcag ^{cctcatgt}
PLCG1_R6		1561	20	59.96	55.00	5.00	2.00	ggaggaagctgag ^{catgaac}
PLCG1_F7	213 pb	1623	20	59.98	55.00	4.00	2.00	cagcttctgttct ^{tccaagg}
PLCG1_R7		1835	20	60.66	50.00	3.00	2.00	tccagcag ^{tccaactca} t

Box4: Sequenza della regione 1861-3660 di mRNA del gene PLCG e disegno dei primer

PLCG (NC_010459)

```

1861 taccatggac acactctgac caccaagatc aagttctcag acgtcctgca caccatcaag
1921 gagcacgcct ttgtggcctc agagtaccocg gtcatcctgt ccatcgagga ccaactgcagc
1981 attgccacgc agaggaacat ggcccagtat ttcaagaagg tgctcgggga cacgctcctc
2041 accaagcccg tggacatcgc ggccgacggg ctcccctcac ccaatcagct caagaggaag
2101 atcctcatca agcacaagaa gctggctgag ggcagtgctg atgaggaggt gcctacgtct
2401 cgggacggcc ggcacatcgc cgagcgcctg ctcacagagt actgcatcg a gaccggagcc
2161 gtgatgtact ctgagaacga catcagcaac tccatcaaga acggcatcct ctacctggag
2221 gaccctgtga accacgagtg gtatccccac tactttgttc tgaccagcag caagatctac
2281 tactcagagg agaccagcag tgaccagggc aacgaggatg aggaggagcc caaggaggcg
2341 agcagcagca cagagctgca ttccaatgag aagtgggtcc acgggaagct cggggcgggg
2461 ccggacggct ccttcctcgt gcgagagagt gagaccttcg tgggtgacta caccctctcc
2521 ttctggcgga acgggaaagt ccagcactgc cggatccact cccggcagga cgctgggacc
2581 cccaagttct tcttgacaga caacctcgtc ttcgactcac tctacgacct catcacacac
2641 taccagcagg tgcccctgcy ptgcaacgag tttgagatgc gcctctctga gccggtcccg
2701 cagaccaacg cccacgagag caaagagtgg taccacgca gcctgaccag agcgaggcc
2761 gagcacatgc tgatgcgctg gccccgggac ggggccttcc tggtgcgaa acgcaatgag
2821 cccaactcct acgccatctc cttccgggct gagggcaaga tcaagcattg ccggtccag
2881 caggagggcc agactgtgat gctgggcaac tcggagtttg acagcctcgt ggatcttctc
2941 agtactatg agaagcaccg cgtgtaccgc aagatgaagc tgcgctatcc catcaacgag
3001 gaggcattgg agaagatcgg cacagctgag cctgactacg gggccctgta tgagggccgc
3061 aacctggct tctacgtgga ggccaacct atgccgactt tcaagtgtgc cgtcaaagcg
3121 ctcttcgact acaaggccca gagagatgac gagctgacct tcaccaagag cgcacatcac
3181 cagaacgtgg agaagcagga gggaggctgg tggcgggggg actatggtgg gaagaagcag
3241 ctgtggtttc cgtccaacta cgtggaagag atggtcagcc ctgcggccct ggagcccag
3301 agggagcact tggacgagaa cagccccctg ggggacttgc tgcggggggt cttggatgtg
3361 ccagcctgtc agatagccat ccgtcctgag ggcaagaaca acaggctctt cgtcttctcc
3421 atcagcatgg cgtcgggtgg acattggtcc ttggatgtgg ctgctgactc acaggaggag
3481 ctgcaggact gggtgaaaaa gatccgagag gtggcccaga ccgcgatgc caggctcaca
3541 gaggggaaga tgatggagcg gaggaagaaa atcgccttgg agctttctga gctcgtcgtc
3601 tactgcccgc ctgttccctt cgatgaagag aagatcggca cagaacgcgc ctgctaccgg

```

PRIMER	Product	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
PLCG1_F8	233 pb	1894	20	60.03	55.00	6.00	2.00	ttctcagacgtcctgacacac
PLCG1_R8		2126	20	60.55	50.00	4.00	2.00	gccagcttcttgtgcttcat
PLCG1_F9	210 pb	2175	20	59.84	50.00	2.00	0.00	gaacgacatcagcaactcca
PLCG1_R9		2384	20	59.97	50.00	6.00	1.00	ccgtggaaccacttctcatt
PLCG1_F10	226 pb	2429	21	60.21	52.38	6.00	2.00	tgctcacagagtactgcatcg
PLCG1_R10		2654	20	61.20	60.00	6.00	2.00	ggcacctgctggtagtgtgt
PLCG1_F11	280 pb	2660	20	59.60	50.00	4.00	0.00	gctgcaacgagtttgagatg
PLCG1_R11		2939	20	60.27	55.00	4.00	2.00	acaagatccacgaggctgtc
PLCG1_F12	231 pb	2963	20	60.01	50.00	4.00	2.00	tgtaccgcaagatgaagctg
PLCG1_R12		3193	20	59.63	50.00	4.00	1.00	tctccacgttctggatgatg
PLCG1_F13	259 pb	3126	20	60.01	60.00	4.00	0.00	cgactacaaggcccagagag
PLCG1_R13		3384	20	60.10	55.00	6.00	3.00	acggatggctatctgacagg
PLCG1_F14	228 pb	3402	20	60.67	55.00	3.00	0.00	caggctcttctgtcttctcca
PLCG1_R14		3629	20	60.19	50.00	6.00	0.00	tcttcatcgaagggaacagg

Box5: Sequenza della regione 3661-4854 di mRNA del gene PLCG e disegno dei primer

PLCG (NC_010459)

```

3661 gacatgtcgt ccttcccgga aaccaaggct gagaagtatg tgaacaaggc caaaggcaag
3721 aagttcctcc agtacaaccg gctgcagctg tcgcgcatct accccaaggg ccagcggctg
3781 gactcctcca attatgaccc cttgcccattg tggatctgtg gcagtcagct ggtggccctc
3841 aacttccaga ccccagacaa gccgatgcag atgaaccagg ctctcttcat ggccggcggg
3901 cactgcggtc acgtgctgca gcccaagcacc atgagggacg aggccttcga ccccttcgac
3961 aagagcagcc tccgcgggct ggagccgtgc gccatctgtg ttgaggtgct gggggcccgg
4021 catctgccga agaatggccg aggcattgtg tgtccttttg tggagattga ggtggccgga
4081 gcagagtatg acagcatcaa gcagaagaca gagtttgtgg tggacaacgg actgaacccc
4141 gtgtggccgg ccaagctctt ccacttccag atcagtaacc ccgaattgct cttcctgcgc
4201 tttgtggtgt atgaagaaga catggttagc gaccagaact tccctggctca ggccaccttc
4261 ccggtgaagg gactgaagac gggatacaga gcggtgcctt tgaagaacaa ctacagcgag
4321 gacctggagt tggcctccct gctcatcaag ctcgacattt tccccgtcaa gcaggagaac
4381 agcgacctca gtccctttgg ggggacgtcc ctgcgggagc ggggctacga catctctggc
4441 cagccggcac acggccgggc ccgggagggc tccttcgaag cccgctacca gcagcccttt
4501 gaggacttcc gcactttcca ggagcatctc gcaaaccttt tgacagtcgg gaacaaaggc
4561 cccacgaagg actcgggtca atggagacaa ccgcctctag ctgtgcccc gctcgcaga
4621 gagcagccgg ggccgagcac ccgcagagt gccgtgaact gggttcttgg gaagcggcct
4681 gccgtggcgg ccctctggc cccgccgctt ggaggctggg tcccagcgt gaacgctaga
4741 cgaaaacccat gccattaatg agatgtattc ctgttttggg cctccatgcc ccagctccgg
4801 ggaaggcaga aacgtactgt gtctcgcatt taagcacaca cggccctgac ttcc

```

PRIMER	Product	start	len	tm	gc%	any	3' seq
PLCG1_F15	207 pb	3678	20	58.38	50.00	3.00	1.00 ggaaaccaaggctgagaagt
PLCG1_R15		3884	20	59.83	50.00	5.00	2.00 agagcctggttcatctgcat
PLCG1_F16	202 pb	3992	20	60.31	55.00	3.00	1.00 ccatctgtgttgaggtgctg
PLCG1_R16		4193	20	59.84	45.00	4.00	1.00 aaggcaaattcgggttact
PLCG1_F17	222 pb	4223	21	59.37	47.62	5.00	3.00 tgttagcgcaccagaacttc
PLCG1_R17		4444	20	60.97	60.00	8.00	2.00 gctggccagagatgtcgtag
PLCG1_F18	200 pb	4474	18	62.41	61.11	6.00	2.00 ttcgaagcccgtaccag
PLCG1_R18		4673	20	59.94	50.00	5.00	2.00 ttccaagaaccagttcac
PLCG1_F19	200 pb	4584	20	60.16	60.00	4.00	2.00 gagacaaccgcctctagctg
PLCG1_R19		4783	20	59.43	45.00	4.00	0.00 aggcccaaacaggaataca

Box6: Sequenza di mRNA del gene CAPNS1 e disegno dei primer

CAPNS1 (NM_214318)

```

1  ctcactgatg gcgctcataa ccccgcccag gagctgcaca gagaagcggg cccgcgagacg
61  tggaacgagg cgggaatcttg agtcacagcc atgttcctgg ttaactcgtt cctgaagggg
121 ggcggcgggc gcggcggggg aggcgggggg ttgggcgggg gcctagggaa tgtgctcggg
181 ggectgatca gcggggccgg aggcggcggt ggcggcgggc gtggcgaggg aggcggcggg
241 ggtggtggcg gaactgccat gcgcatcctg ggcgggggta ttagcgccat cagtgaggcg
301 gctgcgcagt acaacccccg gcccccgccc cctcgcaccc attattccaa cattgaggcc
361 aatgagagtg aggagggtccg gcagtttcgg aggctctttg cccagctggc tggagatgac
421 atggagggtc gtgccacgga actcatgaac attctcaaca aggtcgtgac cgcacacct
481 gatctgaaga ctgatggttt tggcattgac acatgtcgaa gcatgggtggc tgtgatggat
541 agtgacacaa ccggcaagct gggcttcgag gaattcaagt acttgtggaa caacatcaaa
601 aagtggcagg ccatatacaa acagttcgat gttgaccgtt caggaccat tggcagcagt
661 gaactcccag gggcctttga agccgcagga ttccacctga atgagcatct ctacagcatg
721 atcatccgac gctactcaga tgagggaggg aacatggatt ttgacaactt tatcagctgc
781 ctggtcagac tggatgccat gttccgtgcc ttcaaatctc ttgacaaaaga tggactgga
841 caaatccagg tgaacatcca ggagtggtctg cagctgacca tgtattcctg aacgggagcc
901 ccagacctgc cccctcgttc gcctcgtcga gggagtcacc ttggactcct cggctctctc
961 cagggtgat ctcatccgca gccacatctt cgtgggttct gtggaccac actccttct
1021 gttctcccag ccggttggc acagattctc agtcaacagc cagagcccaa catgcttcag
1081 cagccctgc ccgacagtc acccacacc cgtgcacca tctcatacc gctccattg
1141 ccctctcttg caccagtgc aagcccaaca tttttgttgc ttccacacc caaggcctt
1201 ctctctgttc tgggaggatc agtccagaga gaaaggccct tgggtgtgt ctgtactgt
1261 gtgcttgtga gcatgtgcat gcgtgcctac aggtgtgtgt gatcacaggga gtgcaactgcc
1321 acttacagggc gtggcgacct gcaggaatcc ccaggcctgt aagtgtgccc acagctgtgt
1381 gccggggggc ggggtgccgg gcgctactcg cctctcgtc tggttctctg ctccaatgat
1441 cacaactcac tttcagtgag cccaaaggaa aaaaccagtt ctagattcaa ttggtctgct
1501 ctaacctgga ctttagccct tggggccggc atctcccact gtctccagac accaccagt
1561 aagtgccagc aagcttcctg gtctgccaca cagccctcct ctccccgaca tggcctctct
1621 cttcctctgag ggccctctca agccccctgc cccaccac agtgctcctt gagagcagc
1681 aaggcagatg tgagagcaaa ggccacgatc ccagtgtcag ggggtggatc ttcatgaagg
1741 agggggcccga agccctcatg ggcggacccc ccttgagcct gtctgaaggt ctggccctt
1801 gtgcattcag gccaaaggccc ctaggcagag atgccaccac tgctcctctg ggggatgtgt
1861 cctctcccct cgccctgacc tgctggcatt agactcacc cgtgtacct gtaaaggcct
1921 ttctgcagc

```

PRIMER	Product	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
CAPNS1_F1	203 pb	67	20	59.81	55.00	5.00	3.00	gaggcgggaatcttgagtcac
CAPNS1_R1		269	18	62.80	55.56	8.00	2.00	aggatgcgcatggcagtt
CAPNS1_F2	212 pb	332	20	60.33	50.00	3.00	0.00	ctcgcacccattattccaac
CAPNS1_R2		543	20	58.96	50.00	2.00	0.00	actatccatcacagccacca
CAPNS1_F3	264 pb	604	20	59.95	45.00	6.00	0.00	tggcaggccatatacaaaaca
CAPNS1_R3		867	20	59.96	55.00	5.00	2.00	ccactcctggatgttcacct
CAPNS1_F4	231 pb	927	20	59.68	60.00	5.00	1.00	ctgagggagtcaccttggac
CAPNS1_R4		1157	20	60.01	55.00	4.00	2.00	actggtgcaagagaggggcta
CAPNS1_F5	270 pb	1308	20	59.90	55.00	8.00	1.00	ggagtgcactgccacttaca
CAPNS1_R5		1577	20	60.00	55.00	8.00	1.00	gaagcttctgggcacttcac
CAPNS1_F6	234 pb	1608	20	60.22	55.00	4.00	0.00	acatggcctctctccttctc
CAPNS1_R6		1841	20	60.82	55.00	5.00	2.00	agtgggtggcatctctgccta

Box7: Sequenza di mRNA del gene CDKN1C e disegno dei primer

CDKN1C (AK350718.1)

```

1  tgccagccag gccagagcca gcctagcgag cgaggacagg cactgagggg gcgcggccgc
61  cggccggacg acacagcgaa cgagactcag gagcagtcca cggcccgaca gccagcgtgt
121 tggcaatgga gcgcctcgtc gcccgccgca cttttcccct gttcgcgcgc accagcgctt
181 gccgcagcct cttcggggccg gtggaccacg aggagctgag tcgtgagctg cagatccgtc
241 tggctgagct gagcgccgag gaccagcgtc gctgggacta caacttccag caggacgtgc
301 cactgcgggg ccccgggcgc ctgcagtgga ccgaggtgga cagcgactcc gtgcccgcct
361 tctaccgaga gacgggacag gtggggcgct gtcgcctgct cctggcgctt cgtccgcgcc
421 cggacggcgc gagegatagc ccgccccccg ggccgccggc cgatgagtcc c

```

PRIMER	Product	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
CDKN1C_F1	214 pb	23	18	59.83	66.67	4.00	0.00	ctagcgagcgaggacagg
CDKN1C_R1		236	20	60.30	55.00	8.00	2.00	gatctgcagctcacgactca
CDKN1C_F2	310 pb	68	19	60.05	57.89	2.00	1.00	acgacacagcgaacgagac
CDKN1C_R2		377	18	60.98	61.11	4.00	2.00	caccgtctcgcggtagaa

Box8: Sequenza di mRNA del gene CRADD e disegno dei primer

CRADD (AK232202.1)

```

1 gatggtgccc atggtacagc ttcctgact gtctggattc cggttgcagt ttgttcagtt
61 ttgtttttaa agatacgtgt ttgcagacgg gcacatggag gctagagaca agcaagtcct
121 tcgctccctt cgctgggagc tgggtgcaga ggtgctggta gaggggctgg ttctccagta
181 tctttaccag gaagggatct tgacggaaaa ccacgttcaa gaaattaaag ctcaagctac
241 aggccttcgg aaaacaatgc tgctgctgga tatcctacct tccaggggtc ctaaagcatt
301 cgatgtattc ctagattccc tgcaggaatt cccttgggta agagagaagc tggagaaggc
361 aagagaagaa gccatagttg agctgcctgc agatgacgcg atggctggaa tcccccgca
421 catcctcaat agctccccgt ccgaccggca gatcaaccag ctggcgcaga ggctgggccc
481 cgagtgggag cccgtggtgc tgtctctggg cctgtcccag accgacatct accgctgtaa
541 ggccaaccac cccacaacg tccagtcca ggtggtggag gcctttgtcc gctggaggca
601 gcgcttcgga aagcaggcca ccttcagag ccttcacagg agcctccagg ccatggaggt
661 ggaccctctc gtgctccagc acatggtgga atgatggtgc accattaac acccggggcc
721 cccgtggca tgtgccagat cctcactctc accggggca gtagatttg ggggatttt
781 tttgtttgtt ttgtttgttt ttggtctttt tagtgatcct tcgataaaag gagataatgc
841 gatttccact tgacatttcc ttgaaaggca ggatgactga gtaggtttcc cacactgctg
901 cattgacaat tcattgtgtc tcattgctcg aggatggcat tatttgaatc gtgcaggttt
961 taattgtgtg gttgcctttc aataaactga ttcacacctag tggcccaaaa aaaaaaaaaa
1021 aaaaa

```

PRIMER	Product	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
CRADD_F1	240 pb	36	20	59.98	45.00	4.00	0.00	gattccggttg cagttt gtt
CRADD_R1		275	20	60.21	50.00	8.00	3.00	ggatatccagcagcagcatt
CRADD_F2	262 pb	285	20	60.29	50.00	4.00	2.00	ggggtcctaaagcattc gat
CRADD_R2		546	20	59.73	50.00	6.00	2.00	ttggccttacagcggtagat
CRADD_F3	226 pb	528	20	60.27	55.00	6.00	2.00	tctaccgctgtaaggccaac
CRADD_R3		753	20	59.64	60.00	4.00	0.00	gggtgagagtgaggatctgg
CRADD_F4	200 pb	733	20	59.80	60.00	4.00	0.00	gccagatcctcactctcacc
CRADD_R4		932	20	59.98	50.00	6.00	1.00	cctcgagcaatgagacacaa

Box9: Sequenza della regione 1-1920 di mRNA gene PTPRD e disegno dei primer

PTPRD (XM_001924652.1)

```

1  aggatcaaat  tcccaggggc  ttcctacca  ttgacatggg  cccacagttg aaggtggtgg
61 agcgttacacg cactgccacc atgctttgtg cagccagtgg gaatccggat ccagaaatca
121 cttggttcaa agatttcctc cctggtgaca caagcaaca caatggccgt attaaacagt
181 tacgatcaga atctattggt ggtacaccaa taagaggagc cttcagatc gaacagagtg
241 aagaatctga ccaaggaaaa tatgagtgtg tgccaccaa cagcgcgggc actcgctatt
301 ctgcccctgc caatttatat gtcagagagc tcggagaagt tcgccgtgtc ccaccaagat
361 tctctatccc acccactaat catgaaatca tgccaggtgg aagtgttaat atcacctgtg
421 tggctgtggg gtcaccaatg ccttatgtga agtggatggt gggggcagaa gatctgacac
481 ctgaagatga tatgccaata ggaagaaatg tcctagagct gaatgatgta agacagtcag
541 caaattacac ctgtgttgct atgtcgacac taggtgtcat agaagcaata gcacagatca
601 ctgtcaaagc cttacccaaa cctccaggaa ctctgtggtg gacagagagc acagctacaa
661 gcatcacact gacatgggac tctggaaacc ctgaacctgt ctcttactac atcattcagc
721 ataagcctaa aaattctgag gaaccttaca aagaaattga tggggtggca actacacgct
781 acagtgttgc tggactaagt ccctactccg attatgaatt cagggttggt gctgtcaaca
841 acattggccg ggggcctccc agtgagcccg tgctcacaca gacctcagaa caagcacctt
901 ccagtgcccc acgggatgtc caggcacgaa tgttgagttc aaccaccatt ttggtgcaat
961 ggaaggagcc tgaagagcca aatggacaga ttcaaggata cagagtttat tacacaatgg
1021 accccaccca gcatgtcaac aactggatga aacacaatgt agctgacagc caaatcacta
1081 ctattggcaa cttagtgcc cagaaaacat actctgtcaa ggtcctggct tttacctcaa
1141 ttggagatgg tcctctttca agtgatatac aggtcatcac tcagacagga gtaccagggc
1201 agccactgaa cttcaaggca gaacctgaat ctgaaacaag tattttgctt tcttggacgc
1261 ctccacgttc agacaccatt gccaaactatg aactggtcta caaggcggg gaacatggag
1321 aggagcaacg gattaccatt gagccagggg cgtcttatcg actgcaaggg ctgagaccaa
1381 acagcttata ctacttccgt ctggctgcac gatctcctca aggctgggt gcttccacag
1441 ctgaaatata agctagaacc atgcagtcaa agccgtcagc tcctcctcaa gacattagtt
1501 gcaccagccc aagttccact agtattttgg taagttggca acctccacca gtggaaaaac
1561 agaatggcat tattaccgaa tattccatca agtacactgc agtggatgga gaagatgaca
1621 aacctcatga gattttggga attccttcgg aactaccaa ataccttttg gaacagctgg
1681 aaaaatggac tgagtaccgc atcactgtga cagcccacac agatgtcggc cctggccctg
1741 agagcttgtc cgtgttgatt cgaaccgatg aagatgttcc tagtggctct cctcgcaaag
1801 tcgaggtaga ggctgtcaac tcaacatctg ttaaagtctc atggcgctca cccgtgccca
1861 ataaacagca tggccagata agaggatacc aggtgcatta tgtgaggatg gaaaatggtg

```

PRIMER	Product	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3' seq</u>
PTPRD_F1	241 pb	43	20	59.15	55.00	3.00	0.00 cacagttgaaggtggtggag
PTPRD_R1		283	20	60.20	55.00	6.00	2.00 ctgttggtggcaacacactc
PTPRD_F2	246 pb	324	20	60.04	55.00	5.00	3.00 agagagctgcgagaagtctcg
PTPRD_R2		569	20	58.28	50.00	8.00	0.00 tgctgacatagcaacacagg
PTPRD_F3	231 pb	538	22	60.60	45.45	6.00	2.00 cagcaaattacacctgtgttgc
PTPRD_R3		768	20	60.16	45.00	4.00	1.00 ccacccatcaatttctttg
PTPRD_F4	213 pb	755	20	60.19	45.00	4.00	2.00 aattgatggggtggcaacta
PTPRD_R4		967	20	60.31	40.00	4.00	2.00 tccttccattgcacccaaaat
PTPRD_F5	244 pb	957	20	60.33	50.00	4.00	0.00 caatggaaggagcctgaaga
PTPRD_R5		1200	20	60.26	60.00	4.00	3.00 gccctggtactcctgtctga
PTPRD_F6	218 pb	1296	20	59.97	55.00	3.00	0.00 gtctacaaggacggggaaca
PTPRD_R6		1513	20	60.13	50.00	4.00	2.00 cttgggctggtgcaactaat
PTPRD_F7	209 pb	1670	20	60.05	45.00	6.00	0.00 ggaacagctggaaaaatgga
PTPRD_R7		1878	20	59.69	45.00	6.00	0.00 tctggccatgctgtttattg

Box10: Sequenza della regione 1921-3257 di mRNA del gene PTPRD e disegno dei primer

PTPRD (XM_001924652.1)

```

1921 agcctaaggg ccagcccatg ctgaaggatg tcatgctggc tgatgcacag tgggaatttg
1981 atgatactac tgaacatgac atgattatth ctgggctaca gcctgaaacg tcctattccc
2041 tcaactgtcac agcctacacc accaaaggag atggagctcg cagcaaacc aaactgggtg
2101 ccaccactgg ggcagttcca gggaaacccc gacttgtgat taaccacact cagatgaata
2161 ctgctctcat tcagtggcac ccccctgtgg acacatttgg acccctccag ggctaccgtc
2221 taaaatttgg ccgaaaggat atggagcctc tcaactactc ggagttctct gaaaagaag
2281 atcactttac agcaactgac atccacaaag gagcatcgta tatcttcagg ctctcagcca
2341 gaaacaaagt gggcttcggg gaggagatgg tgaaggagat ttctgtccca gaagaagtc
2401 caactggctt ccctcaaaac ctccactcag aaggcaccac gtcaacctcc gtccagttat
2461 cttggcagcc acctgtcttg gccgagagaa atggcattat caccaagtat acacttctgt
2521 atagggatat caacaccctt cttcttccaa tggagcagct tattattcca gctgacacca
2581 ctatgacact cagtggctta aaaccagata ccacatatga tgtaaaagta cgtgctcaca
2641 caagcaaagg gcccgggcca tatagtccca gtgtccagtt taggacactg cctgtggatc
2701 aagtgtttgc aaaaaattht catgtcaaag cagtaatgaa gacatcagtg ctactgtcgt
2761 gggagattcc ggagaattat aattctgcca tgcctttcaa aattctttat gatgacggga
2821 aaatgggtgga agaagtggat ggccgagcta cacagaagtt gatcgtcaac ctgaagcctg
2881 agaagtccta ttcatttgtg ttgacaaatc gtggcaacag tgctggtgga ctacagcaca
2941 gagtgacagc aaagactgct ccagatgtgt tacgtaccaa gcctgccttc attgggaaga
3001 ccaacttggg tggcatgatt accgtgcaat tgcccgaagt acctgccaat gagaatataa
3061 agaagagggc agagtccgac tctagaaaga gcagcatacc aaacagtaag gaggtccctt
3121 cacaccatcc aacagaccca gtagaactga gacgccttaa ttttcaaaca ccaggaagat
3181 tgattttgaa taatacggtc atgatgtcaa aacagtacaa attataccct gctgccatct
3241 ggaatggtga aaaataa

```

PRIMER	Product	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
PTPRD_F8	269 pb	1965	20	59.50	45.00	5.00	2.00	gcacagtgggaatttgatga
PTPRD_R8		2233	20	59.96	45.00	7.00	2.00	cgccaaatttttagacgta
PTPRD_F9	223 pb	2328	20	60.13	50.00	5.00	0.00	aggctctcagccagaaacaa
PTPRD_R9		2550	20	60.08	50.00	2.00	0.00	ttggaagaagaggggtgtg
PTPRD_F10	293 pb	2630	20	60.10	50.00	4.00	0.00	acgtgctcacacaagcaaag
PTPRD_R10		2922	20	60.16	50.00	4.00	1.00	cactgttgccacgatttgc
PTPRD_F11	234	2903	20	60.16	50.00	4.00	3.00	gacaaatcgtggcaacagtg
PTPRD_R11		3136	20	59.52	50.00	2.00	0.00	tctgttgatggtgtgaagg

Disegno di nuovi primer per l'amplificazione a partire dal DNA

Dopo aver estratto il DNA, sono stati controllati tutti i primer utilizzati nelle prime prove di PCR-SSCP, al fine di verificare la loro collocazione sul genoma suino e quindi il loro possibile utilizzo direttamente sul DNA genomico. Questo è possibile solo nel caso in cui la coppia di primer si trova sullo stesso esone o su esoni non troppo distanti tra loro. In caso contrario sono stati disegnati nuovi primer che permettessero l'amplificazione a partire dal DNA genomico. Per effettuare queste operazioni si sono utilizzate le informazioni presenti nelle banche dati NCBI ed Ensembl (www.ensembl.org). In tabella 17 è elencato il numero di primer disegnato per ogni gene considerato. Sono state considerate solo le regioni che erano risultate polimorfiche nelle analisi precedenti. Infatti, nella maggior parte dei casi, il numero dei primer è diminuito notevolmente rispetto alle coppie utilizzate nella prima analisi. Il gene CDKN1C è stato inoltre eliminato dallo studio in quanto risultato apparentemente non polimorfico. Di seguito sono riportate le sequenze dei geni ed i primer disegnati per ciascuna di esse (Box 11-18).

Tabella 17: numero di coppie di primer disegnate per ciascun gene per l'analisi PCR-SSCP

Gene	Nr. di coppie di primer
PIK3R2	6
INPP1	4
PLCG	3
CAPNS1	2
CRADD	1
PTPRD	4

Box14: Sequenza parziale del gene PLCG e disegno dei primer

PLCG (chromosome - Sscrofa9:17:45903109:45906696:1)

agtgagggccccctccccactggcccacctcctaggtgacgggttgggagtgcttgctgaacagcgctggccgataggaccct
ctgtcaggggcatgtgggtgctgctgcccaggcccttgatctcgaagacgaggggtgccagccaccacctcgtaggagagaagatc
cccccttccccatctttctcatccagctgccaggccagaagtgtgttctgccccatcctggggcagagttcccataaggttaggt
ttcttccctgtcaggcctagggagcttccccatggccagtagcggatttggctgaggataaccctcctcctcctccccaggaag
tcccagttccttaggcccccaaccgggcaactgagctgctggctctcacagggcattccgcagggtccagagggccctggagg
gactgcccctccatccctgggggaggggaggggctgcagatgggctcccctcccctggccaccctctgtgccaatcatagg
cttcccttgctcagatgaggaaactgagggccagaggaaggaaggacttccgctgatcactacagttctgagccagcctcactg
ccaggactccagatcctagaatagtgtgtttacctgttcagccccaggtgggttcagcccacaggtcagaggtcatgaggggt
agtgagggccctgtcagatgtccccctttccctgtcctcagtatatcagccaaggatctgaagaacatgctgtcccaggtcaacta
ccgggtccccaacatgctgcttccctccgagagcggctgacggtaagggcctgcccggcgatgcaggcgggtggggaggtgggag
tgccgccccctgaccgggctgattggaagtcccgtctgcccacaggagctggagcagcgcagcagcagcatcacctacgga
cagtttgcaaacatgtaccgcagcctcatgtacagcgcaccagaagacggtgcttgagccacctgtcccagcgcgccaccctgccc
ctcccaccccagccccactgtctcagcccctgctgcccctgctgcccctgcttgggggtgttggggagctgtttgtccagcttttgt
cctcaggaggcctgctgctcagatgcccagcctttcttcccagagacccttcccacatggcctcctggggcttttggcgtga
cccggttctttctcctgcagatggacctccccttccctggaagcagtagccctaaaggttgggttgaagtggggaggtggggttct
cccagggctccattgtcccctcccctgggttgattcctaataatgcaggtgggagggcaggggtgggtggctgagccctgctggaccgttc
tgggcagctgtgctcctccaaggggccccctcgtcgtctgtggcccacactagccagctgtctgccaagcgttgtcttctt
cctgcagggcaggggagcggccagagctctgcccgggtgtcccctcctgagttccagcagttcctcctcagtagtaccagggggtacg
gctgggctgggggtgagccagggtgctggctgagggggctgggcacaccgctggctggaggcctctcacgtgccctgacctcct
ccccatcaggagctgtgggctgtcagccgctccaggtgcaggagttcatgctcagcttccctccgagacccttgcgagagatag
aggagacttacttcttccctggacgaggtgagccctgctcactccctgctcgcagaatcagggagccggtgggctgaccggagc
cccgtggggccttcccactgtccactgtgcccctcacctggactgagcaccctcctcctgaccaccctgtgcccgtggcccagggc
aggggctcatcatcttctcctcctccacatgttcttgggagtttgcaccttccctgttctccaaggagaacacgctgtgga
actcgcagctggatgcccgtgtgcccagacacctgaacaaccccccttcccactactggatctcctcctcacaacacgtgagt
ggcccgttgacccttggcctgacctcaggagctggggctgcctgcagccctgccccttccctgtccaggtacctgacc
ggggaccagttctccagcagctcctcccctggaagcctacgcccgtgctcgggatgggctgcccgtgattgagtgctgctggg
ggcccgttgggggggaaaggggagggcctgcccgtgactgtggtcgccttgctcctcagtgaggactgtgggacggcccagac
gggatgcccgtcatttaccatggacacactctgaccaccaagatcaagtctcagacgtcctgcacacctcaaggagcagcct
ttgtggcctcagagtgagtggggtggctcagctccagctctcctcctggcgcaccccaccttccacctcctgctgcccgtgccc
cagagctgtgcttccctgcatccttagccccacctctgcttgaggccttctcctcagcctgtgggtgcacagtaagctcttctcat
catcaaaattacttcccttagccctgggcccattgtcctgcccactgctttcccctcccacccagagaattgcccgtgctg
tccctgtgtctcgtctgacagttcctgttagtccccaacctgtagtcaggggctctcccacctcactgaggggggtcaccagc
ccccccacccccatggctaatttggaggtgcttgtcactctcctgaccttgggtgtgggatgtttctctttgctgctggga
cagcctccgtgggtggaccaactctggggagcctgttggccacagtcaccagccttgggttctgctgacccatagtgccctctg
tgaaccctcccctcctcctgcggtggcagggcccctccttctctgggggtggctctctggggaaaggacctcagccccataggctc
ccagctcgtctcttgggtgaggacgtgagccttgacgctgcagaatggcaggggtctgtatcccgcactaggtaccggctcatcctg
tccatcgaggaccactgcagcattgcccagcagaggaacatggcccagatattcaagaaggtgctcggggacacgctcctcacca
agcccgtggacatcgccggcagcggctcccctcacccaatcagctcaagaggaagatcctcatcaaggtagggctggcgcttcc
gtcgtggcgagtggtaatgaaccacctaggatccatgaggatgcccgttcaatccctggcctcagatcagtggttaaggatcc
cgtgttgcctgagctgtggtgtaggtgacagacacaacctactgtgtgtggtgct**gtgggtgtaggcggca**tcgcagccccat
ttggacccttagcctgggcacctccatagccatgagtggtggcctaaaaatagcaaaaaaaaaaaggtagggctgtgtgggtc
ccacctctgctccgggtgctcagctctgggctgggtgaggggggtgggctctgggaccagggctggcatgcccagctgctc
cctgcagcacaagaagc

PRIMER	Product	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
PLCG_F1	498 pb	252	18	60.40	66.67	2.00	0.00	GAACCCTCCCCTCCTCCT
PLCG_R1		749	18	62.52	66.67	6.00	0.00	GATCCGGCCTACACCAC

Box15: Sequenza parziale del gene PLCG e disegno dei primer

PLCG (chromosome - Sscrofa9:17: 45906697:45909298:1)

tggtgagggcagtgcgatgaggaggtgcctacgtctgtgatgtactctgagaacgacatcagcaactccatcaagaacggcat
cctctacctggaggaccctgtgaaccacgtgagggctgggcccgggctgggcccggggcaggggtggcgagagggctgtctccacag
gcctggctccccctctctccaggagtggtatccccactactttgttctgaccagcagcaagatctactactcagaggagaccagc
agtgaccagggcaacgaggatgaggaggagcccaaggaggtgagggactggcccagggccgggggctgggctggggtcaggggtca
tggagtgtctctgccagcgcctccccctgcagggcagcagcagcacagagctgcattccaatgagaagtgggtccacgggaagc
tcggggcggggcgggacggccggcacatcgccgagcgcctgctcacagagtactgcacgagaccggagccccggacggctcctt
cctcgtgcgcgagagtgagacctcgtgggtgactacacctctccttctggtaagcctccctgcgctgcacatgtggagaggg
cgccccctggggacagccacctgcagcgtggcacaggtgcccgtgggcccacagggcttctcaacgtgaagacctgtggggctc
gcctttctccccgagacggggcgcctcgcagcagtgagggggtggctcgggcccggcctgctgctcactgcctcctgtccccctca
ggcgaacgggaaagtccagcactgcccgatccactcccggcaggacgctgggacccccaaagtcttctctgacagacaacctcgt
cttcgactcactctacgacctcatcacactaccagcaggtgccccctgcgctgcaacgagtttgagatgcgctctctgagccg
gtcccgcagaccaacgcccacgagagcaaagagtgagggcggggcggggcggggcggggagtggggtggggcggggccagggct
gactccggcgtccacaggtggtaccacgcgagcctgaccagagcgcagggccgagcacatgctgatgcgctgccccgggacgggg
ccttctcgtggtgcggaacgcaatgagcccaactcctacgccatctccttccggtgagggggcgccctgggacccccgggggtgggtg
ccagcagcctggtcccagctgtcctgacctgtgtgactgctgt**gtctctgtcaagggctgagg**gcaagatcaagcattgcccgt
gtccagcagggggccagactgtgatgctgggcaactcggagtttgacagcctcgtggatcttgtcagctactatgagaagcacc
cgctgtaccgcaagatgaagctgcgctatccccatcaacgaggaggcattggagaagatcggcacagctgtgaggacctggtggct
gggggcagtggtgggggggggggtgcctggcagggccgagagacctgtgtggctcctccagaaattctcaggcttctgcccgggc
aggggtgcacctaaaggtccttgggtgattggatggatgcagtgagaggccagggcatttcagcagctgtgggagggctagct
cgcccagctgggggcacacaggtgcccaggggtgtccagggagg**agtggctctctgggtgggtgctc**acaggacagggcatgagtta
ggagtgaag**aggtggagacaggcattcag**ttagagtgtccacagtgggcgggtagggaggtcttcacactctcacagggagagc
ccagggccggggagcacaggtccacgcagagatgtggctgagggcgggcagagccccagtggaagaccactgaggaaagaaggcag
ggtcgtggccacggggagaaggcagggcgtccagagtgaggaggtatgtccactggagactctg
gtccgagtgggcccaggtggccaacaaggccacggagagggctgcccggcctggggctggggagg**tgataggtgtgtgctgggag**
cacttgggggtggcgggtgggggtcctggcgcctgcatggctatgcccgtgcccctgcctgcagggcaggtcttcaggagctgggct
gtgggctgggcagtgaggtgagaatgtggaaagaggggctgaggcgtgaggttggggcagcccagtgaccaggtgtcagcgggtg
ggggcggactcgacgggtctcgtgaggaagccagcttctcctcgtgggtgttaatgtcctctgtcctgtcttccaggagcc
tgactacggggccctgtatgagggccgcaacctggcttctacgtggagggcaacctatgcccactttcaaggtacagcctagt
gctctgggcacaggaagctggggagggctcccagctgctcggggattgcatttctctgctcagggccgcctgtggcttttggga
gaagtgggttttgggttttccgaggcctgagcgggtggtagaggtatgcggttgatgcgcaaccgcagctctcccagggctgac
ccctcccaggccttgtccctgggggtcagccctgactcttcccgactgcccctgggggtgagcccccttctcctcct

PRIMER	Product	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
PLCG_F2	494 pb	103	20	59.99	60.00	3.00	1.00	GTCTCTGTCAAGGGCTGAGG
PLCG_R2		596	20	60.26	55.00	2.00	0.00	CTGAATGCCTGTCTCCACCT
PLCG_F3	357 pb	200	20	60.01	60.00	2.00	1.00	AGTGGTCTCTGGGTGGGTGTC
PLCG_R3		556	20	59.70	55.00	2.00	1.00	CTCCAGCACACACCTATCA

Box16: Sequenza parziale del gene CAPNS1 e disegno dei primer

CAPNS1 (GenBank:AJ410870.2)

agagatgctcattcaggtggaatcctgagaacaattgatctctcagtagtggggaccccatgaccaaccacttccggcccaa
accagctcagctgcctcgccaatcccacccccggccccaccacattccacacctgcccgttcaaaggccccctgggagttcactg
ctgccaatggctccctgaacggtcaacatcgaaactgtttgtatatggcctgtggggacaagagcaggggttcggctgagcctcgggg
ggcatggcctctccatggcttggggggctttgtgctttgagtttcagaggccgcacacacctgccactttttgatgttgttccac
aagtacttgaattcctcgaagcccagcttgccgggtgtgtcactctggcaggaggggtgtaagaatacctgtaccagatgtgcg
ctgtataccgtgtctgtgatgataataacagccaagcaggggaacctgggctaaaatcctagtgccctgtctcatcctagtcagt
cac**cttgggtgtggcttcattttt**cattttgtccatatttttagtttatattgtaaatgataaggactctctaaatagaaccact
cagggagttccatagtgggcagtggttaacgaacctgcctaggaacctgaggttacgggttcgatccctagccttgctcagt
gggttaaggatctggcattgccatgagctgtggtgtaggtcacagacatggctcggatcctgcattgctatggctatgggtgtagg
ccggcggctacaacccccgattagaccctagcctaggaacctccatgtgccatgggtgtggccctagaaaagacaaaaaaacaaa
aaaaaaccataaccactcagaattcctcatgtataaaat**cttcaaggagtcccggtt**gtggctcagcagtaataaacacaact
agtatccgtgaggattcggatttgatcgctggccttactcgggtgggttaagaatctggcattgccatgagctgtggtgaaggctg
aaga**tatggcttggatcccatggtt**gccgtggcgtagggccagcagctgtaactccaattcgaccctagcctgggaacttccatat
gccacagatgcagccctaaacagcaaaaaaaaaaaggaaggaaggaatcccatcttcaccaaggcctccccagactgcctca
aggatacatccatcacagccaccatgcttcgacatgtgtcaatgcaaaaccatcagctcttcagatcagggctctgtggggaacag
gttgaaaatcagaggtcagagatcacagctgccccagccaccatgccctaagcctgccccatgtgttgacgccggacactcacg
tcgggtcacgaccttgttgagaatgttcatgagttccgtgg**cactgacctccatgtcctga**ggggaaaagttaggaatgggtcgg
ggtagctggaaggggtctgtgctgtcatgagggaggatgggaacttgaggattgtacacgtaaagggcagcccaagggaaggca
ccggaggat

PRIMER	Product	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
CAPNS1_F1	397 pb	514	20	59.97	45.00	2.00	0.00	CTTGGGTGTGGCTTCATTTT
CAPNS1_R1		910	20	60.22	50.00	5.00	3.00	CAACGGGAACTCCTTGAAGA
CAPNS1_F2	397 pb	1025	20	60.16	45.00	6.00	0.00	TATGGCTTGGATCCCATGTT
CAPNS1_R2		1421	20	59.66	55.00	4.00	3.00	TCAGGACATGGAGGTCAGTG

Box17: Sequenza parziale del gene CRADD e disegno dei primer

CRADD (chromosome - Sscrofa9:5:84220360:84221111:1)

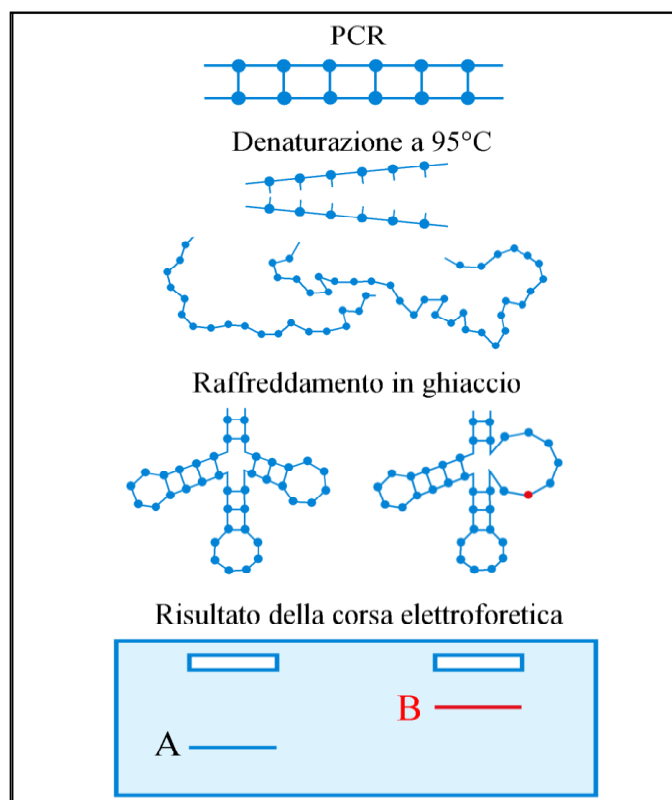
ggcttaacagctgcgtatgaaacaccgtggcctggcactctgctaattttcagagacgctccttgaccttaaggagtttgattgt
aagagccttttttaggggctcatcaggcatcccgtgatctgagctaccttttgtcttttcccaggggcacatggaggctagagaca
agcaagtccttcgctcccttcgctggagctgggtgcagaggtgctggttag**aggggctggttctccagtat**ctttaccaggaagg
gatcttgacggaaaaccacggtcaagaaattaaagctcaagctacaggccttcggaaaacaatgctgctgctggatacctacct
tccaggggtcctaaagcattcogatgtattcctagattccctgcaggaattcccttgggtaagggagaagctggagaaggcaagag
aagaagccatagttgagctgcctgcaggtaggcctcaaaatgatccctccagaccagctcccaaagtgttgaattgtgccctt
ggatgtgaagttggggttttaggctgccttggcgttggcctgtcctgaaaatgggtacgg**agtttgctgaaggcacct**ggcgt
tgggtgggaccagatgaggaggtggagctaggacgtgcagcgggggaaggcgcaatgggcatggctgggaggggtgaggcgggaac
gcagcggatagtttagaaatgcttccagggaaagtggcaggtcccttgggagcatggttctcctctgagag

PRIMER	Product	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
CRADD_F1	369 pb	222	20	59.96	55.00	4.00	2.00	AGGGGCTGGTTCTCCAGTAT
CRADD_R1		590	20	59.91	50.00	4.00	1.00	AGGTGCCTTCAGCACAAACT

Analisi molecolare mediante la tecnica PCR-SSCP

Una delle metodiche molecolari che permette di identificare singole mutazioni dell'intero DNA è la PCR-SSCP, ovvero Single Strand Conformational Polymorphism. Questa tecnica permette di evidenziare fino all'80% delle mutazioni puntiformi del tratto di DNA in esame. Le mutazioni dovute a sostituzione nucleotidica provocano un polimorfismo della conformazione che il singolo filamento di DNA assume quando la doppia elica è sottoposta a denaturazione e che è determinato da un differente appaiamento intramolecolare delle basi. A questa diversa conformazione coincide una differente velocità di migrazione durante la corsa elettroforetica (figura 21), in funzione della dimensione del frammento, della sua sequenza, e delle interazioni con il gel impiegato per la corsa (Walker e Rapley, 2005).

Figura 21: Rappresentazione schematica della tecnica PCR-SSCP



La corsa elettroforetica è preceduta dall'amplificazione mediante PCR del frammento d'interesse e dalla sua denaturazione. Nel caso specifico del presente studio la reazione è stata effettuata in un volume di 50 μ l, contenente 20 ng/ μ l di DNA, 0,2 μ l di ogni primer, 0,25 μ l di Taq (Promega), 10 μ l di buffer, 1 μ l di dNTPs, 3 μ l di MgCl₂. L'amplificazione è avvenuta mediante denaturazione iniziale a 95°C per 2 minuti, seguita da 37 cicli composti da denaturazione a 95°C per 1 minuto,

annealing a 57°C per 1 minuto e allungamento a 72°C per 1 minuto, con allungamento finale a 72°C per 7 minuti.

Per il controllo dei prodotti di PCR ci si è avvalsi di un gel di agarosio al 2% nel quale sono stati caricati 5 µl di amplificato con 1 µl di 6X Loading Dye Solution (Fermentas, Vilnius, Lituania). È stato fatto correre in contemporanea un marcatore di peso molecolare (Fermentas GeneRuler™ 50pb DNA Ladder, Fermentas) per verificare le dimensioni del frammento.

Le matrici utilizzabili per la corsa SSCP sono a base di agarosio o poliacrilammide, ma si preferisce usare quest'ultima per il maggiore potere discriminante e la migliore risoluzione. La miscela per l'ottenimento del gel di poliacrilammide è costituita da acrilammide, bisacrilammide e glicerolo in percentuali variabili a seconda delle caratteristiche del frammento. Il glicerolo serve per far acquisire alla singola elica la conformazione ideale per la corsa elettroforetica. Nelle applicazioni utilizzate e messe a punto nel corso della presente tesi la concentrazione di glicerolo variava dall'1 al 2%, e quella di acrilammide/bisacrilammide dal 10 % al 12% con un rapporto bisacrilammide:acrilammide 1:37,5 o 1:29. Il tampone di corsa impiegato, utilizzato anche nella preparazione del gel è stato il TBE 0,5X. La soluzione di bisacrilammide:acrilammide, glicerolo e TBE viene quindi degasata, e ad essa vengono aggiunti TEMED e APS, che catalizzano la polimerizzazione.

La miscela è stata quindi colata tra due vetri, che fungono da stampo e da supporto per la corsa. A tal scopo tra i bordi dei due vetri vengono posti dei distanziatori, e la fuoriuscita del gel dal fondo viene evitata mediante l'uso di colla a caldo.

Dopo aver riempito con la miscela lo spazio tra i due vetri, sul lato superiore va infilato un pettine, che serve a definire i pozzetti per il caricamento. La polimerizzazione richiede circa 60-90 minuti, a temperatura ambiente. A polimerizzazione avvenuta, il pettine va rimosso, e il gel collocato nella camera per l'elettroforesi verticale. L'apparecchiatura utilizzata è stata il Penguin Dual Gel Water-Cooled Electrophoresis System (OWL Scientific Inc., Woburn, MA). Prima di essere caricati, i prodotti di PCR vengono denaturati. Per tutti i protocolli, a 6 µl di prodotto di PCR sono stati aggiunti 8 µl di soluzione denaturante composta allo 0,05% di xilenecianolo, 0,05% di bromofenolo blu e 5,5 mM EDTA a pH 8 in formamide deionizzata. La miscela viene denaturata per 8 minuti a 95°C e repentinamente messa in ghiaccio per evitare la rinaturazione. La durata della corsa, la temperatura a cui questa viene effettuata e il voltaggio variano a seconda del frammento in esame. Finita la corsa è necessario effettuare una colorazione che renda visibili le bande: quella argentea (Bassam et al., 1991) è stata scelta in virtù della sua sensibilità. I due vetri vengono quindi separati, e il gel viene immerso in una soluzione, composta da acido acetico al 15% ed etanolo al 10%, per fissare le bande. Il gel rimane nella soluzione per 30 minuti, in leggera agitazione. A questa fase

seguono tre lavaggi con acqua distillata per 5 minuti ciascuno. Per la colorazione vera e propria è stata usata una soluzione allo 0,1% di nitrato d'argento e 0,15% di formaldeide. Durante i 30 minuti necessari alla colorazione le vaschette del gel sono tenute al buio. Al termine il gel viene immerso nella miscela di sviluppo, contenente il 4,5% di carbonato di sodio e lo 0,15% di formaldeide, e 20 mg di tiosolfato. La miscela di sviluppo determina la comparsa delle bande, e il processo viene poi bloccato con una soluzione di EDTA 0,09M. Dopo conservazione in frigo per 20 minuti i gel possono essere sigillati utilizzando pellicole trasparenti e archiviati.

Sono state quindi effettuate numerose prove di PCR-SSCP per ciascun gene candidato, mettendo a punto gli esperimenti in base ai risultati osservati dopo ciascuna corsa.

Sequenziamento

I campioni che apparivano polimorfici nell'analisi PCR-SSCP sono stati inviati ad una ditta esterna, la Primm (Milano, Italia), dove sono stati sottoposti a sequenziamento.

Analisi Statistiche e bionformatiche

Analisi delle sequenze

Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il software BioEdit (Hall T. A., 1999) dotato di un'interfaccia user-friendly. Può essere utilizzato per visualizzare elettroferogrammi e sequenze nucleotidiche e proteiche e per effettuare allineamenti di sequenze.

Tipizzazione dei polimorfismi identificati

Per la genotipizzazione dello SNP individuato nel gene PIK3R2 nella popolazione costituita dai 231 suini sopra descritti, i campioni di DNA estratto da questi animali secondo le procedure sopra descritte sono stati mandati a sequenziare alla ditta Primm (Milano, Italia).

Nell'ambito di una collaborazione scientifica all'interno del Progetto di Ricerca SELMOL finanziato dal MIPAAF, questo stesso SNP insieme a due SNP identificati nel gene CRADD e a due SNP identificati nel gene PTPRD sono stati inviati a due diversi gruppi di ricerca, uno afferente all'Università di Bologna, l'altro all'Università di Udine, per la genotipizzazione degli stessi in popolazioni differenti, appartenenti alle razze italiane Large White, Landrace e Duroc, i cui animali sono stati selezionati in collaborazione con ANAS, in quanto presentano valori estremi di EBV (Estimated Breeding Value) per caratteri legati alla qualità della carne.

Per la genotipizzazione, questi gruppi di ricerca hanno utilizzato due differenti tecnologie, l'Illumina GoldenGate e la tecnologia KASPar, realizzate in *outsourcing* rispettivamente dalla ditta Kos Genetic (Milano, Italia) e KBioscience (Herts, UK).

Studi di associazione polimorfismo-fenotipo

Per quanto riguarda lo SNP individuato nel gene PIK3R2, è stata fatta una prova sui 231 campioni in esame analizzando le misurazioni fenotipiche effettuate. Sono stati valutati 180 animali figli di 6 verri, escludendo quegli animali che presentavano risultati assenti o incerti in SSCP. L'effetto del genotipo al locus PIK3R2 (CC, CT, TT) è stato valutato statisticamente mediante la procedura GLM del SAS (SAS 9.1, SAS Institute, 1999). Il modello includeva, oltre allo SNP in esame, l'effetto del verro. Come variabile dipendente, sono state considerate la misurazione fenotipica degli 8 caratteri analizzati e le prime 4 componenti principali (Prin1, Prin2, Prin3 e Prin4) ottenute analizzando gli 8 caratteri mediante la procedura PRINCOMP dello stesso pacchetto statistico.

Per l'analisi di associazione dei polimorfismi con gli EBV, è stato utilizzato anche in questo caso il software SAS/STAT che fornisce vaste possibilità statistiche con gli strumenti per tutti i bisogni analitici. Le procedure pronte per l'uso ricoprono una vasta gamma di analisi statistiche, incluse le analisi della varianza e della regressione, l'analisi dei dati di categoria, l'analisi multivariata, l'analisi di sopravvivenza, l'analisi psicometrica, l'analisi dei cluster e l'analisi non parametrica. Oltre al software SAS, dal gruppo di ricerca di Udine è stato utilizzato anche il software statistico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Si tratta di un software user-friendly che sfrutta un'interfaccia grafica per renderne più semplice ed immediato l'utilizzo. Anche questo software, come SAS, permette di svolgere numerose operazioni: analisi descrittive (frequenze, tavole di contingenza), statistiche bivariate (confronto tra medie, t-test, ANOVA, test non parametrici), predizioni per risultati numerici e raggruppamenti significativi (analisi fattoriale, analisi di cluster).

ANALISI GENOMICA DELLA SPECIE SUINA

Campionamento

La popolazione presa in considerazione nel nostro studio è costituita da 376 soggetti che presentano frequentemente alcuni caratteri tipici della razza originale Garlasco citati nell'indagine di Raimondi (Raimondi R., 1951), quali mantello costituito da setole ispide di colore nero, tendenti al rossiccio a livello della regione ventrale e della mammella; regione della fronte e del naso, compreso il labbro inferiore, caratterizzate da peli bianchi, balzane bianche estese sia agli arti anteriori che posteriori e unghie bianchi-giallastri. I 376 soggetti, nati fra il 2003 ed il 2009, comprendono l'intera popolazione costituita per realizzare il recupero della razza al febbraio 2009.

Preparazione degli acidi nucleici per le analisi

Estrazione del DNA

È stato estratto il DNA da sangue e seme da un campione di 96 soggetti rappresentativo della popolazione, fra cui giovani animali rappresentativi delle differenti nidiate, uno dei verri fondatori di cui era stato conservato il materiale seminale e tutte le madri presenti in allevamento fra l'anno 2007 e il 2009. Per i campioni di sangue il DNA è stato estratto partendo da 200 µl di sangue utilizzando il Kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma- Aldrich), risospeso in H₂O bidistillata e stoccato in provette Eppendorf da 2 mL, mentre per il DNA da seme è stato usato il Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Milano, Italia).

Analisi Spettrofotometrica

La qualità e la quantità di DNA ottenute sono state valutate utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop, utilizzando le stesse modalità descritte nella precedente sezione "Preparazione degli acidi nucleici".

Analisi Molecolari

L'analisi genomica è stata effettuata in outsourcing presso Geneseek (Neogen Corporation, USA) utilizzando il *PorcineSNP60 BeadChip* Illumina, descritto nella sezione "SNP discovery: tecnologie di sequenziamento massivo dei genomi" di questa tesi.

Analisi Statistiche e bionformatiche

I dati ottenuti dalla genotipizzazione dei 96 campioni sono poi stati analizzati utilizzando il software GenABEL (Yuri et al., 2007), libreria di R utilizzata per studi di associazione. GenABEL è in grado di immagazzinare e gestire centinaia di migliaia di dati. Effettua procedure standard di statistica, rapide procedure di analisi sulla qualità dei dati e test di associazione di SNP con caratteri quantitativi. Fornisce inoltre una visualizzazione grafica dei risultati che viene implementata in base R utilizzando altre librerie del software per l'analisi genetica.

RISULTATI

Ricerca e Validazione di SNP in geni candidati per la qualità della carne suina

Scelta dei geni per l'analisi sperimentale

Il presente lavoro ha preso avvio dai risultati ottenuti da una ricerca precedente, basata sullo studio dell'espressione genica differenziale di una popolazione costituita da 100 suini italiani di razza Large White e Landrace, effettuata allo scopo di identificare geni candidati per la qualità della carne. Per ogni animale erano state valutate le seguenti caratteristiche: compattezza delle masse muscolari, grasso intramuscolare visibile, colorazione diversa tra i fasci muscolari, copertura adiposa, colore complessivo dei fasci, spessore del lardo dorsale, spessore della coscia. Lo spessore del lardo dorsale di ogni soggetto era stato rilevato durante le operazioni di macellazione, mentre le altre caratteristiche erano state rilevate il giorno successivo, durante la fase di rifilatura delle cosce, attraverso una scheda di valutazione appositamente predisposta al fine di definire l'attitudine alla trasformazione delle varie cosce in prosciutto crudo. Per decidere quali soggetti dovessero far parte della successiva analisi sperimentale, era stata applicata l'analisi delle componenti principali (PCA), al fine di riassumere le informazioni fornite dalle numerose variabili in nuove variabili sintetiche più idonee alla descrizione delle qualità della carne. In questo modo era stato creato un "indice pesato" (chiamato indice "qualità della carne") in cui la prima componente spiegava il 90% della variabilità e la seconda il rimanente 10%. Questi indici erano poi stati sortati e messi in ordine crescente per identificare i soggetti che presentavano fenotipi estremi (migliori o peggiori) per questo nuovo indice "qualità della carne". Al termine di questa analisi erano stati scelti i primi sei soggetti con il punteggio più basso, individuabili nella coda negativa della curva ottenuta, e i primi sei soggetti con il punteggio più alto, individuabili nella coda positiva della curva ottenuta.

Lo studio dell'espressione differenziale tra questi due gruppi di animali era stato svolto mediante l'impiego della tecnologia microarray, utilizzando una piattaforma microarray contenente più di 10.000 sequenze EST (Expressed Sequence Tags) suine. Dal confronto dell'espressione genica tra i due pool di animali considerati (pool costituito dai sei soggetti della coda positiva e pool costituito dai sei soggetti della coda negativa) 437 sequenze erano risultate differenzialmente espresse. Queste sequenze geniche appartengono a 73 categorie funzionali diverse, 10 delle quali possono avere un'influenza sulla qualità della carne. In particolare, sette sequenze appartenenti a queste categorie funzionali sono coinvolte nell'accrescimento muscolare e quindi sono state considerate, dopo validazione mediante Real Time PCR, come geni candidati per la qualità della carne, in cui ricercare SNP. I sette geni così identificati sono descritti in tabella 18. Nel corso della precedente ricerca sei di questi geni erano anche stati localizzati sui cromosomi suini (Iacuaniello et al., 2008), dove sono risultati mappare nella stessa posizione di QTL noti per la qualità della carne.

Tabella 18: Geni candidati per la qualità della carne suina

Gene	Unigene	Descrizione	Categoria funzionale	Cromosoma
INPP1	NM_002194	Inositol polyphosphate-1-phosphatase	Controllo del metabolismo	15q23
PIK3R2	NM_005027	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2	Sistema dell'insulina	2q21
PTPRD	NM_130393	Protein tyrosine phosphatase	Crescita corporea	1*
CRADD	NM_003805	Casp2 and ripk1 domain containing	Crescita corporea	5q25
CAPNS1	NM_001749	Calpain, small subunit 1	Crescita del muscolo	6q24
CDKN1C	NM_00007	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 C	Crescita corporea	2p17
PLCG1	NM_182811	Phospholipase C, Gamma 1	Crescita del muscolo	17q11-14

*la corretta localizzazione non è ancora disponibile

I sette geni candidati per la qualità della carne costituiscono quindi il punto di partenza per il presente studio, volto all'identificazione di polimorfismi informativi.

Scelta dei campioni per l'analisi sperimentale

Per il presente studio sono stati raccolti al momento della macellazione campioni di muscolo da una popolazione di 240 suini italiani ibridi Large White x Landrace, allevati in condizioni omogenee. Da questi soggetti, al momento della macellazione, è stato prelevato il muscolo scheletrico e conservato in RNA later (Ambion) a -20°C. Inoltre, di questi suini sono stati rilevati, alla macellazione e al momento della rifilatura, caratteri fenotipici inerenti la qualità delle cosce. I caratteri fenotipici valutati sono stati:

- spessore del lardo dorsale (misurato in mm),
- peso della coscia rifilata (misurato in kg),
- compattezza delle masse muscolari (assegnato un punteggio da 1, ottimo, a 5, insufficiente),
- difformità di colorazione (assegnato un punteggio 1-5),
- marezzatura (assegnato un punteggio 1-5),
- rete venosa (assegnato un punteggio 1-5),
- copertura in corona (assegnato un punteggio 1-5),
- spessore lardo sottonoce (misurato in mm).

Alcuni fenotipi sono stati analizzati attraverso dei giudizi espressi sulla base di valutazioni specifiche operate attraverso una scala di punteggi lineari da 1 a 5: 1 (ottimo), 2 (buono), 3 (medio), 4 (scarso), 5 (insufficiente), in maniera tale da poter essere utilizzati nelle successive fasi di elaborazione statistica dei fenotipi. Lo spessore del lardo dorsale è invece stato misurato in

millimetri, mentre il peso della coscia rifilata è espresso in kg. È stata poi effettuata una valutazione finale mediante l'assegnazione di un punteggio più articolato, da 1 (ottimo) a 6 (insufficiente).

Strategia di scelta dei campioni

Per la presente ricerca di SNP informativi in geni candidati per la qualità della carne suina, si è deciso di studiare individui estremi nella distribuzione di tre caratteri: la prima componente principale o PRIN1 (ottenuta da una analisi multivariata dei fenotipi sopra indicati, descritta in Materiali e Metodi), lo spessore del lardo e la compattezza delle masse muscolari. Questi ultimi due sono caratteri ben definiti dal punto di vista biologico.

Delle otto componenti principali analizzate, le prime due spiegano circa il 55% della variabilità osservata. La PRIN1, che spiega circa il 35% della variabilità totale, è risultata la più rappresentativa per la qualità della carne, come mostrato in tabella 19.

Tabella 19: autovalori della matrice dei coefficienti di correlazione

Componenti	Autovalori	Differenza	Proporzione	Cumulativa
1	2,7928	1,2060	0,3491	0,3491
2	1,5868	0,6492	0,1984	0,5475
3	0,9376	0,0604	0,1172	0,6647
4	0,8772	0,1876	0,1097	0,7743
5	0,6896	0,1354	0,0862	0,8605
6	0,5542	0,1165	0,0693	0,9298
7	0,4377	0,3137	0,0547	0,9845
8	0,1240		0,0155	1

Inoltre, come mostrato nella tabella 20, la PRIN1 essa mostra una distribuzione ottimale dei fenotipi che riguardano il grasso, ovvero copertura adiposa, spessore in differenti parti del corpo e livello di marezatura.

Tabella 20: Risultati della PRIN1 nei fenotipi studiati per la qualità della carne

	Prin1
Copertura adiposa	0,5432
Spessore grasso sottoce	0,5371
Spessore lardo dorsale	0,4134
Marezatura	0,2203
Peso della coscia	-0,031
Rete venosa	-0,105
Difformità di colorazione	-0,231
Compattezza	-0,363

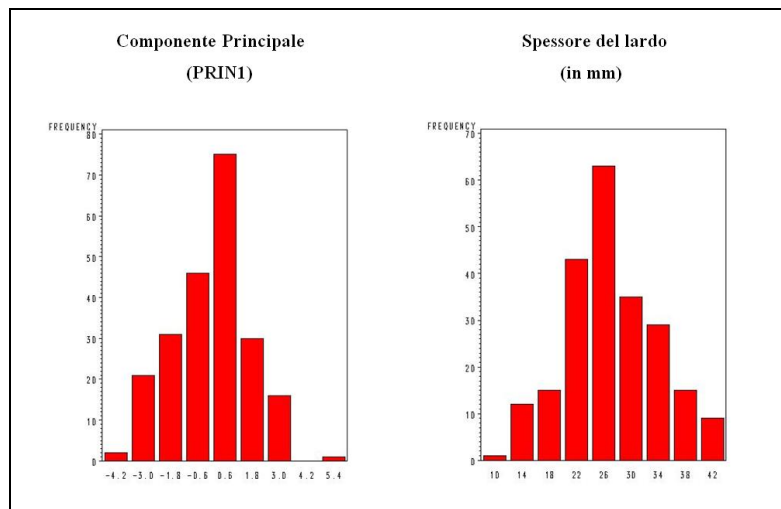
Infine, come mostrato in tabella 21, la PRIN1, così come lo spessore del lardo e la compattezza, ovvero i tre caratteri scelti per l'individuazione degli individui che si collocavano nelle code estreme per i differenti fenotipi, mostrano una buona correlazione con la valutazione finale.

Tabella 21: Correlazione tra i caratteri scelti nell'analisi e la valutazione finale

	prin1	spessore lardo	compattezza	Valutazione finale
prin1	1	0,90	-0,61	-0,64
spessore lardo		1,00	-0,38	-0,56
compattezza			1,00	0,42
Valutazione finale				1,00
media	0,00	26,90	1,63	4,21
DS	1,67	6,67	0,77	1,08
CV		0,25	0,47	0,26

Nella figura 22 è riportata la distribuzione dei 231 animali per quanto riguarda i caratteri PRIN1 e spessore del grasso sottanoce (misurato in mm).

Figura 22: Distribuzione della popolazione in relazione a PRIN1 e spessore del lardo



Questi caratteri sono risultati fortemente correlati fra loro: infatti, quando si è dovuto selezionare i dodici individui estremi per ogni carattere considerato (6 appartenenti alla coda positiva e 6 appartenenti a quella negativa) si è notato come, a causa probabilmente delle forti correlazioni che legano questi caratteri, il numero finale di animali da analizzare è risultato essere costituito da 22 soggetti, anziché i 36 attesi (i 6 migliori per ciascuno dei tre caratteri e per le due code), in quanto gli stessi animali si ritrovano agli estremi delle curve di distribuzione di più caratteri. In particolare, i 22 animali estremi sono costituiti da 8 soggetti appartenenti alla coda positiva e 14 a quella negativa.

Nella tabella 22 sono mostrate le valutazioni riportate per PRIN1, spessore del lardo e compattezza degli 8 animali selezionati nelle code positive della distribuzione dei tre caratteri, mentre nella tabella 23 le valutazioni relative ai 14 animali selezionati appartenenti alle code negative. Nelle tabelle, per ciascun carattere sono riportate solo le valutazioni degli animali selezionati come migliori o peggiori.

Tabella 22: Valutazione ottenuta dagli animali delle code positive per i tre caratteri considerati

ID Animale	Prima Componente	Spessore del lardo	Compattezza
226	5,251	42,5	1
129	3,581	40,0	1
91		42,5	1
86		42,5	1
81	3,521	40,0	1
79	3,493	42,5	1
44	3,165		1
41	3,266		1

Tabella 23: Valutazione ottenuta dagli animali delle code negative per i tre caratteri considerati

ID Animale	Prima Componente	Spessore del lardo	Compattezza
275	-4,543	12,5	3,5
257			3,5
164	-3,402		3,5
119			3,5
115			3,5
274	-3,116		
272	-4,553	9	
225		15,0	
175		15,0	
249			4
224		15,0	
219	-3,278	15,0	
170	-3,072	15,0	
167			4

Estrazione di RNA totale dai campioni di tessuto muscolare

Quando è iniziato il presente lavoro, a causa dell'assenza di una sequenza completa del genoma suino, i nostri studi si sono concentrati sull'analisi della sequenza di mRNA dei geni oggetto dell'indagine. Pertanto, a partire dal tessuto muscolare campionato da ognuno dei 22 animali è stato estratto l'RNA e retroscritto in cDNA. Qualità e quantità dei cDNA ottenuti sono state valutate mediante analisi spettrofotometriche. Nella tabella 24 sono mostrate le quantificazioni effettuate.

Tabella 24: Risultati delle analisi allo spettrofotometro NanoDrop del cDNA dei 22 animali

ID Animale	Concentrazione di cDNA (ng/ μ L)	Rapporto 260/280	Rapporto 260/230
41	973,59	1,57	1,89
44	1008,99	1,58	1,87
79	757,85	1,52	1,84
81	1031,26	1,58	1,86
86	942,52	1,55	1,71
91	862,41	1,54	1,88
115	847,28	1,55	1,84
119	833,23	1,53	1,86
129	960,32	1,54	1,87
164	920,38	1,60	1,88
167	929,29	1,52	1,88
170	934,28	1,57	1,84
175	875,35	1,53	1,85
219	1033,85	1,58	1,93
224	1053,25	1,57	1,93
225	862,12	1,53	1,77
226	1056,76	1,53	1,91
249	1131,05	1,58	1,93
257	1132,33	1,57	1,92
272	1062,04	1,58	1,89
274	734,37	1,56	1,81
275	1011,18	1,57	1,90

Dai dati ottenuti si osserva che sono state ricavate buone quantità di cDNA, con valori che variano da 737,37 a 1132,33 ng/ μ L. Inoltre il rapporto 260/280 ha valori tutti compresi fra 1,52 e 1,60, ad indicare una buona qualità dei campioni, anche in termini di standardizzazione degli stessi. Anche i rapporti 260/230, maggiori di 1,8 in 20 dei 22 campioni analizzati, indicano una ridotta contaminazione da fenolo, composti aromatici, peptidi e carboidrati, avvicinandosi al valore ideale e confermando la buona qualità del campione.

Estrazione del DNA

Nel corso della presente ricerca, le informazioni disponibili in banca dati sul genoma suino sono aumentate notevolmente. Si sono quindi potute trovare nuove informazioni sulla struttura e sulla sequenza dei geni studiati in diverse banche dati, principalmente NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ed Ensemble (www.ensembl.org). Sulla base di queste nuove informazioni, è diventato possibile ampliare la ricerca di SNP a tutta la sequenza dei geni candidati.

Si è reso quindi necessario estrarre anche il DNA dai campioni di tessuto degli animali in esame utilizzando due protocolli di estrazione, uno manuale ed uno automatizzato, come già descritto in Materiali e Metodi. Anche in questo caso sono state valutate la qualità e la quantità di DNA estratto

mediante analisi spettrofotometrica (tabella 25). Nonostante i campioni di tessuto muscolare fossero conservati in RNALater, si sono ottenute buone quantità di DNA. La concentrazione del DNA è risultata superiore a 15 ng/μL (in un volume finale di 300 μL) per quasi tutti i campioni, con un buon numero di campioni che superavano anche la concentrazione di 300 ng/μL e con un discreto rapporto 260/280, superiore a 1,35 nella maggior parte dei campioni. Al contrario, il rapporto 260/230 è invece notevolmente inferiore al valore ideale di 1,8-2,2 e al valore osservato nei campioni di cDNA, indice della presenza di contaminanti, dovuta probabilmente alla conservazione dei campioni di muscolo in RNALater. Questa soluzione è in grado di preservare il tessuto dall'azione delle RNAsi, ma a lungo può causare la frammentazione del DNA genomico.

Tabella 25: Risultati delle analisi NanoDrop di un campione rappresentativo della popolazione

ID animale	Concentrazione di DNA (ng/μL)	Rapporto 260/280	Rapporto 260/230
41	318,20	1,39	0,74
44	260,30	1,44	0,70
79	338,18	1,38	0,75
81	192,08	1,55	0,77
86	46,16	1,58	0,52
91	333,17	1,40	0,76
129	63,08	1,56	0,50
164	18,17	1,67	0,26
167	357,02	1,28	0,79
170	334,18	1,38	0,73
175	326,73	1,37	0,72
219	15,45	1,50	0,31
225	20,50	1,96	0,12
226	74,12	1,57	0,63
249	323,15	1,37	0,74
257	14,61	2,19	0,36
274	19,67	2,00	0,44
275	354,30	1,35	0,75

Analisi PCR-SSCP: messa a punto delle metodiche e analisi dei tracciati

Hayashi (1991) ha stimato la sensibilità della metodica PCR-SSCP come probabilità di individuare una mutazione puntiforme, trovando valori del 99% per frammenti da 100 a 300 pb e dell'89% per frammenti da 300 a 450 pb. Ciononostante è necessario, per ogni frammento, ottimizzare alcuni parametri. La migrazione delle singole eliche ed i cambiamenti di conformazione sono, infatti, influenzati da tre fattori legati alla metodica: la composizione del gel di acrilamide, la temperatura durante l'elettroforesi, e la forza ionica del tampone di corsa. La miscela per l'ottenimento del gel di poliacrilammide è costituita da acrilammide, bisacrilammide, e glicerolo in percentuali che vanno

stabilite in funzione delle caratteristiche del frammento. Il glicerolo, ad esempio, aumenta la mobilità di frammenti ricchi di purine a discapito di quelli ricchi in pirimidine tramite l'interazione con i gruppi polari OH o la formazione di nuovi legami idrogeno. Per tutte le corse che hanno mostrato pattern polimorfici, è stata utilizzata una concentrazione di poliacrilammide del 10%, mentre gli altri parametri variavano in base al frammento considerato. Entrando nello specifico, per quanto riguarda il gene PIK3R2, è stata utilizzata poliacrilammide con un rapporto acrilamide:bisacrilamide di 29:1 ed una concentrazione di glicerolo dello 0,5%. La corsa è avvenuta a 12°C per 15 h. Per i frammenti del gene PTPRD si è osservata una corsa ottimale a 5°C per 15 h utilizzando poliacrilammide con un rapporto acrilamide: bisacrilamide di 29:1 ed il glicerolo all'1%. Per i frammenti del gene CRADD, invece, è stata utilizzata poliacrilammide con un rapporto acrilamide:bisacrilamide di 37,5:1 con glicerolo allo 0,5% per 15 h a 5°C.

I campioni che presentavano polimorfismi in SSCP sono stati poi sottoposti a sequenziamento nucleotidico per determinare la mutazione responsabile dei pattern osservati.

Di seguito sono riportati gli studi effettuati per ciascun gene analizzato e i polimorfismi confermati da gli elettroferogrammi ottenuti.

Gene PLCG

All'inizio di questo lavoro, quando ancora erano poche le informazioni disponibili sul genoma suino, sono state effettuate diverse PCR con i primer disegnati sull'mRNA e descritti nella sezione "Materiali e Metodi" di questa tesi. Nonostante fossero state variate le diverse componenti dei gel di poliacrilammide, probabilmente a causa della difficoltà nel lavorare con cDNA piuttosto che con

Figura 23: PCR-SSCP per PLCG



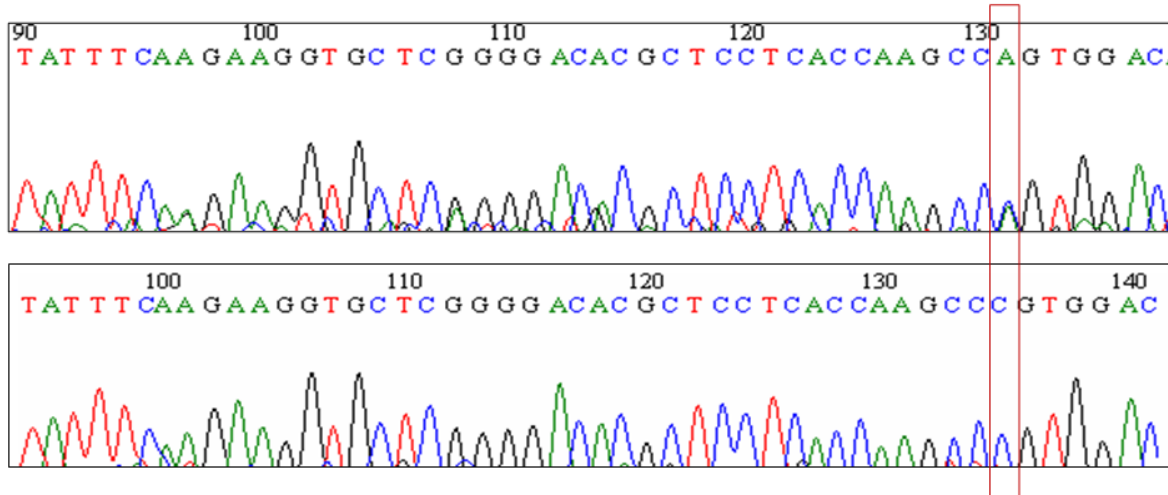
DNA genomico, i risultati delle prove SSCP erano poco interpretabili. Ciononostante, alcuni tra i campioni analizzati che sembravano presentare una diversa migrazione in SSCP (figura 23) sono stati sottoposti a sequenziamento.

Le sequenze ottenute hanno mostrato l'esistenza di un polimorfismo C→A (figura 24) in posizione 13.770 della sequenza suina depositata in banca dati (NC_010459).

In un secondo momento, grazie all'aumento esponenziale delle informazioni presenti nella banca dati Ensembl, è stato possibile individuare il gene PLCG sul cromosoma 17 dalla posizione 45.881.829 alla posizione 45.914.905 della sequenza depositata (ENSSSCG00000007356). Il gene è costituito da 32 esoni. Una nuova coppia di primer PLCG F1/R1 è stata così disegnata sul DNA genomico per amplificare il frammento contenente il

polimorfismo sopra descritto. Il sequenziamento di questo frammento ha confermato l'esistenza del polimorfismo C→A in posizione 13.770 del DNA genomico.

Figura 24: Polimorfismo identificato nel gene PLCG



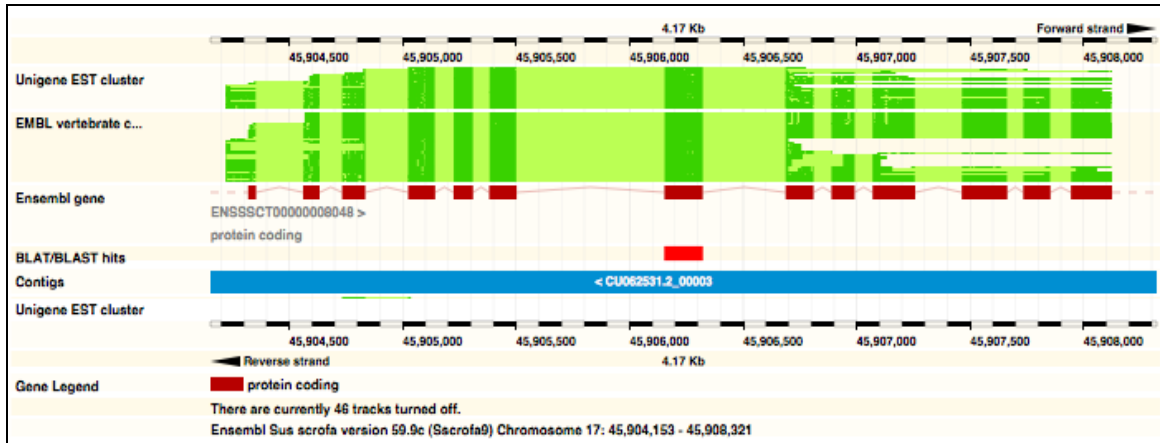
La sequenza del gene PLCG con la localizzazione dello SNP identificato è mostrata nel box19 sottostante. Il polimorfismo indicato è risultatosi trovarsi sull'esone 12 in posizione 45.906.258 della sequenza genomica. In figura 25 è mostrato l'allineamento tra la porzione di DNA contenente lo SNP e il gene.

Box19: Sequenza parziale del gene PLCG con la posizione dello SNP identificato

PLCG (Chromosome:Sscrofa9:17:45.905.909:45.907.108:1)

```
tgggacagcctccgtggttgaccactctggggacgcctggtggccacagtcccagcctttggtttctgctg
caccatagtgctctgtgaaccctcccctcctcctgcggtggcagggcccgcctcttctctggggtggctct
ctgggaaaggacctcagcccctaggctcccagctcgtctcttgggtgaggacgtgagccttgacgctgcagaa
tggcaggtctgtatcccgcactaggtaccgggtcctcctgtccatcgaggaccactgcagcattgccagca
gaggaacatggcccagtatctcaagaagggtgctcggggacacgctcctcaccaagcc[c/a]gtggacatcgcg
gccgacgggctcccctcaccatcagctcaagaggaagatcctcatcaaggtagggtggttctctgctcgt
ggcgagtggtaatgaaccacctaggatccatgaggatgcggttcaatcctggcctcgatcagtggtta
aggatcccgtggtgcccgtgagctgtggtgtaggttgacagacacaacctactgttgttggctgtggtgtagg
ccggcatctgcagccccatttgacccttagcctgggcacctccatgcatgagtggtggcctaaaatagc
aaaaaaaaaaaaaggtagggctgtgtgggtcccacctctgctccggtgtcagctctggcctgggtgaggggt
ggggtctgaggaccaggtggcatgcatgtcccggcctgtcccctgcagcacaagaagctggctgagggca
gtgcgtatgaggaggtgcctacgtctgtgatgtactctgagaacgacatcagcaactccatcaagaacggcat
cctctacctggaggacctgtgaaccacgtgagggctgggcccgggctgggcccggggcaggggtggcgagagg
ctgtctccacaggcctggctcccctctctccaggagtggatccccactactttgttctgaccagcagcaag
atctactactcagaggagaccagcagtgaccagggcaacgaggatgaggaggagcccaggaggtgagggact
ggcccagggccgggggctgggctggggtcagggatgaggtgtctctgcccagcgcctcccctgcaggcga
gcagcagcacagagctgcattccaatgagaagtgg
```

Figura 25: Allineamento tra l'esone contenente lo SNP e la sequenza del gene PLCG



Gene CAPNS1

Anche nel caso del gene CAPNS1, in un primo momento si è lavorato su mRNA, utilizzando per l'amplificazione i primer descritti in "Materiali e Metodi". Mediante analisi PCR-SSCP, pur non riuscendo a identificare chiaramente singole bande, è stato possibile individuare pattern simili di migrazione in diversi gruppi di campioni (figura 26). Presupponendo che la presenza di più bande in ogni pattern non fosse dovuta a polimorfismo genetico, mentre la notevole differenza di migrazione fra questi pattern potesse esserlo, sono stati scelti per il sequenziamento due campioni

Figura 26: PCR-SSCP per CAPNS1



per ognuno dei due pattern più chiaramente definiti.

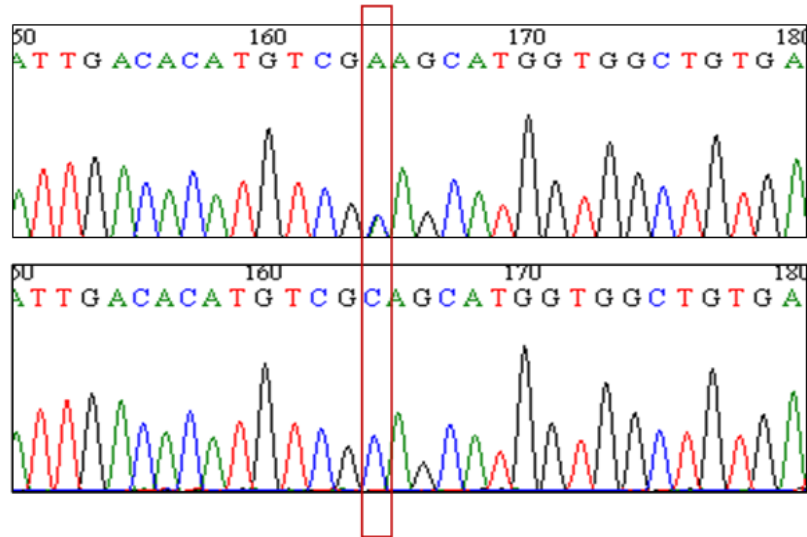
Le sequenze ottenute hanno mostrato un polimorfismo A→C (figura 27) in posizione 519 della sequenza suina depositata in banca dati (NM_214318.1).

Quando sono state disponibili nuove informazioni sul genoma suino nelle diverse banche dati, è stato possibile indagare il gene partendo dal DNA genomico. Tuttavia non è stato possibile trovare la sequenza di CAPNS1 in Ensembl. La sequenza del gene in esame è stata però trovata nella banca dati NCBI (Accession Number: AJ410870.2), depositata unitamente alla sequenza di

altri geni, nello specifico i geni suini COX7A1, CKAP1, POLR2I e CLIPR-59. Analizzando le sequenze depositate, è stato possibile ricostruire che il gene CAPNS1 è costituito da 11 esoni. Sulla sequenza genomica sono stati disegnati nuovi primer per amplificare il frammento contenente il polimorfismo sopra descritto ed evidenziato nel box 20. Il sequenziamento di questo frammento ha

confermato l'esistenza del polimorfismo. L'allineamento delle sequenze ha permesso di localizzarlo nell'esone 6 del gene.

Figura 27: Polimorfismo identificato nel gene CAPNS1



Box 20: Sequenza parziale del gene CAPNS1 con la posizione dello SNP identificato

CAPNS1 (Sus scrofa calpain, small subunit 1, mRNA - NM_214318)

```

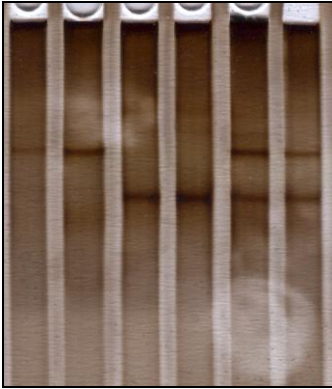
cggaatcttgagtcacagccatgttcctggtaactcgttcctgaagggtggcggcgccggcgggggagg
cgggggcttgggcggggcctagggaatgtgctcggaggcctgatcagcggggccggaggcggcggtgccgc
ggcgggtggcggaggaggcggcggcggtggtggcggaaactgccatgcgcacacctgggcgggggttattagcgcca
tcagtgaggcggctgcgcagtaacaaccccgagcccccgccccctcgcaccattattccaacattgaggccaa
tgagagtgaggaggtccggcagtttcggaggctctttgccagctggctggagatgacatggaggtcagtgcc
acggaactcatgaacattctcaacaaggtcgtgaccgcacacctgatctgaagactgatggttttggcattg
acacatgtcg[a/c]agcatggtggctgtgatggatagtgacacaaccggcaagctgggcttcgaggaattcaa
gtacttgtggaacaacatcaaaaagtggcaggccatatacaaacagttcgatggttgaccgttcagggaccatt
ggcagcagtgaaactcccaggggctttgaaagccgaggattccacctgaatgagcatctctacagcatgatca
tccgacgctactcagatgaggggaggaacatggatthttgacaactttatcagctgcctggtcagactggatgc
catgttccgtgccttcaaatctcttgacaaagatgggtactggacaaatccagggtgaacatccaggagtggtg
cagctgaccatgtattcctgaacgggagccccagacctgccccctcgttcgcctcgtgagggagtcaccttg
gactcttcggtctctcccagggctgatctcatccgcagccacatcttcgtgggttctgtggaccacactcct
tctgttctcccagccggttggcaccagattctcagtcaacagccagagcccaacatgcttcagcacgcctg
ccccgacagtcacccacacccgtgcacca

```

Gene CRADD

In seguito alle analisi PCR-SSCP condotte sul gene CRADD sono stati individuati due frammenti che davano pattern di migrazione riconducibili alla presenza di uno SNP (o più SNP in aplotipo)

Figura 28: PCR-SSCP per CRADD

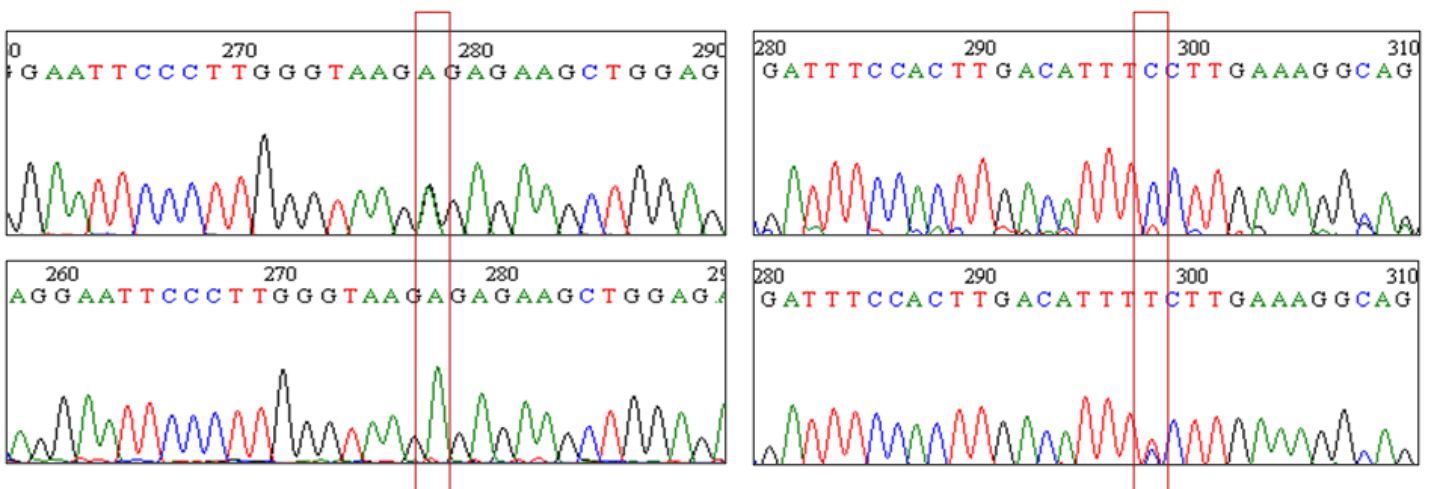


nelle porzioni di gene amplificate. In figura 28 è riportato come esempio il risultato per il frammento amplificato con i primer CRADD F1/R1. Per i due suddetti frammenti sono stati pertanto selezionati due campioni per ciascuno dei pattern osservati, due ritenuti omozigoti per un allele, due omozigoti per l'altro allele e due eterozigoti. Il sequenziamento di questi frammenti ha permesso di identificare un polimorfismo A→G per il frammento amplificato con i primer CRADD F1/R1, ed uno C→T per il frammento amplificato con i primer CRADD F4/R4

(figura 29). Entrambe le coppie di primer erano state disegnate sulla sequenza di mRNA, come descritto in “Materiali e Metodi”. Il successivo allineamento delle sequenze prodotte con quelle disponibili in banca dati ha permesso di collocare lo SNP A→G in posizione 343 e lo SNP C→T in posizione 859 della sequenza presente in NCBI con Accession Number AK232202 (box 21).

Le nuove informazioni disponibili in banca dati collocano il gene CRADD sul cromosoma 5 suino (figura 25), dalla posizione 84.220.514 alla posizione 84.220.882 della sequenza depositata (ENSSSCG00000000911)

Figura 29: Polimorfismi identificati nel gene CRADD



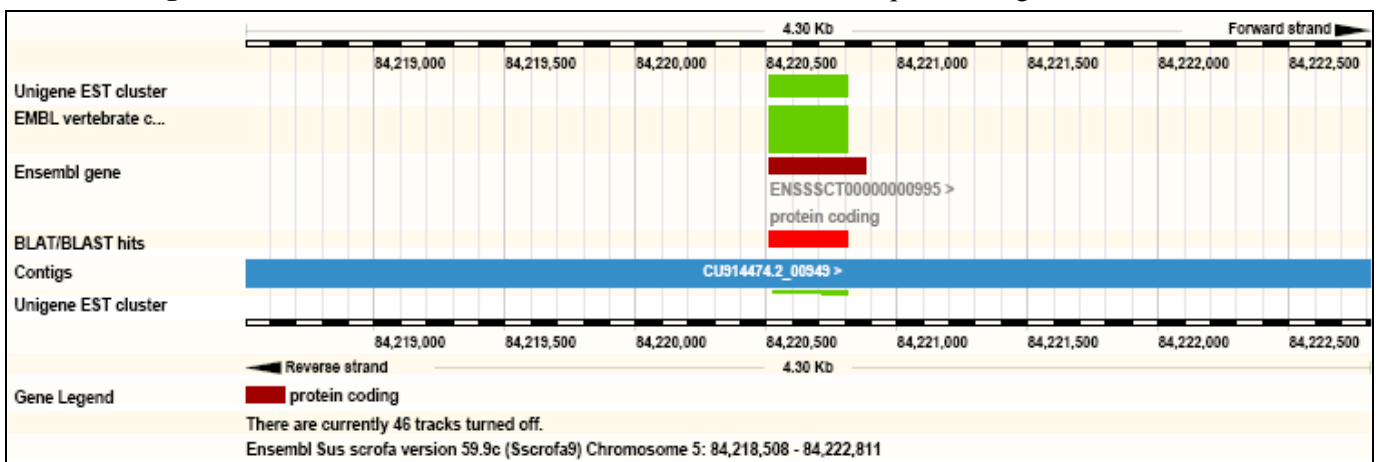
Box 21: Sequenza parziale del gene CAPNS1 con la posizione degli SNP identificati

CRADD (Sus scrofa mRNA, clone: LNG010102H09 - AK232202.1)

```

gatggtgcccacatggtacaggttcctgactgtctggattccggttgagtttggtcagttttggttttaaaga
tacgtggttgacagacgggcacatggaggctagagacaagcaagtccttcgctcccttcgctggagctgggtg
cagaggtgctggttagaggggctggttctccagtatcttaccaggaaggatcctgacggaaaaccacgttca
agaaattaaagctcaagctacaggccttcggaaaacaatgctgctgctggatatcctaccttcaggggctct
aaagcattcgatgtattcctagattccctgcaggaattcccttgggtaag[a/g]gagaagctggagaaggcaa
gagaagaagccatagttgagctgctgcagatgacgcgatggctggaatcccccgcacatcctcaatagctc
cccgctccgaccggcagatcaaccagctggcgcagaggtgggccccgagtgaggagcccgtggtgctgtctctg
ggcctgtccagaccgacatctaccgctgtaaggccaaccacccccacaacgtccagtcaccaggtggtggagg
cctttgtccgctggaggcagcgttcggaagcaggccaccttcagagccttcacaggagcctccaggccat
ggaggtggaccgctctgtgctccagcacatggtggaatgatggtgcaccattaacacccggggcccccgctg
gcatgtgccagatcctcactctcaccggggcaggtagatttggggggatttttttgttgttgttgttgtttt
ttggtcttttttagtgatccttcgataaaaggagataatgcgatttccacttgacattt[c/t]cttgaaaggca
ggatgactgagtaggtttccacactgctgcattgacaattcattgtgtctcattgctcgaggatggcattat
ttgaatcgtgcaggttttaattgtgtggttgcccttcaataaactgattcatcctagtggccccaaaaaaaaa
aaaaaaaaa
    
```

Figura 30: Allineamento tra l'esone contenente lo SNP e la sequenza del gene CRADD



Gene PTPRD

L'analisi mediante PCR-SSCP di questo gene, così come i precedenti, ha rivelato dei frammenti polimorfici con i primer disegnati su mRNA, di cui un esempio è riportato in figura 31. Il successivo sequenziamento ha portato all'identificazione di due diversi polimorfismi, corrispondenti ad una transizione A→G in posizione 29.962 della sequenza presente in NCBI (Accession Number XM_001924678.2) e ad una transversione G→T in posizione 30.194 della stessa sequenza. Dagli allineamenti effettuati appare che la sequenza depositata in banca dati è la

sequenza complementare di quella codificante. In figura 32 è riportato l'elettroferogramma della sequenza codificante per lo SNP [A/G], ovvero T/C.

Figura 31: PCR SSCP per PTPRD



Nella figura 31 è mostrato il diverso pattern di corsa ottenuto mediante PCR-SSCP e dovuto alla presenza di questi SNP. I due polimorfismi sono stati confermati anche mediante amplificazione utilizzando i primer PTPRD F4/R4 disegnati su DNA genomico, come descritto in dettaglio in “Materiali e Metodi”.

Il gene PTPRD si trova sul cromosoma 1 dalla posizione 223.366.793 alla posizione 223.466.962 della sequenza depositata (ENSSSCG00000005195). È costituito da 7 esoni. I polimorfismi identificati si trovano sull'esone 3. In figura 33 è mostrato l'allineamento fra l'esone contenente gli SNP e il gene PTPRD.

Figura 32: Polimorfismo identificato nel gene PTPRD

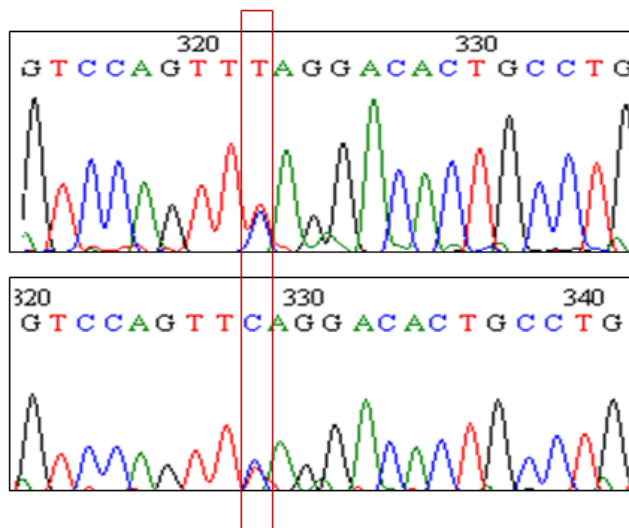
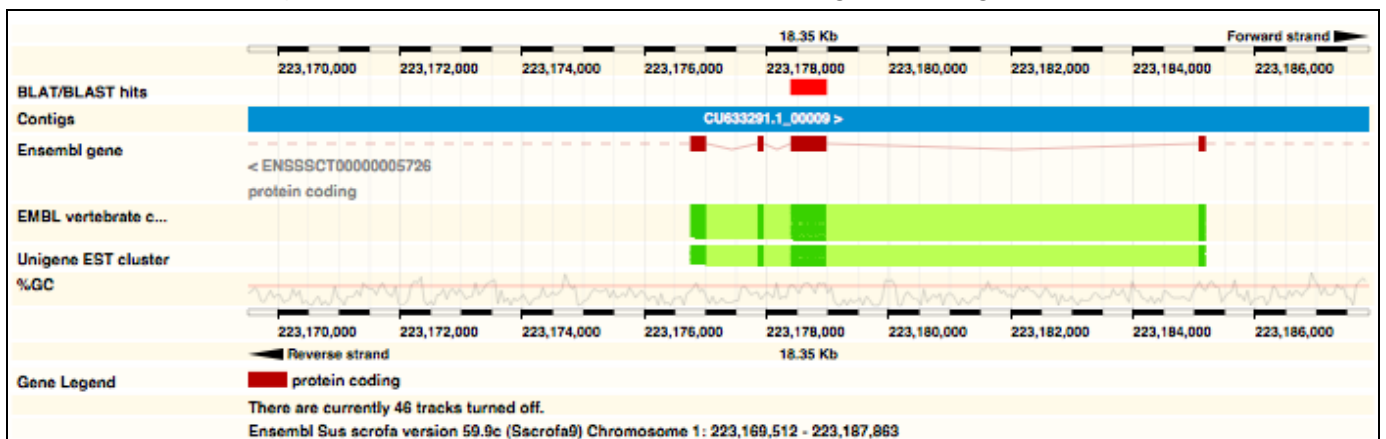


Figura 33: Allineamento tra l'esone contenente gli SNP e il gene PTPRD



Nel box 22 sottostante è mostrata la porzione della sequenza del gene PTPRD contenente gli SNP identificati.

Box 22: Sequenza del gene PTPRD con la posizione degli SNP identificati.

PTPRD (Sus scrofa chromosome 1 clone CH242-39J23, 116.337:117.376 - CU633291.1)

```
aagctagatgccatctactttgatcacagagagaagtgtgctgtgcctacctgttaaagcattcattttatt
acctcatcctcataaagatttctcctttctcctcaattcagtcactatattgtgtttccttacctgagagca
ttgggggtgctgtcagccagacctgcatggcattctataactgaagtctaaggcatccacaatgtatgaagttt
tacatactttaccttttcgctttggctgaacctattaatgaatgggccgatgagttatttatagcttcaa
atactgatttccaaagaccgacattcctttctttaaggagaaaggccgtaagcagacaaatcctaccttgat
ccacagggcagtgtcct[a/g]aactggacactgggactatatggcccgggccctttgcttgtgtgagcacgtac
ttttacatcatatgtggtatctgggtttaagccactgagtgcatagtggtgtcagctggaataataagctgc
tccattggaagaagaggggtgttgataccctatacagaagtgtatacttgggtgataatgccatttctctcgg
ccaagacaggtggctgccaagataactggacg[g/t]aggttgacgtggtgccttctgagtggaggttttgagg
gaagccagttgggacttcttctgggacagaaatctccttcaccatctcctccccgaagcccactttgtttctg
gctgagagcctgaagatatacgatgctcctttgtggatgtcagttgctgtaaagtgatcttctttttcagaga
actccagagtagtgagaggctccatatacctttcggccaaattttagacggtagccctggaggggtccaaatgt
gtccacaggggggtgccactgaatgagagcagtattcatctgagtggttaatcacaagtcgggggtttccct
ggaactggagcacaggggaatggagcagtaagaccaatgtacttggatgtttgcatttcaatcactgctgaatg
ggaccaccacaccaggggcatcc
```

Gene INPP1

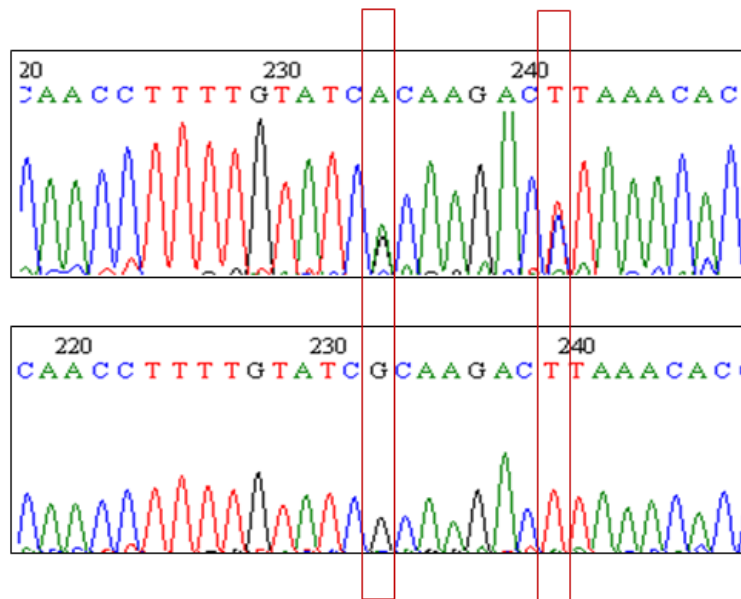
Per la ricerca di polimorfismi in questo gene, sono state effettuate PCR utilizzando le sei coppie di primer disegnate sul DNA genomico descritte nella sezione “Materiali e Metodi” di questa tesi.

Figura 34: PCR-SSCP per INPP1



Differenze nella corsa elettroforetica dopo SSCP (figura 34) sono state ottenute con i frammenti amplificati utilizzando INPP F1/R1 già descritti in precedenza. Dal sequenziamento dei campioni polimorfici, sono state identificate due transizioni poste ad una distanza di sette nucleotidi l'una dall'altra (figura 35): una A→G in posizione 89.579.367 della sequenza depositata in banca dati e una T→C in posizione 89.579.374 (ENSSSCG00000016050), indicati nel box 23.

Figura 35: Polimorfismi identificati nel gene INPP1



Box 23: Sequenza del gene INPP1 contenente gli SNP identificati

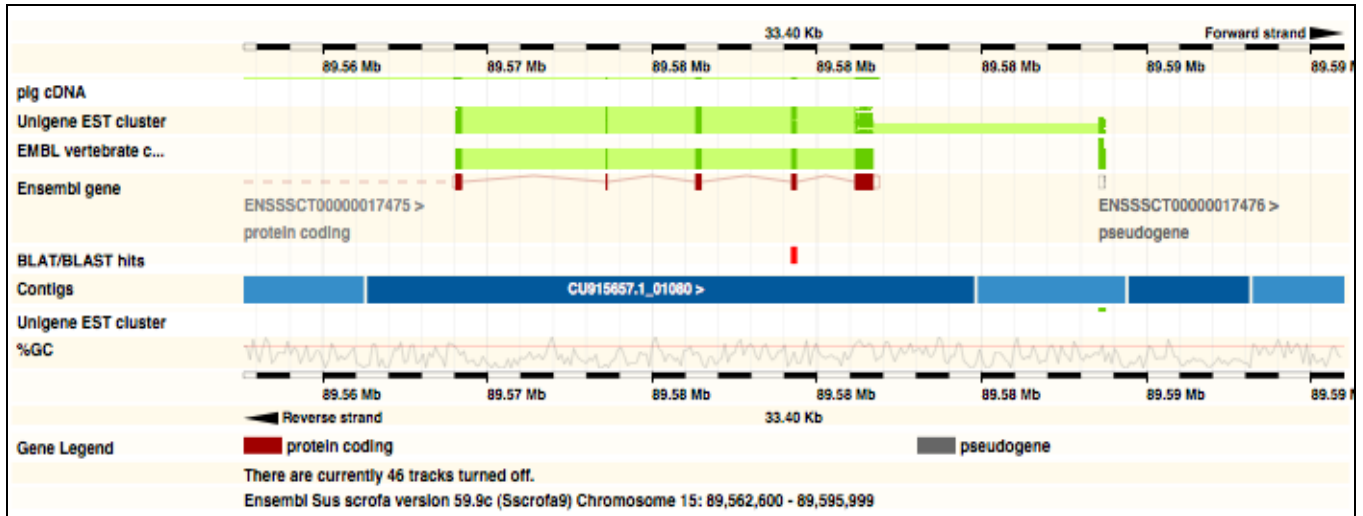
INPP1 (Chromosome: Sscrofa9:15: 89.578.931: 89.579.686:1)

```

ttacttagtgcaagagactaaggctctttctggtgcccttttgtaagggtggaattctattcatgaggattc
caccttcaggatttaagtacctcccaaggcctcacctactaattccaccaactttgggggggagttgagtt
tgggggagaggggacacaaacagtcaggccaaattagaagaaggaaatgataaaggacagagttatagatgt
attcattattatcttctaaataatcattacctgaatcctaacaaatttccttcatttttcagattcaacttat
cagtatataaaaggttctgctgacattaaatccaaccaaggaatctttccaagtggacttcagtggtgcacta
tttaattggtgtctatgacatacacacaggggtgccctgatgggagttatcaaccaaccttttgatc[a/
g]caagac[t/c]taaacaccctcaggtaaaaagttgaacatttttggtatattatggtttttgggaattaca
ccttatcttcgtttattgtcaagattatttccccacatgactttcccatgacaatacatttgcattcctacta
attatctgcatgtttaaattaacagtccttttattttcagtcctgggtttcacaacaaaatgtgggggattatc
taatgaaaatacgggtaggtatggccaggattagaaccgactatgaggtactcttctataaatatttacag
tatcacttccttttctgctcctcctcctcat
    
```

Il gene INPP1 si trova sul cromosoma 15 suino dalla posizione 89.551.458 alla posizione 89.581.886 della sequenza depositata, ed è costituito da sei esoni. L'allineamento delle sequenze amplificate con i dati disponibili in banca dati ha permesso di localizzare i due SNP sull'esone 5, come mostrato in figura 36.

Figura 36: Allineamento tra l'esone contenente gli SNP e il gene INPP1



Gene PIK3R2

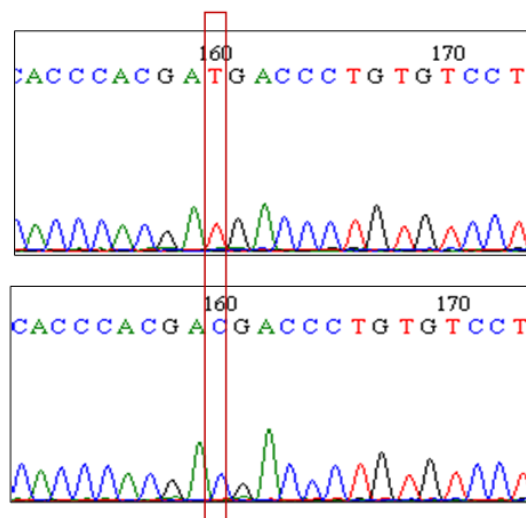
Le PCR-SSCP per questo gene sono state effettuate utilizzando inizialmente le coppie di primer disegnate sul cDNA e successivamente quelle sul DNA genomico descritte in “Materiali e Metodi”.

Figura 37: PCR-SSCP per PIK3R2



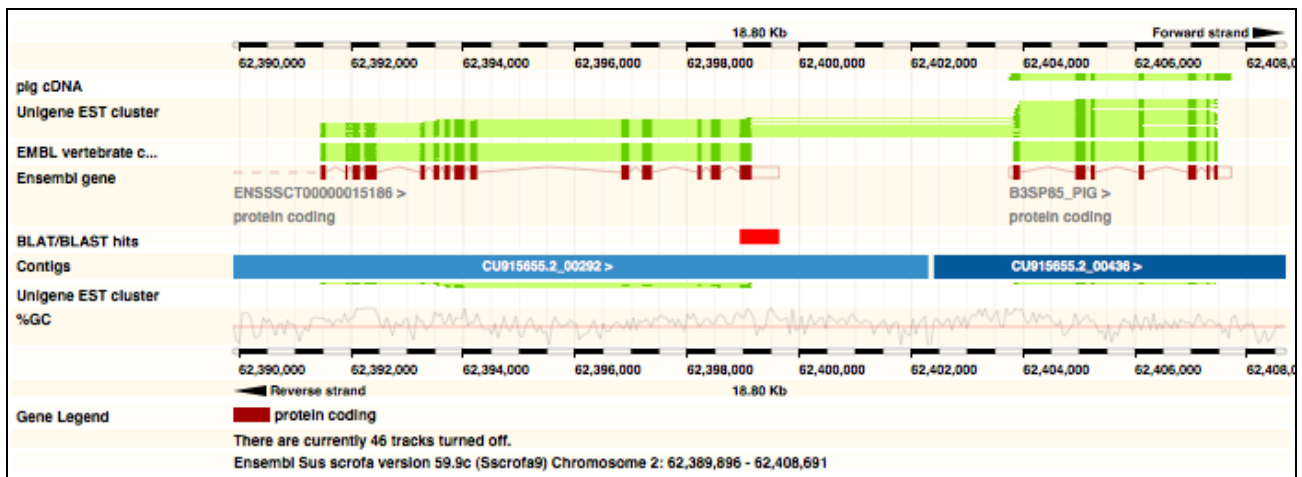
Fra le coppie di primer disegnate sul DNA genomico solo il frammento ottenuto dall'amplificazione con PIK3 F1/R1 ha mostrato differenze nella corsa elettroforetica dopo PCR-SSCP, come mostrato nella figura 37. Il sequenziamento dei campioni che presentavano differenze di migrazione in SSCP ha evidenziato una transizione T→C, come mostrato nella figura 38.

Figura 38: Polimorfismo identificato nel gene PIK3R2



Il gene PIK3R2 si trova sul cromosoma 2 suino dalla posizione 62.387.523 alla posizione 62.399.642 della sequenza depositata (ENSSSCG00000013900) ed è costituito da 15 esoni. Lo SNP è risultato essere in posizione 62.399.517 della sequenza di DNA depositata in Ensembl, all'interno dell'esone 15. Nella figura sottostante è mostrato l'allineamento fra l'esone 15 contenente lo SNP e il resto del gene PIK3R2. Nel box 24 sottostante è mostrata la porzione della sequenza del gene PIK3R2 contenente lo SNP identificato.

Figura 39: Allineamento tra l'esone contenente lo SNP e il gene PIK3R2



Box 24: Sequenza del gene PIK3R2 contenente lo SNP identificato

PIK3R2 (Chromosome:Scrofa9:2:62.398.562:62.399.941:1)

```
gcagccagcgggctgctatgcctgctctgtggtgtgagtgcctggcaggggagcccaagagtagagtgggga
ggggaggagaggggaggggtgtcgggagggagtggggaggggaaccacccattccttctgggacctctcattga
gcgccaactgtatgttagaccttgcgaaggccaggaagaagccccagattccttgggaaccaggagggaagca
aggacagtatcagagcaggggatggtagggtctggacctgtcagcatcctggaaattgagaattatgagtc
caggcggggtcacttgacaggggccaaggggcagacctgggagagcacggtaggggccccactgaccagccc
ttcatccgcacccgcagggtggaacggcgacaccaagcactgcgtcatctaccgcacggccacaggcttcggct
tcgaggagccctacaacttgtaacgggtccctgaaggagctggtgctgactatcagcacgcctcgctggtgca
gcacaacgatgctcaccgtcacccctgccccaccagtgctgctgccccgggccccctgggccccccactgctgcc
cgctgagcgtgagcaggagaaccggctccggatcagagccacccccagcgcagaggctagggtggcagctg
catccgggatctctatcttctgaatctgtctcttcttcttcttaggttttctctgtctgtctcttctgtaatct
ctcccagtgaaatctccatttgcaagggtctatcagtccttctccaagtctgctgtctctctgtctccctctg
tcaactattctgtctcttcttagttccatctgtcctcttcttctctcttgggtctctgttccctctgtgtatctgt
gttgggggtcccgcctccccacgcctatcccccttccccactggcaccgctctccctacggctctggcca
cccacga[t/c]gacctgtgtcctgccccgcccctgcaggccccggggtccccacaagccccacctggctgc
acctgccatgtttacagaggccccctgggctgctgagccccagcctgggtgccccgattttttaagccataga
cctgggggtcggggcaggaaggaacttcgctcggccacttccaagaacctcagccgtgacatttggggccaggc
gggacctgccccacagaccccaacttccccttccaacctgaagtgaaccacagcactgggttatccccacga
tggggctgctgccaagaagtaacccccctgaaaagaaaataattaaataaactcctgagccgacccaggc
ctccaaggattcagggcagccagcacctctggggcggtgacacgcgaaggctgcccgcagcacctccac
```

Gene CDKN1

Il gene CDKN1 ha presentato numerose difficoltà di analisi mediante PCR-SSCP e per questo motivo non è stato possibile identificare dei polimorfismi al suo interno.

Validazione nei 22 animali degli SNP identificati

Una volta identificati, gli SNP descritti sopra sono stati ricercati, mediante sequenziamento nelle posizioni di interesse, in tutti i 22 animali che costituiscono gli individui estremi per i tre caratteri studiati. Solo cinque degli SNP identificati mostravano una frequenza dell'allele minore (MAF, Minor Allele Frequency) maggiore del 5% nei 22 animali analizzati e sono stati quindi considerati per le successive analisi di associazione. Si tratta degli SNP [A/G] e [C/T] individuati nel gene CRADD, degli SNP [A/G] e [G/T] individuati nel gene PTPRD, e dello SNP [C/T] del gene PIK3R2. In tabella 26 sono elencate la loro posizione di mappa riportata nelle banche dati Emsembl e NCBI e la loro frequenza allelica nella popolazione costituita dai 22 animali.

Tabella 26: Elenco degli SNP nei geni CRADD, PTPRD e PIK3R2 con MAF > 0,05 nei 22 animali

Gene	Mutazione	Posizione (Emsembl)	Posizione (NCBI)	Frequenza
PTPRD1	[A/G]	223.178.416	29962	A=0,54 G=0,46
PTPRD2	[G/T]	223.178.619	30194	G=0,54 T=0,46
CRADD1	[A/G]	84.220.754	343	A=0,39 G=0,61
CRADD2	[C/T]	84.438.362	859	C=0,40 T=0,60
PIK3R2	[C/T]	624.00.897	3008	C=0,76 T=0,24

Studi di associazione tra gli SNP identificati e i caratteri di interesse

Mediante il programma SAS 9.2 sono state effettuate analisi di associazione di questi polimorfismi con i tre caratteri considerati in questo studio, come mostrato nella tabella 27. In particolare, lo SNP 1 (SNP g343[A/G]) del gene CRADD mostra una buona associazione con la compattezza delle masse muscolari; lo SNP 2 (SNP g30194[G/T]) del gene PTPRD mostra una buona associazione con la compattezza delle masse muscolari e lo spessore del lardo dorsale; lo SNP del gene PIK3R2 (SNP g.3008 [C/T]) mostra un'ottima associazione con la compattezza delle masse muscolari e lo spessore del lardo dorsale.

Tabella 27: Analisi di associazione tra gli SNP identificati ed i tre caratteri studiati nei 22 animali

		PRIN1	Spessore del lardo	Compattezza muscolare
CRADD1	CCP*	-0,32678	0,02942	0,42310
CRADD1	Prob**	0,1377	0,8966	0,0498
CRADD2	CCP*	-0,18173	-0,25051	0,37715
CRADD2	Prob**	0,5341	0,3877	0,1837
PTPRD1	CCP*	0,11895	0,16106	-0,37988
PTPRD1	Prob**	0,6277	0,5101	0,1087
PTPRD2	CCP*	0,37024	0,53616	-0,55963
PTPRD2	Prob**	0,1435	0,0265	0,0195
PIK3R2	CCP*	0,16713	0,55693	-0,64972
PIK3R2	Prob**	0,4690	0,0087	0,0014

*CCP: Coefficiente di correlazione di Pearson

**Prob: Probabilità > |r| con H0: Rho=0

Pertanto, si è deciso di genotipizzare lo SNP g.3008 [C/T] del gene PIK3R2 su tutti gli animali appartenenti alla popolazione dei 231 suini. L'associazione dei genotipi con i caratteri fenotipici è stata poi verificata utilizzando la procedura GML del programma SAS 9.2.

Le analisi hanno evidenziato un effetto significativo dello SNP sulle seguenti variabili: marezzatura ($P < 0.0001$), copertura adiposa ($P < 0.05$), spessore del grasso ($P < 0.05$), Prin1 ($P < 0.05$), Prin3 ($P < 0.01$); Prin4 ($P < 0.01$). La tabella 28 riporta le medie stimate per genotipo delle variabili sulle quali lo SNP ha presentato un effetto statisticamente significativo. In particolare, per quanto riguarda i fenotipi misurati, il genotipo CC presenta valori inferiori di marezzatura, copertura adiposa e spessore del grasso rispetto agli altri genotipi. Bisogna però tener presente che nei punteggi assegnati alla marezzatura e alla copertura adiposa il valore 1 corrisponde ad un giudizio ottimo e 5 insufficiente. Pertanto si può affermare che il genotipo CC è positivamente associato al grado di marezzatura e copertura adiposa.

Sul carattere marezzatura, il genotipo TC presenta un valore intermedio (1.71udm) tra i due genotipi omozigoti CC (1.45 udm) e TT (2.56 udm), indicando un effetto additivo. Sulla copertura adiposa e sullo spessore del grasso il genotipo eterozigote non si discosta significativamente dall'omozigote CC, a indicare in questo caso un effetto di dominanza dell'allele C. Per quanto riguarda le componenti principali 1, 3 e 4, l'andamento degli effetti è diverso per i tre genotipi; si possono comunque osservare differenze più marcate tra i due genotipi omozigoti.

Tabella 28: Media stimata ed errore standard per genotipo allo SNP . Medie contrassegnate con lettere differenti differiscono significativamente (lettere maiuscole: P<0.01; lettere minuscole: P<0.05).

Variabile	CC (n = 65)	TC (n = 103)	TT (n = 12)
Marezzatura (1-5)	1,45 ^{Aa} ± 0,09	1,71 ^b ± 0,07	2,56 ^{Cc} ± 0,19
Copertura adiposa (1-5)	2,46 ^a ± 0,10	2,53 ^a ± 0,08	3,01 ^b ± 0,21
Spessore grasso (mm)	24,82 ^a ± 0,87	25,81 ^a ± 0,69	30,01 ^b ± 1,86
Prin1	-0,58 ^A ± 0,21	-0,29 ^a ± 0,17	0,78 ^{Bb} ± 0,46
Prin3	-0,06 ^A ± 0,12	0,15 ^a ± 0,09	0,79 ^{Bb} ± 0,25
Prin4	0,23 ^A ± 0,12	0,05 ^A ± 0,09	-0,70 ^B ± 0,26

A questo punto, si è deciso di testare questo SNP anche in un'altra popolazione, costituita da 600 individui appartenenti a tre razze differenti: Large White italiana, Duroc italiana e Landrace italiana del libro genealogico ANAS. Per ciascuna razza sono stati individuati due gruppi di 100 animali con EBV estremi per l'incremento ponderale medio giornaliero. Lo SNP è stato genotipizzato su questi animali in "outsourcing" dalla ditta KBioscience utilizzando la tecnologia KASPar descritta in precedenza. Lo SNP è risultato polimorfico in ciascuna delle tre razze analizzate (tabella 29), con una frequenza dell'allele C pari a 0,26 per la Duroc, 0,57 per la Landrace e 0,14 per la Large White.

Tabella 29: Distribuzione dei genotipi per lo SNP di interesse del gene PIK3R2 nelle razze italiane indagate

Genotipo	Duroc (n=194)	Landrace (n=191)	Large White (n=186)
C:C	13	65	2
C:T	76	89	49
T:T	105	37	135

Utilizzando il software statistico SPSS[®] sono state compiute analisi di associazione di questo SNP con gli EBV ottenuti da ANAS: spessore del lardo dorsale, incremento medio giornaliero, tagli magri in kg, peso cosce in Kg, indice conversione alimentare in unità. Per nessuna delle tre razze in analisi è stato trovata associazione con il peso della coscia (tabella 30 e 31).

Tabella 30: Analisi di associazione dello SNP3008[C/T] del gene PIK3R2 con gli EBV considerati

EBV	Duroc	Landrace	Large White
Incremento Medio Giornaliero	ns	** CC	ns
Spessore Lardo Dorsale	ns	** CC	ns
Tagli Magri	ns	** CC	ns
Indice conversione alimentare	ns	** CC	ns
Peso della coscia	ns	ns	ns

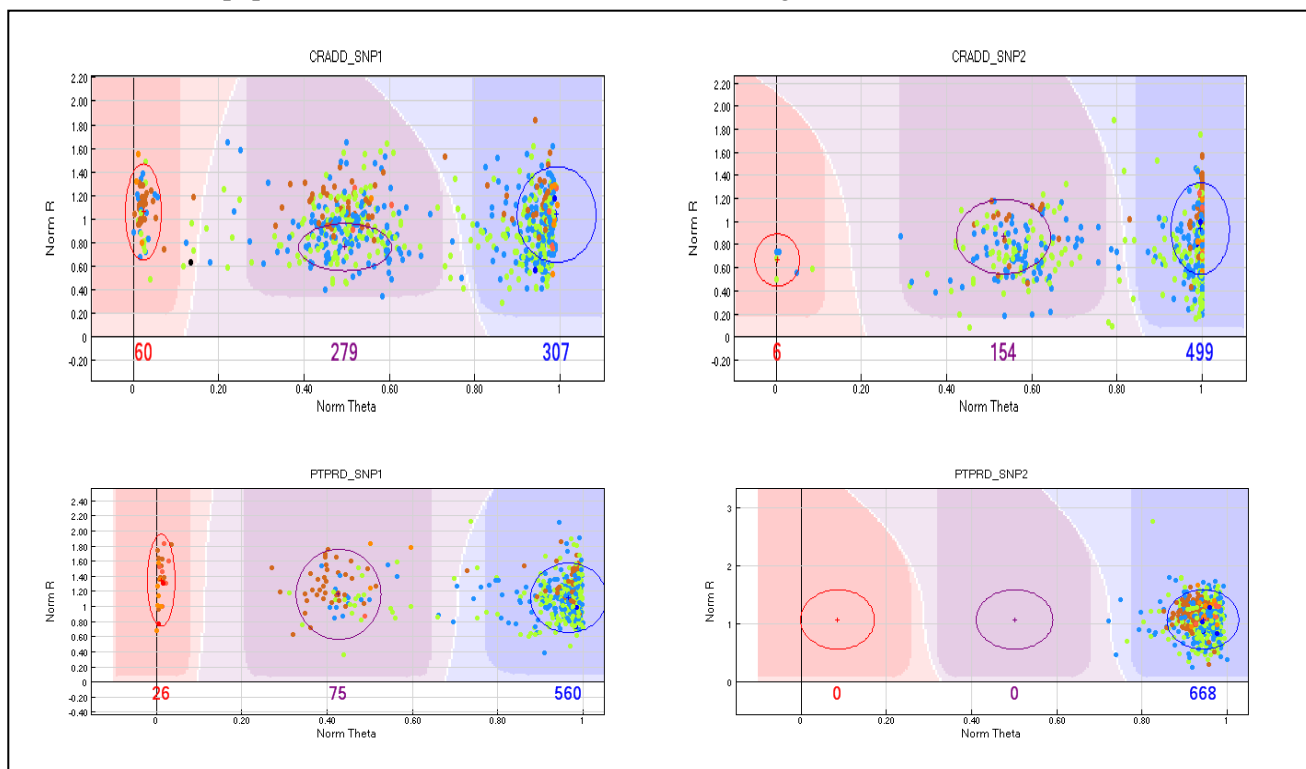
Tabella 31: Test dell'ANOVA, il livello di significatività è $p < 0,05$ (*)

Varabile	I	J	mean difference I-J	Errore std	significatività
Spessore Lardo dorsale (mm)	C:C	C:T	3,854*	0,7913	0,000
	C:C	T:T	4,958*	0,9988	0,000
	C:T	T:T	1,104	0,9487	0,245
Incremento Medio Giornaliero (g)	C:C	C:T	-31,04*	11,341	0,006
	C:C	T:T	-41,69*	14,315	0,004
	C:T	T:T	-10,65	13,597	0,434
Tagli Magri (Kg)	C:C	C:T	-2,05208*	0,571766	0,000
	C:C	T:T	-2,41853*	0,721692	0,001
	C:T	T:T	-0,36645	0,685486	0,593
Indice conversione alimentare (U)	C:C	C:T	0,13251*	0,059897	0,027
	C:C	T:T	0,18559*	0,075602	0,014
	C:T	T:T	0,05309	0,07181	0,460

I risultati ottenuti mostrano invece negli animali di razza Landrace una buona associazione del polimorfismo con lo spessore del lardo dorsale, l'incremento medio giornaliero, i tagli magri, e l'indice di conversione alimentare.

Infine, anche i due SNP del gene CRADD e i due SNP del gene PTPRD sono stati tipizzati in una differente popolazione, costituita da 560 suini di razza Large White italiana. Questi animali sono stati selezionati in collaborazione con ANAS e presentano valori estremi di EBV (Estimated Breeding Value) per lo spessore del grasso dorsale. Sono stati genotipizzati per questi quattro SNP anche 86 animali di razza Duroc, di cui però non erano disponibili i valori di EBV. L'analisi è stata fatta in "outsourcing" dalla ditta Kos Genetic utilizzando la tecnologia "GoldenGate" Illumina. In figura 40 sono riportate le immagini di clusterizzazione degli SNP in esame nella popolazione analizzata.

Figura 40: Risultati ottenuti dalla genotipizzazione dei due SNP del gene CRADD e dei due SNP del gene PTPRD in una popolazione costituita da 560 suini di razza Large White e da 86 animali di razza Duroc



Come si può osservare, a parte lo SNP2 del gene PTPRD (SNP 30194[G/T]) che in questa popolazione è risultato omozigote per l'allele G, gli altri tre SNP testati sono risultati polimorfici. Sono quindi state compiute analisi di associazione dei tre SNP polimorfici con i caratteri di interesse sulla popolazione dei suini Large White, di cui si disponevano gli EBV del lardo dorsale. Le analisi sono sempre state eseguite utilizzando il programma SAS 9.2; i risultati sono mostrati nella tabella sottostante.

Tabella 32: analisi di associazione degli SNP individuati negli animali di razza Large White.

		CRADD1 (n = 532)	CRADD2 (n = 343)	PTPRD1 (n = 549)
Ind. lardo dorsale	CCP*	0,01319	0,00351	-0,03461
	Prob**	0,7614	0,9350	0,4183
Ind. accrescimento giornaliero	CCP*	-0,03452	-0,05670	0,01794
	Prob**	0,4269	0,1871	0,6749
Ind. tagli magri	CCP*	-0,02115	-0,03404	0,03109
	Prob**	0,6264	0,4286	0,4673
Ind. coscia	CCP*	0,02260	0,00170	0,09559
	Prob**	0,6030	0,9685	0,0251
Ind conversione alimentare	CCP*	0,00327	-0,00043	-0,00699
	Prob**	0,9400	0,9920	0,8702

*CCP: Coefficiente di correlazione di Pearson

**Prob: Probabilità > |r| con H0: Rho=0

Come si può osservare, soltanto lo SNP1 del gene PTPRD è risultato correlato con il peso della coscia, mentre i due SNP del gene CRADD non sono risultati avere correlazioni significative con i fenotipi di interesse.

Applicazione dell'analisi genomica alla specie suina: ricerca di SNP identificativi di un nuovo tipo genetico, il Suino Nero di Garlasco, mediante l'utilizzo del pannello Illumina *PorcineSNP60 BeadChip*

Negli ultimi anni è stato svolto un notevole lavoro da parte di gruppi di ricerca ed operatori di filiera del settore suinicolo per il recupero di una biodiversità di specie apparentemente perduta. Nell'area della Lomellina, in provincia di Pavia, è in atto un intervento teso a riformare un tipo genetico ormai perso, il Nero di Garlasco, mediante l'utilizzo di incroci di verri appartenenti al Nero di Garlasco con femmine di razza Large White.

Il progetto su cui si basa il presente lavoro punta alla caratterizzazione del Nero di Garlasco mediante la ricerca di "firme genetiche", ovvero SNP caratterizzanti il tipo genetico in questione. A questo scopo 96 soggetti appartenenti al Nero di Garlasco e rappresentativi dell'intera popolazione sono stati sottoposti ad uno screening genomico di circa 60.000 polimorfismi noti mediante l'utilizzo del *PorcineSNP60 BeadChip*, già testato e validato su soggetti appartenenti a razze cosmopolite (Ramos et al, 2009), utilizzando il servizio offerto in outsourcing dalla ditta statunitense GeneSeek (http://www.neogen.com/GeneSeek/SNP_Illumina.html).

L'antica razza del Nero di Garlasco si distingueva dalle altre razze per la colorazione tipica del mantello, presentante balzane bianche sugli arti superiori ed inferiori, nonché peluria di colore bianco su fronte e naso caratteristici. La popolazione presa in considerazione per l'analisi genomica presenta qualche carattere tipico della antica razza di Garlasco, quali mantello costituito da setole ispide di colore nero, tendenti al rossiccio a livello della regione ventrale e della mammella; regione della fronte e del naso, compreso il labbro inferiore, caratterizzate da peli bianchi, balzane bianche estese sia agli arti anteriori che posteriori e unghia bianchi- giallastri. In tabella 33 sono descritti i fenotipi di colorazione del mantello dei 96 soggetti scelti per l'analisi genomica.

Tabella 33: Tipi di colorazione del mantello dei 96 soggetti campionati

Variante fenotipica nella colorazione del mantello	Numero di soggetti
Mantello nero uniforme	36
Mantello nero con lista e grugno bianchi	42
Mantello nero senza lista, con balzane bianche e grugno non completamente bianco	8
Mantello rosso	8
Rilevazione fenotipica non effettuata	2
TOTALE	96

Da questi campioni è stato estratto il DNA come descritto in Materiali e Metodi e ne sono state valutate la qualità e la quantità mediante analisi spettrofotometrica (tabella 34). Si sono ottenute buone quantità di DNA con un buon rapporto 260/280. Il rapporto 260/230 è, invece, inferiore al valore ideale in alcuni campioni, indice della presenza di contaminanti.

Tabella 34: Risultati ottenuti dalle analisi Nanodrop dei 96 campioni scelti per le analisi

ID	Concentrazione (ng/μL)	Rapporto 260/280	Rapporto 260/230	ID	Concentrazione (ng/μL)	Rapporto 260/280	Rapporto 260/230
SG001	46,29	1,86	1,92	SG117	57,44	1,86	1,97
SG009	49,59	1,90	1,88	SG119	34,15	1,64	0,20
SG010	73,36	1,84	1,64	SG121	98,89	1,93	1,84
SG016	73,36	1,84	1,64	SG122	71,31	1,91	1,88
SG023	10,45	2,41	0,13	SG123	91,89	1,91	1,92
SG024	31,77	1,75	1,38	SG124	159,68	1,35	0,30
SG027	35,37	1,83	1,58	SG125	37,09	1,71	0,38
SG032	41,71	1,84	1,78	SG127	49,67	1,69	0,51
SG063	25,07	1,83	1,27	SG130	14,08	1,61	0,48
SG065	49,8	1,77	1,76	SG131	27,65	2,17	0,42
SG066	27,07	1,60	1,28	SG132	151,78	1,69	0,35
SG067	25,07	1,83	1,27	SG133	41,24	1,75	0,45
SG072	68,31	1,87	1,78	SG134	45,76	1,50	0,23
SG073	35,77	1,86	1,47	SG135	38,97	1,60	0,39
SG076	31,01	1,82	1,54	SG136	37,2	1,61	0,54
SG078	73,01	1,71	0,85	SG137	24,97	1,78	0,10
SG079	46,89	1,80	1,75	SG139	18,01	1,66	0,05
SG081	103,71	1,86	1,86	SG141	18,25	1,46	0,12
SG082	24,36	1,66	1,29	SG143	16,16	1,67	1,39
SG085	76,19	1,76	1,39	SG148	4,73	2,23	0,11
SG086	68,24	1,89	1,77	SG153	61,97	1,86	0,28
SG088	84,95	1,89	1,85	SG158	6,9	1,87	0,04
SG089	67,36	1,82	1,83	SG160	29,23	1,75	0,15
SG091	73,64	1,82	1,60	SG161	31,44	1,81	0,11
SG092	50,56	1,80	1,82	SG162	29,93	1,82	0,15
SG093	70,26	1,86	1,86	SG164	113,4	1,90	1,35
SG095	55,17	1,87	1,63	SG165	74,19	1,94	0,96
SG096	72,09	1,87	1,48	SG166	74,97	1,91	1,04
SG097	58,79	1,82	1,77	SG167	56,02	1,91	0,86
SG099	54,35	1,80	1,65	SG168	64,41	1,91	1,32
SG101	54,57	1,79	1,81	SG169	65,56	1,81	1,00
SG102	77,47	1,79	1,66	SG170	64,2	1,77	1,04
SG103	60,33	1,82	1,57	SG171	55,17	1,82	0,82
SG105	119,76	1,93	1,91	SG172	51,11	1,76	0,83
SG107	58,79	1,82	1,77	SG174	48,79	1,92	0,98
SG109	128,68	2,00	2,04	SG176	46,16	1,86	0,99
SG110	98,89	1,93	1,84	SG177	39,62	1,87	0,93
SG111	85,36	1,89	1,89	SG178	52,07	1,83	1,64
SG112	99,40	1,92	2,00	SG179	43,87	1,91	0,84
SG114	52,95	1,89	1,77	SG180	41,56	1,9	0,97
SG115	82,22	1,99	1,89	SG249	89,01	1,84	2
SG116	108,07	1,93	1,5	SG250	60,68	1,89	1,98

ID	Concentrazione (ng/μL)	Rapporto 260/280	Rapporto 260/230	ID	Concentrazione (ng/μL)	Rapporto 260/280	Rapporto 260/230
SG251	41,31	1,79	1,90	SG258	66,75	1,84	1,90
SG252	44,82	1,76	1,49	SG259	63,84	1,82	1,81
SG253	29,23	1,75	0,15	SG267	68,1	1,86	1,69
SG254	31,44	1,81	0,11	SG269	62,63	1,86	1,38
SG256	122,52	1,85	1,96	SG270	54,65	1,78	1,69
SG257	119,49	1,84	1,90	SG271	73,25	1,82	1,82

I dati ottenuti dalla genotipizzazione dei 96 campioni mediante l'utilizzo del *PorcineSNP60 BeadChip* Illumina sono poi stati analizzati utilizzando il software GenABEL (Yuri et al., 2007), libreria di R utilizzata per studi di associazione.

Statistiche per SNP

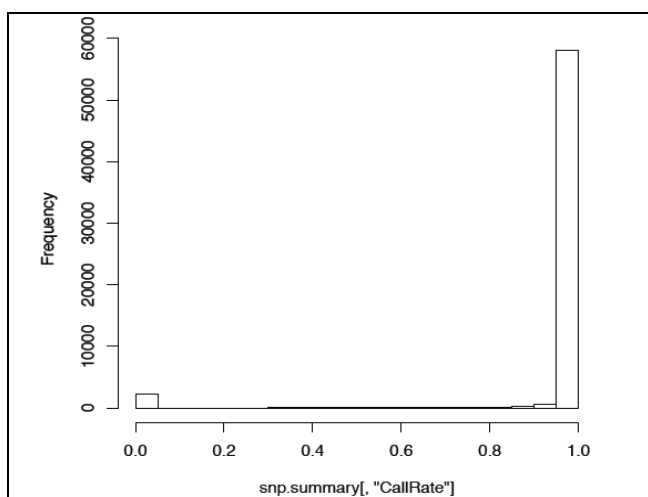
Il Call Rate per SNP è dato dal numero di individui con genotipizzazione per quello SNP (alleli non-missing) diviso il numero totali di individui sottoposti a genotipizzazione. Come si può vedere dalla tabella 35, il 93% degli SNP ha un Call Rate superiore al 95%.

Tabella 35: Call Rate e numero di marcatori

	$X \leq 0,8$	$0,8 < X \leq 0,85$	$0,85 < X \leq 0,9$	$0,9 < X \leq 0,95$	$X > 0,95$
N.	3118	177	301	572	57.995
Proporzione	0,05	0,00	0,00	0,01	0,93

Il 95% è la soglia al di sotto della quale gli SNP vengono normalmente esclusi dalle successive analisi. Infatti, la mancata attribuzione di un genotipo ad uno SNP normalmente avviene per una sua collocazione al di fuori di una clusterizzazione dei tre genotipi come quella descritta in figura 40. Si considerano pertanto solo gli SNP per cui l'attribuzione certa del genotipo sia almeno avvenuta nel 95% degli individui. Il 2% (1.050) degli SNP possiede valori compresi tra l'80 e il 95% e solo il 5%

Figura 41: Istogramma call rate



dei polimorfismi (3.118) possiede Call Rate inferiore all'80%. Del 5% degli SNP che rientrano nella classificazione di quelli con un Call Rate inferiore all'80% la maggior parte possiede valori prossimi allo zero, come visibile nell'istogramma di figura 41, il che lascia supporre una difficoltà di genotipizzazione degli SNP più che di una corretta attribuzione al genotipo. Nel complesso, e come chiaramente visibile

dall'istogramma, si può constatare il buon esito del saggio di genotipizzazione svolto con il *PorcineSNP60 BeadChip* sulla popolazione oggetto di studio.

Le stesse statistiche compiute sull'intero set di SNP sono state poi state effettuate anche per singolo cromosoma, come mostrato in tabella 36. In questo caso, viene indicata la distribuzione degli SNP per cromosoma. Inoltre, per ciascun cromosoma, è indicato il valore medio di Call Rate degli SNP in esso contenuti. I cromosomi 1, 14, 4, 13 e 7 risultano nell'ordine quelli con un maggior numero di SNP, i restanti SNP presentano una numerosità abbastanza omogenea, compresa tra 1.098 (cromosoma 12) e 2.677 (cromosoma 2).

Tabella 36: Statistiche Call Rate per cromosoma

Cromosoma	Media	Minimo	Massimo	N.
0	0,94	0,00	1,0	13.970
1	0,97	0,00	1,0	6.622
2	0,95	0,00	1,0	2.677
3	0,97	0,00	1,0	2.178
4	0,96	0,00	1,0	3.693
5	0,96	0,00	1,0	2.257
6	0,96	0,00	1,0	1.967
7	0,95	0,00	1,0	3.554
8	0,96	0,00	1,0	2.224
9	0,96	0,00	1,0	2.638
10	0,94	0,00	1,0	1.363
11	0,95	0,00	1,0	1.862
12	0,95	0,00	1,0	1.098
13	0,96	0,00	1,0	3.633
14	0,95	0,00	1,0	4.056
15	0,96	0,00	1,0	2.659
16	0,96	0,00	1,0	1.574
17	0,95	0,00	1,0	1.672
18	0,96	0,00	1,0	1.138
X	0,97	0,00	1,0	1.309
Y	0,50	0,31	1,0	19

Poiché la sequenza del genoma della specie suina disponibile al momento del disegno del *PorcineSNP60 BeadChip* (build 7) copriva il 70% del genoma, il 70% degli SNP selezionati per essere inclusi nel test veniva da quelli per i quali la posizione sul genoma era nota. Per garantire una copertura completa del genoma suino, il restante 30% di SNP erano stati selezionati dall'elenco degli SNP che non potevano essere mappati sul genoma suino (Ramos et al., 2009). Per questo motivo i risultati mostrano un elevato numero di SNP collocati sul cromosoma "0", ideato per raggruppare questi SNP di cui non si conosce la posizione sul genoma. L'aggiornamento della sequenza è piuttosto rapido e al momento dell'analisi compiuta nella presente tesi una parte di

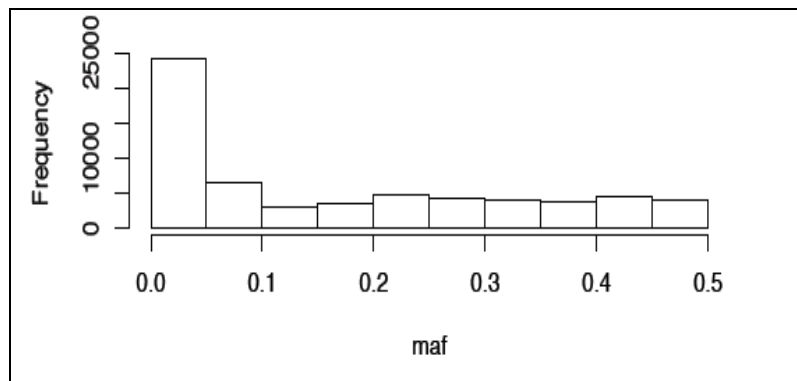
questi SNP è stata mappata, riducendo la frazione degli SNP sul cromosoma 0 a circa il 22,5% del numero totale di polimorfismi analizzati. I valori medi di Call Rate SNP attribuiti a ciascun cromosoma sono uguali o maggiori del 94%, con un valore minimo pari a 0 ed un valore massimo pari a 1 per tutti i cromosomi tranne l'Y. Questo indica che in ogni autosoma e nel cromosoma X sono presenti almeno 1 SNP non genotipizzato ed 1 genotipizzato per tutti gli individui. Per il cromosoma Y si ha un Call Rate medio pari a 0,50, il che indica che la popolazione indagata comprendeva maschi e femmine in una proporzione pressoché identica. Infatti, gli individui genotipizzati erano 45 maschi e 51 femmine. Lo scostamento verso l'alto dal valore massimo di Call Rate medio di 0,47 (45/96 nel caso che a tutti i maschi fosse attribuito un genotipo per ogni SNP) è spiegato dalla presenza di almeno uno SNP genotipizzato in tutti gli animali, comprese le femmine, come indicato dal valore massimo di Call Rate pari a 1. Il valore minimo di Call Rate pari a 0,31 indica invece che 1 degli SNP è stato stato genotipizzato solo in 30 dei 96 individui (0,31*96), per cui per questo SNP la genotipizzazione non è andata a buon fine in 15 dei 45 maschi. La tabella 37 conferma, infatti, che sul cromosoma Y risulta uno SNP con un valore di Call Rate superiore al 95%. Con tutta probabilità si tratta di uno SNP con problemi di genotipizzazione (falsi positivi) o di uno SNP erroneamente collocato sul cromosoma Y.

Tabella 37: Numero e percentuale di marcatori per cromosoma in quattro classi di Call Rate

CHR	X≤0,8		0,8<X≤0,85		0,85<X≤0,95		X>0,95	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
0	885	0,06	40	0,00	206	0,01	12.839	0,92
1	230	0,04	14	0,00	82	0,01	6.296	0,95
2	143	0,05	8	0,00	48	0,02	2.478	0,93
3	78	0,04	4	0,00	24	0,01	2.072	0,95
4	155	0,04	9	0,00	36	0,01	3.493	0,95
5	113	0,05	4	0,00	33	0,01	2.107	0,93
6	88	0,04	6	0,00	19	0,01	1.854	0,94
7	181	0,05	8	0,00	38	0,01	3.327	0,94
8	101	0,04	12	0,00	31	0,01	2.080	0,94
9	104	0,04	6	0,00	30	0,01	2.498	0,95
10	84	0,06	6	0,00	15	0,01	1.258	0,92
11	110	0,06	5	0,00	29	0,02	1.718	0,92
12	59	0,05	5	0,00	18	0,02	1.016	0,92
13	179	0,05	12	0,00	51	0,01	3.391	0,93
14	207	0,05	14	0,00	77	0,02	3.758	0,93
15	125	0,05	6	0,00	48	0,02	2.480	0,93
16	67	0,04	8	0,00	31	0,02	1.468	0,93
17	94	0,06	3	0,00	25	0,01	1.550	0,93
18	46	0,04	0	0,00	10	0,01	1.082	0,95
X	51	0,04	7	0,00	22	0,02	1.229	0,94
Y	18	0,95	0	0,00	0	0,00	1	0,05

Con GenABEL è stata calcolato inoltre l'indice MAF, che indica la frequenza dell'allele con lo SNP minore nella popolazione, come è mostrato in figura 42.

Figura 42: Istogramma di distribuzione MAF



Il valore di MAF oscilla tra 0,0 e 0,5, a seconda che l'allele minore sia del tutto assente o abbia una frequenza equivalente a quello maggiore. Come si può osservare anche in tabella 38, 24.199 SNP hanno una frequenza MAF compresa tra 0 e 0,05. Per le analisi di associazione SNP con MAF inferiori allo 0,05 sono normalmente esclusi dall'analisi. Nel caso della ricerca di SNP che costituiscano “firme genetiche” di una popolazione questi SNP sono invece estremamente interessanti, soprattutto se le frequenze di questi SNP nelle popolazioni con cui li si raffronta differiscono significativamente.

Tabella 38: Distribuzione di frequenza MAF

	$X \leq 0$	$X \leq 0,01$	$X \leq 0,05$	$X \leq 0,1$	$X \leq 0,2$	all X
No	10.586	13.178	24.199	30.581	37.076	62.163
Prop	0,17	0,21	0,39	0,49.	0,60	1,00

Statistiche per individuo

Alcune statistiche possono essere eseguite sui singoli individui. Nella tabella 39 sono riportate le seguenti statistiche:

- numero di SNP genotipizzati;
- numero di SNP polimorfici;
- livello di omozigosità;
- omozigosità attesa (om. attesa);
- call rate per individuo;
- eterozigosità.

Tabella 39: Statistiche SNP per individuo

ID	Genotipizzati	Polimorfici	Omozigosità	Om. attesa	Call Rate	Eterozigosità
SG001	59.628	51.378	0,67	0,76	0,96	0,33
SG009	59.632	51.378	0,71	0,76	0,96	0,29
SG010	59.551	51.320	0,69	0,76	0,96	0,31
SG016	59.505	51.287	0,76	0,76	0,96	0,24
SG023	59.641	51.401	0,79	0,76	0,96	0,21
SG024	59.583	51.335	0,77	0,76	0,96	0,23
SG027	59.494	51.259	0,78	0,76	0,96	0,22
SG032	59.450	51.237	0,80	0,76	0,96	0,20
SG063	59.304	51.143	0,77	0,76	0,95	0,23
SG065	59.313	51.155	0,78	0,76	0,95	0,22
SG066	59.337	51.147	0,77	0,76	0,95	0,23
SG067	59.392	51.184	0,76	0,76	0,96	0,24
SG072	58.419	50.453	0,66	0,76	0,94	0,34
SG073	59.549	51.324	0,65	0,76	0,96	0,35
SG076	59.402	51.215	0,76	0,76	0,96	0,24
SG078	59.342	51.163	0,84	0,76	0,95	0,16
SG079	59.406	51.192	0,76	0,76	0,96	0,24
SG081	59.456	51.257	0,77	0,76	0,96	0,23
SG082	59.371	51.196	0,65	0,76	0,96	0,35
SG085	59.402	51.199	0,79	0,76	0,96	0,21
SG086	59.402	51.223	0,76	0,76	0,96	0,24
SG088	59.307	51.153	0,65	0,76	0,95	0,35
SG089	59.268	51.098	0,79	0,76	0,95	0,21
SG091	59.327	51.137	0,72	0,76	0,95	0,28
SG092	59.279	51.096	0,77	0,76	0,95	0,23
SG093	59.231	51.079	0,81	0,76	0,95	0,19
SG095	59.276	51.130	0,81	0,76	0,95	0,19
SG096	59.277	51.132	0,81	0,76	0,95	0,19
SG097	59.293	51.124	0,80	0,76	0,95	0,20
SG099	59.253	51.108	0,79	0,76	0,95	0,21
SG101	59.292	51.141	0,80	0,76	0,95	0,20
SG102	59.339	51.176	0,78	0,76	0,95	0,22
SG103	59.282	51.140	0,83	0,76	0,95	0,17
SG105	59.318	51.174	0,73	0,76	0,95	0,27
SG107	59.318	51.165	0,73	0,76	0,95	0,27
SG109	59.466	51.245	0,72	0,76	0,96	0,28
SG110	59.438	51.237	0,75	0,76	0,96	0,25
SG111	59.295	51.156	0,67	0,76	0,95	0,33
SG112	59.276	51.135	0,79	0,76	0,95	0,21
SG114	59.347	51.189	0,77	0,76	0,95	0,23
SG115	59.202	51.049	0,81	0,76	0,95	0,19
SG116	59.354	51.163	0,80	0,76	0,95	0,20
SG117	59.359	51.191	0,79	0,76	0,95	0,21
SG119	59.302	51.152	0,78	0,76	0,95	0,22
SG121	59.329	51.181	0,82	0,76	0,95	0,18
SG122	59.331	51.162	0,78	0,76	0,95	0,22
SG123	59.319	51.160	0,78	0,76	0,95	0,22
SG124	58.557	50.525	0,81	0,76	0,94	0,19
SG125	59.200	51.057	0,83	0,76	0,95	0,17
SG127	59.070	50.929	0,82	0,76	0,95	0,18
SG130	59.297	51.139	0,81	0,76	0,95	0,19

ID	Genotipizzati	Polimorfici	Omozigosità	Om. attesa	Call Rate	Eterozigosità
SG131	59.378	51.181	0,76	0,76	0,96	0,24
SG132	58.403	50.391	0,77	0,76	0,94	0,23
SG133	59.441	51.235	0,80	0,76	0,96	0,20
SG134	58.372	50.391	0,80	0,76	0,94	0,20
SG135	59.403	51.211	0,79	0,76	0,96	0,21
SG136	59.371	51.198	0,80	0,76	0,96	0,20
SG137	59.230	51.093	0,66	0,76	0,95	0,34
SG139	59.337	51.176	0,76	0,76	0,95	0,24
SG141	59.353	51.159	0,78	0,76	0,95	0,22
SG143	59.263	51.092	0,65	0,76	0,95	0,35
SG148	59.272	51.112	0,84	0,76	0,95	0,16
SG153	59.231	51.099	0,85	0,76	0,95	0,15
SG158	59.351	51.171	0,70	0,76	0,95	0,30
SG160	59.380	51.180	0,66	0,76	0,96	0,34
SG161	59.344	51.150	0,65	0,76	0,95	0,35
SG162	59.292	51.151	0,79	0,76	0,95	0,21
SG164	59.287	51.146	0,69	0,76	0,95	0,31
SG165	59.319	51.166	0,80	0,76	0,95	0,20
SG166	59.262	51.122	0,76	0,76	0,95	0,24
SG167	59.230	51.099	0,75	0,76	0,95	0,25
SG168	59.360	51.186	0,73	0,76	0,95	0,27
SG169	59.541	51.309	0,74	0,76	0,96	0,26
SG170	59.563	51.349	0,73	0,76	0,96	0,27
SG171	59.498	51.284	0,71	0,76	0,96	0,29
SG172	59.493	51.282	0,71	0,76	0,96	0,29
SG174	59.471	51.259	0,73	0,76	0,96	0,27
SG176	59.351	51.144	0,72	0,76	0,95	0,28
SG177	59.613	51.350	0,74	0,76	0,96	0,26
SG178	59.589	51.338	0,72	0,76	0,96	0,28
SG179	59.545	51.321	0,70	0,76	0,96	0,30
SG180	59.564	51.320	0,70	0,76	0,96	0,30
SG249	59.563	51.338	0,72	0,76	0,96	0,28
SG250	59.578	51.330	0,75	0,76	0,96	0,25
SG251	59.474	51.258	0,74	0,76	0,96	0,26
SG252	59.547	51.319	0,74	0,76	0,96	0,26
SG253	59.576	51.331	0,70	0,76	0,96	0,30
SG254	59.562	51.314	0,68	0,76	0,96	0,32
SG256	59.450	51.250	0,72	0,76	0,96	0,28
SG257	59.441	51.215	0,75	0,76	0,96	0,25
SG258	59.626	51.370	0,70	0,76	0,96	0,30
SG259	59.586	51.334	0,74	0,76	0,96	0,26
SG267	59.577	51.351	0,76	0,76	0,96	0,24
SG269	59.538	51.315	0,77	0,76	0,96	0,23
SG270	59.514	51.287	0,75	0,76	0,96	0,25
SG271	59.555	51.303	0,77	0,76	0,96	0,23

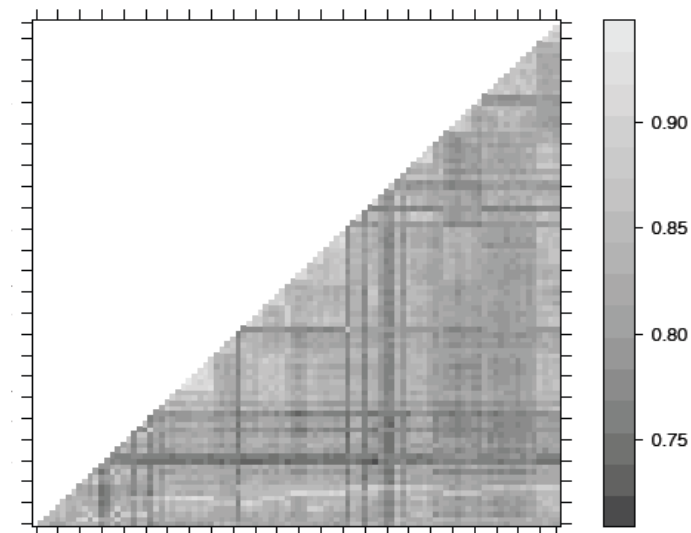
Su un totale di 62.163 SNP analizzati, nella popolazione sono stati genotipizzati con successo mediamente 59.360 SNP per soggetto, di cui circa 51.200 SNP sono risultati polimorfici. La popolazione presenta un'omozigosità media osservata di 0,77 e un eterozigosità media osservata di 0,23. L'eterozigosità è uno tra i parametri più importanti, che permette di stimare la variabilità

genetica di una popolazione. Eventuali outliers in termini di eterozigosità possono essere indicativi di DNA contaminato.

Un altro parametro di confronto e controllo è l'IBS (Identity by State), che misura il numero di alleli condivisi da una coppia di individui. Quindi repliche, gemelli, cloni o parenti devono avere valori prossimi ad 1.

L'IBS per i 96 campioni considerati è mostrato nella figura 43. È stata attribuita una diversa tonalità di grigio in base al grado di identità tra i genotipi: maggiore è il livello di identità tra soggetti, più chiara è la tonalità di grigio osservata. La diagonale presenta il confronto di ogni individuo con sé stesso. La proporzione di punti con colorazione grigio scuro è invece un indicatore di diversità genetica all'interno della popolazione.

Figura 43:IBS per campione



DISCUSSIONE

Ricerca e Validazione di SNP in geni candidati per la qualità della carne

L'identificazione di marcatori molecolari utili per il miglioramento genetico della produzione e della qualità della carne suina e l'integrazione di queste informazioni con i sistemi di selezione tradizionali potranno portare ad importanti innovazioni nel settore, con vantaggi sul piano dell'efficienza della selezione. In quest'ottica, uno degli obiettivi del presente lavoro di tesi è stato l'identificazione di polimorfismi in sette geni suini (CAPNS1, CRADD, PTPRD, PIK3R2, INPP1, PLCG1 e CDKN1). Si è scelto di studiare questi geni perché, in un precedente lavoro di genomica funzionale, erano risultati appartenere a categorie funzionali quali controllo del metabolismo, crescita corporea, crescita del muscolo e sistema dell'insulina che possono influenzare la qualità della carne (Iacuaniello et al., 2007). Inoltre, questi geni erano risultati localizzati nelle stesse regioni cromosomiche di QTL per la qualità della carne (Iacuaniello et al., 2008). In particolare, il gene CRADD mappa sul cromosoma 5 suino vicino a un QTL relativo al tasso d'incremento ponderale giornaliero (Lee et al., 2003), il gene INNP1 mappa sul cromosoma 15 vicino ad un marcatore associato ad un QTL per il colore della carne suina (De Koning et al., 2001), il gene PLGC1 è localizzato sul cromosoma 17, vicino ad un marcatore associato ad un QTL per la lunghezza della carcassa (Pierzchala et al., 2003). I geni PIK3R2 e CDKN1 mappano entrambi sul cromosoma 2 e , sebbene il primo si trovi sul braccio cromosomico lungo e il secondo su quello corto, risultano entrambi nelle stesse regioni di QTL per lo spessore del lardo dorsale (Rattink et al., 2000; Bidanel et al., 2001). Infine, sul cromosoma 6 suino il marcatore più prossimo al gene CAPNS1 risulta essere il gene RYR1, per la sensibilità all'alotano, che determina anche importanti effetti sulla qualità e quantità di produzione di carne (Sellier, 1998; Monin et al., 1999). Inoltre, alcuni studi (Malek et al., 2001; Ovilio et al., 2002; de Koning et al., 1999) ipotizzano che molto vicino a questo locus siano presenti altri geni con effetto importante sui caratteri legati alla produzione di carne.

La ricerca di SNP è stata condotta in una popolazione di 231 suini italiani ibridi Large White x Landrace, allevati in condizioni omogenee; per l'attività di "SNP discovery" sono stati analizzati 22 animali che costituiscono, in questa popolazione, gli individui estremi per tre caratteri, ossia lo spessore del lardo, la compattezza delle masse muscolari e la componente principale 1 (PRIN1), ottenuta da una analisi multivariata di otto caratteri fenotipici inerenti la qualità delle cosce, rilevati alla macellazione e al momento della rifilatura. I primi due caratteri considerati (spessore del lardo e compattezza delle masse muscolari) sono invece ben definiti dal punto di vista biologico.

Dei nove SNP inizialmente identificati mediante analisi PCR-SSCP e successivo sequenziamento dei frammenti risultati polimorfici, solo cinque mostravano una frequenza dell'allele minore (MAF, Minor Allele Frequency) maggiore del 5% nei 22 animali analizzati e sono stati quindi considerati

per le successive analisi di associazione: due SNP situati nel gene CRADD, due SNP nel gene PTPRD e uno SNP nel gene PIK3R2.

Il gene CRADD (CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain) si trova sul cromosoma suino 5. La proteina codificata da questo gene possiede un dominio chiamato CARD/DD che induce apoptosi. Questo dominio è presente in una vasta gamma di proteine tipicamente coinvolte in processi di regolazione dell'infiammazione in risposta ad agenti patogeni batterici e virali e in processi di induzione di apoptosi cellulare.

Due sono gli SNP del gene CRADD identificati e validati nel presente lavoro di tesi. Lo SNP (g343[A/G]) si trova nella tripletta AG[A/G] che codifica per l'aminoacido arginina; la mutazione da A a G non varia l'aminoacido codificato. Si tratta quindi di uno SNP sinonimo (box 25).

Lo SNP (g859[C/T]) si trova invece in una regione dell'esone che non risulta tradotta in proteina. E' da notare però che la proteina CRADD suina presente in banca dati ha una lunghezza di 123 aminoacidi, mentre nell'uomo e nel topo la proteina omologa è lunga 199 aminoacidi. Questo ci porta ad ipotizzare che in realtà l'informazione su questa proteina suina non sia ancora completa.

Box 25: Porzione della sequenza del mRNA del gene CRADD dove è presente lo SNP (g343[A/G]) e porzione della corrispondente sequenza aminoacidica. In giallo è evidenziato il codone contenente lo SNP e il corrispondente aminoacido codificato.

Gene CRADD SNP (g343[A/G])	
..GAT-TCC-CTG-CAG-GAA-TTC-CCT-TGG-GTA- AGA -GAG-AAG-CTG-GAG-AAG-GCA-AGA...	... D---S---L---Q---E---F---P---W--- V--- R ---E---K---L---E---K---L---E... .
..GAT-TCC-CTG-CAG-GAA-TTC-CCT-TGG-GTA- AGG -GAG-AAG-CTG-GAG-AAG-GCA-AGA...	... D---S---L---Q---E---F---P---W---V--- R ---E---K---L---E---K---L---E... .

Dallo studio di associazione con caratteri fenotipici condotto sulla popolazione di 231 suini ibridi Large White x Landrace, lo SNP (g343[A/G]) del gene CRADD ha mostrato una buona associazione con la compattezza delle masse muscolari ($P < 0.05$). Quando però questo SNP è stato utilizzato per un'analisi di associazione con gli EBV del lardo dorsale in una popolazione di suini di razza Large White, la mutazione non è risultata correlata a questo carattere.

In un recente lavoro di Ramos et al. (2009), tuttavia, è stato identificato uno SNP nella regione 5'UTR del gene CRADD suino; questa mutazione è poi risultata associata in modo significativo ($P < 0,05$) a tratti fenotipici legati alla qualità della carne, quali l'accrescimento muscolare e la copertura adiposa. L'associazione di questo polimorfismo con la copertura adiposa non deve

sorprendere, in quanto studi precedenti effettuati sul topo avevano già evidenziato il ruolo del gene CRADD nello sviluppo degli adipociti; in questa specie, infatti, è stato osservato che la sovra-espressione di questo gene inibisce la differenziazione degli pre-adipociti (Felmer et al. 2003). Pertanto, l'esistenza di queste associazioni tra il gene CRADD e tratti fenotipici legati alla qualità della carne sottolineano l'importanza di questo gene quale candidato per la qualità della carne.

Un altro gene indagato in questa tesi è stato il gene PTPRD (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta), che è stato localizzato sul cromosoma 1 suino, cromosoma sul quale sono stati mappati anche alcuni geni con effetto sull'accrescimento, come ad esempio il gene MC4R.

La proteina codificata dal gene PTPRD è un membro della famiglia delle proteine tirosin-fosfatasi (PTP). Queste ultime sono note per essere proteine di segnale coinvolte in una varietà di processi cellulari tra cui la crescita cellulare, la differenziazione, il ciclo mitotico e la trasformazione oncogena. Inoltre, studi relativi a questi geni condotti nei polli hanno suggerito il ruolo di questa proteina nel promuovere la crescita dei neuriti e la regolazione degli assoni dei neuroni. Tali studi hanno dimostrato inoltre che una delezione in questo gene causa ritardo nella crescita (Noriko Uetani et al, 2000).

Nel presente studio, sono stati individuati e validati due polimorfismi in questo gene, lo SNP g29962[A/G]) e lo SNP g30194[G/T].

Sulla sequenza codificante del gene, lo SNP g29962[A/G]) si trova nella tripletta TT[C/T]) che codifica per l'aminoacido fenilalanina; si tratta di uno SNP sinonimo in quanto la mutazione da C a T non cambia l'aminoacido codificato (box26).

Sulla sequenza codificante del gene, lo SNP g30194[G/T] si trova nella tripletta TCC che codifica per l'aminoacido serina; la mutazione puntiforme causa la variazione di questa tripletta in TAC che codifica per l'aminoacido tirosina (box26). In questo caso si tratta quindi di uno SNP non sinonimo. Serina e tirosina sono entrambi aminoacidi con gruppi R non polari, quindi la mutazione non dovrebbe cambiare eccessivamente il punto isoelettrico del peptide codificato; ciò nonostante l'aminoacido mutato potrebbe causare una modifica tridimensionale della molecola con effetti sulla sua funzionalità.

Box 26: Porzioni della sequenza del mRNA del gene PTPRD contenenti lo SNP g29962[C/T] e lo SNP g30194[C/A] e della corrispondente sequenza aminoacidica.

In giallo sono evidenziati i codoni contenente gli SNP e i corrispondenti aminoacidi codificati.

Gene PTPTD	
SNP g29962[C/T]	
..GGG-CCA-TAT-AGT-CCC-AGT-GTC-CAG- TTC -AGG-ACA-CTG-CCT-GTG-GAT-CAA-GTG-TTT-GCA..	...G---P---Y---S---P---S---V---Q--- F ---R---T---L---P---V---D---Q---V---F---A..
GGG-CCA-TAT-AGT-CCC-AGT-GTC-CAG- TTT -AGG-ACA-CTG-CCT-GTG-GAT-CAA-GTG-TTT-GCA-	...G---P---Y---S---P---S---V---Q--- F ---R---T---L---P---V---D---Q---V---F---A..
SNP g30194[C/A]	
..TCA-GAA-GGC-ACC-ACG-TCA-ACC- TCC -GTC-CAG-TTA-TCT-TGG-CAG-CCA-CCT-GTC-TTG-GCC..	...S---E---G---T---T---S---T--- S ---V---Q---L---S---W---Q---P---P---V---L---A..
..TCA-GAA-GGC-ACC-ACG-TCA-ACC- TAC -GTC-CAG-TTA-TCT-TGG-CAG-CCA-CCT-GTC-TTG-GCC..	...S---E---G---T---T---S---T--- Y ---V---Q---L---S---W---Q---P---P---V---L---A..

Dei due polimorfismi individuati nel gene PTPRD, in seguito allo studio di associazione con caratteri fenotipici condotto sulla popolazione di 231 suini ibridi Large White x Landrace, solo lo SNP g30194[G/T] ha mostrato una buona associazione con la compattezza delle masse muscolari ($P < 0.05$) e con lo spessore del lardo dorsale ($P < 0.05$). Purtroppo, nell'analisi di associazione con gli EBV del lardo dorsale nella popolazione di suini di razza Large White, questo polimorfismo è risultato fissato, in quanto tutti gli animali sono risultati omozigoti GG in questa posizione.

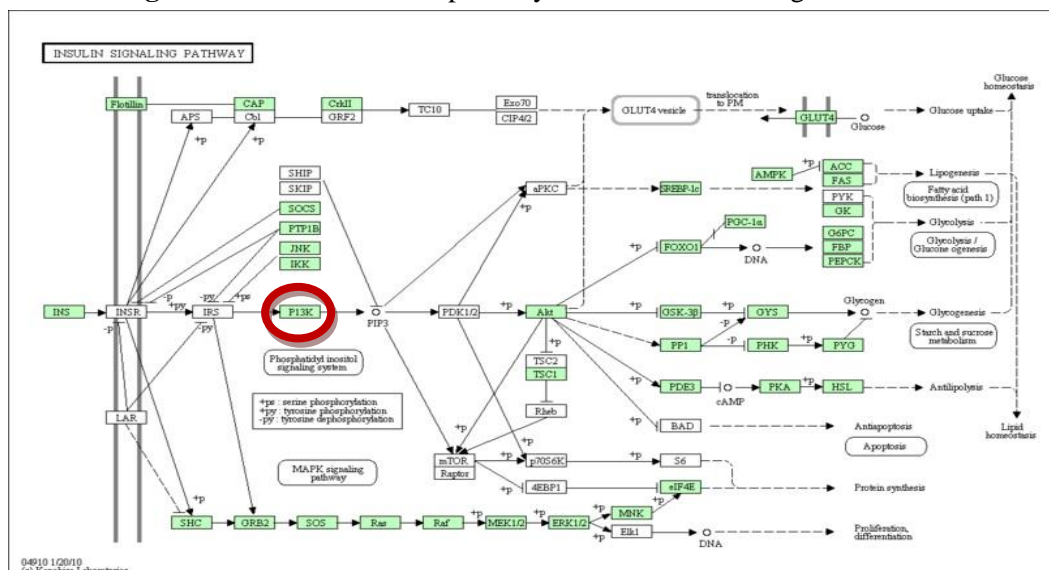
Dallo studio sulla popolazione di 231 suini ibridi Large White x Landrace lo SNP g29962[A/G] non mostrava associazioni positive con nessuno dei fenotipi considerati. Quando lo stesso SNP è stato analizzato nella popolazione di circa 600 suini di razza Large White, è risultata invece esserci una correlazione significativa ($P = 0,0251$) con l'EBV del peso della coscia. Poiché si tratta di uno SNP sinonimo, che non varia la composizione aminoacidica del peptide codificato, questa associazione suggerisce la possibilità che lo SNP individuato, pur non essendo una mutazione causativa, possa comunque trovarsi in linkage con un QTL che influenza uno o più caratteri legati alla qualità della carne.

Il terzo gene indagato è il gene PIK3R2 (Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit- β ; chiamata anche p85 β). Le fosfatidilinositolo 3-chinasi sono una famiglia di enzimi coinvolti in funzioni cellulari quali la crescita cellulare, la proliferazione, la differenziazione, la motilità, la

sopravvivenza e il traffico intracellulare. Questi enzimi sono chinasi che fosforilano l'anello di inositolo del fosfatidilinositolo (e di composti simili). Il prodotto di questa reazione funge da secondo messaggero nel pathway della crescita. La famiglia delle fosfatidilinositolo 3-chinasi è suddivisa in tre diverse classi, in base alla struttura primaria, alla regolazione e alla specificità del substrato lipidico. La PIK3 chinasi, in particolare, interagisce con il recettore dell'insulina (IRS, Insuline Receptor Substrate), regolando l'assorbimento di glucosio attraverso una serie di eventi di fosforilazioni. (figura 44). La proteina PIK3R2 ha quindi un ruolo nei processi metabolici e di differenziazione cellulare regolati dall'insulina. Molte delle informazioni disponibili su questo pathway derivano da studi sui topi (Glass et al., 2005), dove è stato visto che, in seguito all'attivazione del pathway delle fosfatidilinositolo 3-chinasi, il fattore di crescita IGF1 (Insulin-like growth factor 1) induce un'ipertrofia del muscolo scheletrico (Glass DJ, 2003). Molte delle interazioni di questo complesso sono illustrate in figura 44, dove è mostrato anche come il meccanismo di sintesi delle proteine sia combinato con la degradazione delle stesse. Infatti l'attivazione del pathway PI3K/Akt non solo incrementa la sintesi delle proteine ma può anche provocarne la degradazione producendo cataboliti e riducendo la perdita delle proteine muscolari (atrofia miofibrillare), (Bodine et al., 2001; Stitt et al., 2004).

Il gene PIK3R2 è stato da noi mappato sul cromosoma 2 (Iacuanello et al., 2008). Il cromosoma 2 suino è fra i cromosomi oggetto di intensi studi per l'identificazione di QTL; in particolare, nella regione telomerica del braccio corto, dove mappa il gene IGF2, è stato identificato un QTL con effetti sul deposito di grasso e sull'accrescimento muscolare che manifesta imprinting paterno (Jeon et al., 1999; Nezer et al., 1999). Anche in altre regioni di questo cromosoma sono stati identificati QTL per lo spessore del lardo dorsale e la tenerezza della carne.

Figura 44: Descrizione del pathway in cui è coinvolto il gene PIK3R2



Nel gene PIK3R2 è stato da noi identificato e validato lo SNP g.3008 [C/T]. Questo SNP si trova nell'esone 15 del gene, in una regione che viene esclusa dalla traduzione. Ciò nonostante, una ricerca effettuata in banca dati (<http://www.targetscan.org/>) ci ha permesso di identificare una sequenza di 23 paia di basi (mostrata nel box27), localizzata 55 nucleotidi a monte dello SNP g.3008 [C/T], totalmente identica alla sequenza di un microRNA noto nell'uomo, chiamato miRNA-30.

Box 27: Parte di sequenza dell' esone 15 del gene PIK3R2. In giallo è evidenziata la sequenza dell'ipotetico microRNA identificato. In nero sono indicati i nucleotidi tradotti, in viola la parte dell'esone non tradotta.

PIK3R2

Chromosome:Scrofa9:2:62398944:62399642:1

```

GGTGGACGGCGACACCAAGCACTGCGTCATCTACCGCACGGCCACAGGCTTCGGCTTCGCGGAGCCCTACAAC
TTGTACGGGTCCCTGAAGGAGCTGGTGCTGCACTATCAGCACGCCCTCGCTGGTGCAGCACAACGATGCGCTCA
CCGTCACCCCTCGCCACCCAGTGCGCGCCCCGGGCCCTGGGCCCCACCTGCTGCCCGCTGAGCGCTGAGCAG
GAGAACCGGCTCCGGATCAGAGCCACCCACGCGCCAGAGGCTAGGGTGGCAGCTGCATCCGGGATCTCTATC
TTTCTGAATCTGTCTCTTCTTTCTTAGGTTTTCTCTGTCTGTCTCTTTGTGAATCTCTCCAGTGAATCTCCA
TTTGAGGTTCTATCAGTCTTCTCCCAAGTCTGCCTGTCTCTGTCTCCCTCTGTCACTATTCTGTCTCTT
TCTAGTTCATCTGTCTCTTTTCTCTCTGGTCTCTGTCTCTGTGTATCTGTGTTGGGGTCCCGCCTC
CCCCACGCCCTATCCCCCTTCCCCACTGGCACCGCTCTCCCTACGGCTCTGGCCACCCACGA [C/T] GACC
TGTGTCTTCCCCGCCCCGCGAGGCCCGGGTCCCCACAAGCCCCACCTGGCTGCACCTGCCATGTTTACA
GAGGCCCTGGGCTGCGCAGCCCCAGCCTGGGTGCCCGATTTTT

```

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA endogeni a singolo filamento, di lunghezza pari a 19-25 nucleotidi, che regolano l'espressione genica post-trascrizionale tramite interazione sequenza-specifica con l'estremità 3'UTR dell'mRNA bersaglio. Questa interazione può comportare repressione della traduzione e/o taglio dell'mRNA bersaglio con conseguente impossibilità per l'mRNA di essere tradotto in proteina (Singh et al., 2008). I miRNA si formano a partire da un precursore (pre-miRNA) di lunghezza maggiore, che viene poi tagliato da specifiche ribonucleasi che determinano la formazione del miRNA maturo (Lee et al. 2003; Denli et al., 2004).

Il miRNA da noi identificato è ancora sconosciuto nel suino. L'omologo miRNA-30 umano interagisce con la proteina p53 e pertanto lo si ritiene coinvolto nella regolazione dell'apoptosi e della crescita cellulare (Jincheng et al.,2010). Data la vicinanza dello SNPg.3008 [C/T] alla sequenza del miRNA suino, si può ipotizzare la collocazione di questo polimorfismo nella regione promotore del miRNA stesso. Si tratta ovviamente di semplici supposizioni, in quanto, al momento, ancora non esistono (nemmeno per l'uomo) sequenze di promotori di miRNA depositate in banca dati. Pertanto, solo con l'aumentata disponibilità di informazioni sulle sequenze dei miRNA e sui loro meccanismi di regolazione sarà possibile avere comprendere, anche nella specie suina, sui

fenomeni complessi di regolazione dell'espressione genica in cui sono coinvolti.

Lo studio sulla popolazione di 231 suini ibridi Large White x Landrace ha mostrato un'ottima associazione dello SNP identificato nel gene PIK3R2 con la compattezza delle masse muscolari e lo spessore del lardo dorsale ($P < 0.01$). Questo risultato ci ha spinto ad indagare anche l'associazione di questo polimorfismo con tutti gli otto caratteri fenotipici inerenti la qualità delle cosce rilevati alla macellazione e al momento della rifilatura. Questo studio ha mostrato l'esistenza di differenze significative su alcuni caratteri fenotipici (marezzatura, copertura adiposa e spessore del grasso) per il genotipo a questo SNP. In particolare, per quanto riguarda i fenotipi misurati, il genotipo CC presenta valori inferiori di marezzatura, copertura adiposa e spessore del grasso rispetto agli altri genotipi. Bisogna però tener presente che nei punteggi assegnati alla marezzatura e alla copertura adiposa il valore 1 corrisponde ad un giudizio ottimo e il valore 5 a insufficiente. Pertanto il genotipo CC risulta positivamente associato al grado di marezzatura e di copertura adiposa.

Anche lo SNP identificato nel gene PIK3R2 è stato analizzato in un'altra popolazione, costituita, in questo caso, da 600 animali appartenenti a tre razze differenti: Large White italiana, Duroc italiana e Landrace italiana. Per ciascuna razza erano stati individuati due gruppi di 100 animali con EBV estremi per l'incremento ponderale medio giornaliero. Negli animali di razza Landrace il genotipo omozigote CC a questo SNP è risultato essere significativamente associato ($P < 0.05$) con gli EBV per l'incremento medio giornaliero, con lo spessore del lardo dorsale, con i tagli magri, con l'indice di conversione alimentare e con il peso della coscia.

Dal confronto fra i dati ottenuti sulla popolazione di 231 suini ibridi rispetto a quelli ottenuti dall'analisi dei valori genetici degli animali ostituenti la popolazione di 600 individui appartenenti a tre razze differenti, si osserva come in entrambe le popolazioni il genotipo CC allo SNP analizzato presenti degli effetti favorevoli. Nello specifico, questo genotipo mostra nella razza Landrace un effetto favorevole sui valori genetici dell'incremento ponderale medio giornaliero e un effetto favorevole sui caratteri fenotipici marezzatura e copertura adiposa nella popolazione costituita dai 231 suini ibridi Large White x Landrace.

Queste analogie potrebbero far ipotizzare che lo SNP analizzato sia la mutazione causativa responsabile dell'effetto osservato sui caratteri quantitativi considerati. D'altra parte, il fatto che delle tre razze analizzate sia stato osservato un effetto favorevole solo nella Landrace porta invece ad ipotizzare lo SNP analizzato non sia la mutazione causativa responsabile dell'effetto sui caratteri quantitativi ma possa essere un marcatore associato a tale mutazione. Le differenze tra razze potrebbero quindi essere attribuibili alle diverse fasi dell'associazione tra SNP e mutazione

causativa. Un'altra ipotesi potrebbe essere la presenza nelle razze Large White e Duroc di particolari effetti di interazione ed epistasi che nascondano in qualche modo l'effetto dello SNP in esame.

In ogni caso, si può affermare che lo SNP analizzato è di grande interesse e che merita di essere ulteriormente indagato per identificare le mutazioni causative degli effetti osservati ai fini di un suo auspicabile utilizzo per il miglioramento genetico della qualità della carne nei suini.

Applicazione dell'analisi genomica alla specie suina

Un altro obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare l'unicità di un nuovo tipo genetico, il suino Nero di Garlasco, mediante la ricerca di alleli e/o di combinazioni alleliche uniche, utili per la successiva messa a punto di una strategia per l'utilizzazione economica di questi animali ai fini produttivi. Nell'area della Lomellina, in provincia di Pavia, è infatti in corso un intervento teso a recuperare una antica razza autoctona, la razza di Garlasco, che un tempo popolava questa zona. Nel processo di costituzione della nuova popolazione si è adottato l'incrocio di soggetti che presentassero, almeno in parte, le caratteristiche riconducibili all'antico tipo genetico con femmine di razza Large White. Nel giro di alcuni cicli riproduttivi l'intenso piano di incrocio ha permesso di giungere ad un primo nucleo di esemplari riconducibile nell'aspetto all'antico tipo genetico. Allo scopo di identificare "Firme Genetiche" che caratterizzino questi animali, i 96 soggetti appartenenti al Nero di Garlasco più rappresentativi di questo tipo genetico sono stati sottoposti ad uno screening genomico di circa 60.000 polimorfismi noti mediante l'utilizzo del Porcine SNP60 BeadChip, già testato e validato su soggetti appartenenti a razze cosmopolite (Ramos et al, 2009). I dati di genotipizzazione ottenuti sono ancora in una prima fase di elaborazione. In particolare è stata fatta una descrizione della popolazione soffermandosi sull'osservazione degli SNP ottenuti, la loro numerosità, significatività e distribuzione, nonché le prime informazioni circa la struttura genetica della popolazione. Si può innanzitutto osservare il buon esito del saggio di genotipizzazione svolto con il BeadChip 60K sulla popolazione oggetto di studio: il 93% degli SNP è infatti stato genotipizzato. L'analisi di questi dati porta ad una serie di considerazioni fondamentali per i prossimi passi da compiere e le strategie da scegliere per la ricerca di firme genetiche nella popolazione considerata. Tra i risultati mostrati, risulta particolarmente interessante la frequenza MAF (Minor Allele Frequency), che indica la frequenza dell'allele con lo SNP minore nella popolazione, il quale spesso (ma non sempre) coincide con lo SNP di interesse.

Si tratta di un valore che oscilla tra 0.0 e 0.5, a seconda che l'allele minore sia del tutto assente o abbia una frequenza equivalente a quello maggiore. Nei nostri studi quasi 25.000 SNP hanno una

frequenza MAF compresa tra 0 e 0.05, ma 10.586 hanno un valore inferiore o uguale a 0, identificando gli SNP monomorfici. Questi ultimi che vengono generalmente esclusi da eventuali analisi successive, potrebbero in questo caso costituire le firme genetiche che caratterizzano questo tipo genetico, differenziandolo da tutte le altre popolazioni. Per verificare quest'ipotesi sono richieste ulteriori analisi statistiche di confronto con i genotipi delle razze di riferimento per evidenziare gli eventuali polimorfismi presenti esclusivamente nel Nero di Garlasco.

INDICI DI TABELLE, FIGURE E BOX

Indice delle Tabele

Tabella 1: Acquisti domestici di carni suine.....	5
Tabella 2: Prezzo della carne suina nel 2007.....	6
Tabella 3: Acquisti di carne suina e salumi in Italia nel biennio 2008-2009.....	7
Tabella 4: Numerosità delle aziende suinicole per classi di consistenza e capi	7
Tabella 5: Tipi genetici dei suini conferiti per la macellazione.....	12
Tabella 6: Obiettivi e criteri di selezione per la qualità della carne.....	26
Tabella 7: Risposta media annua alla selezione nelle razze per la produzione del suino pesante	28
Tabella 8: Indici genetici dei verri Large White con genitori italiani o esteri	29
Tabella 9: Dati sull'indice genetico prolificità	30
Tabella 10: Elenco dei principali geni associati a caratteristiche produttive e riproduttive	30
Tabella 11: Principali QTL per la qualità della carne suina	45
Tabella 12: Principali QTL per i caratteri riproduttivi femminili.....	45
Tabella 13: Principali marcatori associati alla qualità della carne nei suini.....	51
Tabella 14: Elenco dei soggetti della popolazione campionata.	66
Tabella 15: reagenti necessari per la retroscrittura.....	70
Tabella 16: numero di coppie di primer disegnate per ciascun gene per l'analisi PCR-SSCP.....	73
Tabella 17: numero di coppie di primer disegnate per ciascun gene per l'analisi PCR-SSCP.....	84
Tabella 18: Geni candidati per la qualità della carne suina	101
Tabella 19: autovalori della matrice dei coefficienti di correlazione	102
Tabella 20: Risultati della PRIN1 nei fenotipi studiati per la qualità della carne.....	102
Tabella 21: Correlazione tra i caratteri scelti nell'analisi e la valutazione finale.....	103
Tabella 22: Valutazione ottenuta dagli animali delle code positive per i tre caratteri considerati .	104
Tabella 23: Valutazione ottenuta dagli animali delle code negative per i tre caratteri considerati	104
Tabella 24: Risultati delle analisi allo spettrofotometro NanoDrop del cDNA dei 22 animali.....	105
Tabella 25: Risultati delle analisi NanoDrop di un campione rappresentativo della popolazione .	106
Tabella 26: Elenco degli SNP nei geni CRADD, PTPRD e PIK3R2 con MAF > 0,05	118
Tabella 27: Analisi di associazione tra gli SNP identificati ed i tre caratteri studiati	119
Tabella 28: Media stimata ed errore standard per genotipo allo SNP	120
Tabella 29: Distribuzione dei genotipi per lo SNP del gene PIK3R2 nelle razze indagate.....	120
Tabella 30: Analisi di associazione dello SNP del gene PIK3R2 con gli EBV considerati	120
Tabella 31: Test dell'ANOVA, il livello di significatività è $p < 0,05$ (*)......	121
Tabella 32: analisi di associazione degli SNP individuati negli animali di razza Large White.	122
Tabella 33: Tipi di colorazione del mantello dei 96 soggetti campionati.....	124
Tabella 34: Risultati ottenuti dalle analisi Nanodrop dei 96 campioni scelti per le analisi.....	125
Tabella 35: Call Rate e numero di marcatori	126
Tabella 36: Statistiche Call Rate per cromosoma.....	127
Tabella 37: Numero e percentuale di marcatori per cromosoma in quattro classi di Call Rate	128
Tabella 38: Distribuzione di frequenza MAF	129
Tabella 39: Statistiche SNP per individuo.....	130

Indice delle Figure

Figura 1: Soggetto di razza Large White	12
Figura 2: Soggetto di Landrace italiana	13
Figura 3: Soggetto di razza Landrace belga	14
Figura 4: Soggetto di razza Duroc	14
Figura 5: Soggetto di razza Pietrain.....	15
Figura 6: Soggetto di razza Hampshire	16
Figura 7: Soggetto di razza Spot.....	16
Figura 8: Soggetto di razza Cinta Senese	18
Figura 9: Soggetto di Mora Romagnola	18
Figura 10: Soggetto di razza Nero di Sicilia.....	19
Figura 11: Soggetto di razza Casertana	20
Figura 12: Soggetto di razza Calabrese	20
Figura 13: Soggetti di razza Sarda	21
Figura 14: Soggetto di Nero di Parma	22
Figura 15: Suino Nero della Lomellina	23
Figura 16: Struttura del muscolo scheletrico	31
Figura 17: Copertura della mappa genomica nei cromosomi suini	41
Figura 18: Schema di funzionamento delle Tecnologie Next Generation Sequencing	57
Figura 19: Maxwell™ 16, Automated Genomic DNA Purification.....	72
Figura 20: NanoDrop	73
Figura 21: Rappresentazione schematica della tecnica PCR-SSCP	93
Figura 22: Distribuzione della popolazione in relazione a PRIN1 e spessore del lardo.....	103
Figura 23: PCR-SSCP per PLCG	107
Figura 24: Polimorfismo identificato nel gene PLCG	108
Figura 25: Allineamento tra l'esone contenente lo SNP e la sequenza del gene PLCG	109
Figura 26: PCR-SSCP per CAPNS1.....	109
Figura 27: Polimorfismo identificato nel gene CAPNS1	110
Figura 29: Polimorfismi identificati nel gene CRADD	111
Figura 28: PCR-SSCP per CRADD	111
Figura 30: Allineamento tra l'esone contenente lo SNP e la sequenza del gene CRADD.....	112
Figura 32: Polimorfismo identificato nel gene PTPRD.....	113
Figura 33: Allineamento tra l'esone contenente gli SNP e il gene PTPRD	113
Figura 31: PCR SSCP per PTPRD	113
Figura 34: PCR-SSCP per INPP1	114
Figura 35: Polimorfismi identificati nel gene INPP1	115
Figura 36: Allineamento tra l'esone contenente gli SNP e il gene INPP1	116
Figura 38: Polimorfismo identificato nel gene PIK3R2	116
Figura 37: PCR-SSCP per PIK3R2	116
Figura 39: Allineamento tra l'esone contenente lo SNP e il gene PIK3R2.....	117
Figura 40: Risultati ottenuti dalla genotipizzazione di SNP del CRADD e del PTPRD.....	122
Figura 41: Istogramma call rate	126
Figura 42: Istogramma di distribuzione MAF	129
Figura 43: IBS per campione	132
Figura 44: Descrizione del pathway in cui è coinvolto il gene PIK3R2	138

Indice dei Box

Box1: Sequenza di mRNA del gene PIK3R2 e disegno dei primer	73
Box2: Sequenza di mRNA del gene INPP1 e disegno dei primer	75
Box3: Sequenza della regione 1-1860 di mRNA del gene PLCG e disegno dei primer	76
Box4: Sequenza della regione 1861-3660 di mRNA del gene PLCG e disegno dei primer	77
Box5: Sequenza della regione 3661-4854 di mRNA del gene PLCG e disegno dei primer	78
Box6: Sequenza di mRNA del gene CAPNS1 e disegno dei primer	79
Box7: Sequenza di mRNA del gene CDKN1C e disegno dei primer	80
Box8: Sequenza di mRNA del gene CRADD e disegno dei primer	81
Box9: Sequenza della regione 1-1920 di mRNA gene PTPRD e disegno dei primer	82
Box10: Sequenza della regione 1921-3257 di mRNA del gene PTPRD e disegno dei primer	83
Box11: Sequenza parziale del gene PIK3R2 e disegno dei primer.....	85
Box12: Sequenza parziale del gene PIK3R2 e disegno dei primer.....	86
Box13: Sequenza parziale del gene INPP1 e disegno dei primer	87
Box14: Sequenza parziale del gene PLCG e disegno dei primer	88
Box15: Sequenza parziale del gene PLCG e disegno dei primer	89
Box16: Sequenza parziale del gene CAPNS1 e disegno dei primer.....	90
Box17: Sequenza parziale del gene CRADD e disegno dei primer.....	91
Box18: Sequenza parziale del gene PTPRD e disegno dei primer	92
Box19: Sequenza parziale del gene PLCG con la posizione dello SNP identificato	108
Box 20: Sequenza parziale del gene CAPNS1 con la posizione dello SNP identificato.....	110
Box 21: Sequenza parziale del gene CAPNS1 con la posizione degli SNP identificati.....	112
Box 22: Sequenza del gene PTPRD con la posizione degli SNP identificati.....	114
Box 23: Sequenza del gene INPP1 contenente gli SNP identificati	115
Box 24: Sequenza del gene PIK3R2 contenente lo SNP identificato.....	117
Box 25: Sequenza del CRADD per lo SNP A/G e corrispondente sequenza aminoacidica..	135
Box 26: Sequenza del PTPRD per gli SNP C/T e C/A e corrispondente sequenza aminoacidica. .	137
Box 27: Sequenza dell'esone 15 del gene PIK3R2 con l'ipotetico microRNA identificato.	139

BIBLIOGRAFIA

- Agca C., Ries J. E., Kolath S. J., Kim J-H., Forrester L.J., Antoniou E, Whitworth K.M, Mathialagan N., Springer G. K., Prather R.S, Lucy M. C. (2006).
Luteinization of porcine preovulatory follicles leads to systematic changes in follicular gene expression.
Reproduction, 132, 133-145
- Alexander L.J., Smith T.P.L., Beattie C.W., Broom M.F (1997).
Construction and Characterization of a large insert porcine YAC library
Mammalian Genome, 8, pp 50-51
- Andersson L., Archibald A.L., Gellin J., Schook L.B. (1993).
1st Pig Gene Mapping Workshop (PGMI), 7 August 1992, Interlaken, Switzerland.
Animal Genetics, 24, pp.205-216.
- Andersson L., Haley C.S., Ellegren H., Knott S.A, Johansson M., Andersson K., Andersson-Eklund L., Edfors-Lilja I., Fredholm M., Hansson I., Hakansson J., Lundstom K.(1994).
Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs
Science, 263, pp. 1771-1774.
- Anderson S.I., Lopez-Corrales N.L., Gorick B., Archibald A.L (2000).
A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector
Mammalian Genome, 11, pp 811–814
- Andersson L, (2001).
Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animal.
Nature Reviews Genetics, 2, pp130–138.
- Andersson L, Georges M. (2004).
Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits.
Nature Reviews Genetics, 5, pp 202-212.
- Archibald A.L., Haley C.S., Brown J.F, Couperwhite S., et al. (1995).
The PiGMaP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa)
Mammalian Genome, 6, pp 157-175.
- Archibald A.L., Bolund L., Churcher C., Fredholm M., Groenen M., Harlizius B., Tai-Lee K., Milan D., Rogers J., Rothschild M., Uenishi H., Wang J., Schook L. B.(2010).
Pig genome sequence - analysis and publication strategy
BMC Genomics, 11, p. 438
- Balasini D. (2001).
Zootecnia applicata tecniche di allevamento alimentazione selezione, specie razze d'interesse economico-Suini.
Edagricole, Bologna., 3, p.7 Le razze suine aventi il L.G. in Italia; 7, p.31, La riproduzione suina.

- Barnes B., Marklund S., Steiler T.L., Walter M., Hjalm G., Amargen V., Mahlapuu M., Leng Y., Johansson L., Galuska D., Lindgren K., Abrink M., Stapleton D., Zierath J.R., Andersson L. (2004). *The 5'-AMP-activated Protein Kinase γ 3 Isoform Has a Key Role in Carbohydrate and Lipid Metabolism in Glycolytic Skeletal Muscle*. The Journal of Biological Chemistry, 279, pp. 38441-38447.
- N. H. Barton (2000). *Genetic hitchhiking*. Philosophical Transactions of the Royal Society, 1403, pp. 1553-1562.
- Bassam B., Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. (1991). *Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels*. Analytical Biochemistry, 196, pp. 80-83.
- Bendixen C, Hedegaard J, Horn P (2005). *Functional genomics infarm animals - Microarray analysis*. Meat Science, 71, pp. 128–137
- Bidanel J.-P., Milan D., Iannucelli N., Amigues Y., et al. (2001). *Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs*. Genetic Selection, 33, pp. 289–309.
- Buttazzoni L., Gallo M., Baiocco C., Carchedi G. (1993). *La selezione per la qualità della carne suina destinata alla trasformazione*. Rivista di suinicoltura, 4., pp. 139-145.
- Brascamp E. W., van Arendonk J.A.M (1999). *Detection of Quantitative Trait Loci for Backfat Thickness and Intramuscular Fat Content in Pigs (Sus scrofa)*. Genetics, 152, pp. 1679-1690.
- Caetano A.R., Johnson R.K., Pomp D. (2003). *Generation and sequence of characterization of a normalized cDNA library from swine ovarian follicles*. Mammalian Genome, 14, pp. 65-70
- Carnier P., Cassandro M., Knol E., Padoan D. (1999) *Genetic parameters for some carcass and fresh ham traits of crossbred Goland pigs*. Recent progress in animal science , 1, pp 221-223
- Cassady J.P., Johnson R.K., Pomp D., Rohrer G.A., Van Vlech L.D., Spiegel E.K., Gilson K.M. (2001). *Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs* Journal of Animal Science, 79, pp. 623-633
- Cepica S, Stratil A, Kopečný M, Blasková P, Schróffel J, Davoli R, Fontanesi L, Reiner G, Bartenschlager H, Moser G *et al.* (2003). *Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 4*. Journal of Animal Breeding Genetics, 120, pp. 28-37.

- Chang K.C, Beuzen N.D., Hall A.D. (2003).
Identification of microsatellites in expressed muscle genes: assessment of a desmin (CT) dinucleotide repeat as a marker for meat quality.
Veterinary Journal, 165, pp. 157–163
- Chen K., Baxter T., Muir W.M., Groenen M.A., Schook L.B. (2007).
Genetic Resources, Genome Mapping and Evolutionary Genomics of the Pig (Sus scrofa)
International Journal of Biological Sciences, 3(3), pp.153–165.
- Cherel P., Glénisson J., Figwer P., Pires J., Damon M., Franck M., Le Roy P. (2010).
Updated estimates of HAL n and RN- effects on pork quality: Fresh and processed loin and ham.
Meat Science, 86(4), pp.949-954
- Chowdhary, B.P., Raudsepp T., Frönicke L, et al. (1998).
Emerging Patterns of Comparative Genome Organization in Some Mammalian Species as Revealed by Zoo-FISH.
Genome Research 8, pp. 577-589
- Ciobanu D., Bastiaansen J., Malek M., Helm J., Woollard J., Plastow G., Rothschild M. (2001).
Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate activated gamma(3)-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality.
Genetics, 159, pp. 1151–1162
- Ciobanu D., Bastiaansen J., Lonergan S.M, Thomsen H., Dekkers J. C M., Plastow G. S., Rothschild M. F. (2004).
New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs.
Journal of Animal Science, 82, pp 2829–2839.
- Cox B, Kislinger T. (2005).
Integrating gene and protein expression data. Pattern analysis and profile mining.
Methods, 35, pp. 303–14
- Cremonesi P., Castiglioni B., Malferrari G., Biunno I., Vimercati C., Moroni P, Morandi S., Luzzana M. (2006).
Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk.
Journal of Dairy Science, 89, pp. 163-169
- Davies W, Harbitz I, Fries R, Stranzinger G., Hauge J. G. (1998).
Porcine malignant hyperthermia carrier detection and chromosomal assignment using a linked probe.
Animal Genetics, 19, pp. 203–212.
- Davoli R., Braglia S.(2008).
Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality
Briefings in functional genomics and proteomics, 6 (4), pp. 313-321.

- Davoli R., Fontanesi L., Cagnazzo M., Scotti E., Buttazzoni L., Yerle M., Russo V. (2003).
Identification of SNPs, mapping and analysis of allele frequencies in two candidate genes for meat production traits: the porcine myosin heavy chain 2B (MYH4) and the skeletal muscle myosin regulatory light chain 2 (HUMMLC2B).
Animal Genetics, 34 (3), pp. 221-225.
- Davoli R., Zambonelli P., Bigi D., Fontanesi L. & Russo V. (1999).
Analysis of expressed sequence tags of porcine skeletal muscle.
Gene, 233, pp. 181–188.
- Davoli R., Fontanesi L., Zambonelli P. Bigi D, Gellin J, Yerle M, Milc J, Braglia S, Cenci V, Cagnazzo M, Russo V. (2002).
Isolation of porcine expressed sequence tags for the construction of a first genomic transcript map of the skeletal muscle in pig.
Animal Genetics 33, pp. 3–18.
- De Koning D. J., Janss L.L.G, Rattink A.P., van Oers P.A.M., de Vries B.J., Groenen M.A.M., van der Poel J.J., de Groot P. N.,
- De Roes K., Corradini E., Montanari C. (2004).
Suinicoltura italiana e costo di produzione.
Centro Ricerche Produzioni Animali .(C.R.P.A)s.p.a., opuscolo 4.
- Dekkers J. C. M. (2004).
Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons.
Journal of Animal Science, 82, pp E313-E328.
- Denli A.M., Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. (2004).
Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.
Nature, 432, pp.231-235.
- Doerge, R. (2002).
Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations.
Nature Reviews Genetics, 3, pp. 43–52.
- Drogemuller C., Hamann H., Distl O. (2001).
Candidate gene markers for litter size in different German pig lines.
Journal of Animal Science, 79, pp. 2545–2570.
- Dvorak CMT, Hyland KA, Machada JG, Zhang Y, Fahrenkrug SC, Murtaugh M.P. (2005).
Gene discovery and expression profiling in porcine Peyer's patch.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 105, pp. 301-315
- Echard G., Milan D., Yerle M., Lahbib-Mansais Y., Gellin J. (1992).
The gene map of the pig (Sus scrofa domestica L.): a review.
Cytogenetic and Genome research, 61, pp. 146-151
- Eggert J.M., Depreux F.F.S., Schinckel A.P Grant., A.L, Gerrard D.E. (2002)
Myosin heavy chain isoforms account for variation in pork quality.
Meat Science, 61, pp. 117–126

- 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, pp. 1089-1100
- Ennis S., Goverdhan S., Cree A., Hoh J., Collins A., Lotery A. (2007).
Fine-scale linkage disequilibrium mapping of age-related macular degeneration in the complement factor H gene region.
British Journal of Ophthalmology, 91, pp. 966–970.
- Fadiel A, Anidi I, Eichenbaum KD. (2005).
Farm animal genomics and informatics: an update.
Nucleic Acids Research, 33, pp. 6308–18.
- Fahrenkrug S.C., Freking B.A., Smith, T.P.L., Rohrer G.A., Keele J.W.
Single Nucleotide Polymorphism (SNP) discovery in porcine expressed genes.
Animal Genetics, 33 (3), pp. 186–195.
- Fay J., Wu C.I. (2000).
Hitchhiking under positive Darwinian selection.
Genetics, 155, pp. 1405–1413.
- Felmer R, Horvat S., Clinton M., et al. (2003).
Overexpression of raiid cDNA inhibits differentiation of mouse preadypocytes.
Cell proliferation, 36, pp. 45-54.
- 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.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(14), pp 1855–1860.
- Flint J., Corley R., DeFries J.C., Fulker D.W., Gray J.A., Miller S., Collins A.C. (1995).
A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice.
Science, 269, pp. 1432–1435.
- Flori L., Fritz S., Jaffrezic F., Boussaha M., Gu I. et al. (2009).
The genome response to artificial selection: A case study in dairy cattle.
PLoS ONE, 4, p.e6595.
- Fontanesi L., Davoli R., Nanni Costa L., Scotti E., Russo V. (2003).
Study of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: identification and analysis of mutations, linkage and physical mapping and association with meat quality traits in pigs.
Cytogenetic and Genome Research, 102, pp. 145–151.
- Fontanesi L., Davoli R., Nanni C.osta L., Beretti F., Scotti E., Tazzoli M., Tassone F., Colombo M., Buttazzoni L., Russo V. (2008).
Investigation of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: Association with meat quality and production traits in Italian Large White pigs.
Meat Science, 80 (3), pp. 780-787.

- Fontanesi, L., Scotti, E., Buttazzoni, L., Davoli, R., & Russo, V. (2009).
The porcine fat mass and obesity associated (FTO) gene is associated with fat deposition in Italian Duroc pigs.
Animal Genetics, 40, pp. 90–93.
- Fronicke L, Chowdhary BP, Scherthan H, Gustaysson I (1996).
A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOOFISH and gene mapping-based chromosomal homologies.
Mammalian Genome, 7, pp. 285-290.
- Fuji J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V.K., Weiler J.E , O'Brien P.J. MacLennan D.H. (1991).
Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia.
Science, 253(5018), pp. 448-451
- Gahne B., Juneja R.K. (1985).
Prediction of the halothane (Hal) genotypes of pigs by deducing Hal, Phi, Po2, Pgd haplotypes of parents and offspring: results from a large-scale practice in Swedish breeds.
Animal Blood Groups and Biochemical Genetics, 16 (4), pp 265–283.
- Gellin J., Brown S., Marshall J.A., Rothschild M., Schook L., Womack J., Yerle M. (2000).
Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animals.
Mammalian Genome, 11, pp. 140–144.
- Georges M. (1998).
Mapping genes underlying production traits in livestock.
Animal Breeding Technology for the 21st Century. A.J. Clark (Editor). Harwood Academic Publishers, Amsterdam , The Netherlands, pp 77-101.
- Gerbens F., Van Erp A.J:M., Harders F.L., Verburg F., Meuwissen T.H., Te Pas M.F. (1999).
Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance in pigs.
Journal of Animal Science, 77, pp. 846-852.
- Gerbens F., DE Koning D.J., Harders F.L., M Meuwissen T.H., Janns L.L., Groenen M.A., Veerkamp J.H., Van Arendonk J.A.M., Te Pas M.F. (2000).
The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs.
Journal of Animal Science, 78, pp. 552-559.
- Gerbens F., Verburg F., Van Moerkert H.T.B., Engel B., Buist W., Veerkamp J.H., Te Pas M.F.W. (2001).
Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs.
Journal of Animal Science, 79, pp. 347-354.
- Gimenez-Martin G., Lopez-Saez J.F., Monge E.G. (1962).
Somatic chromosomes of the pig.
Journal of Heredity, 53, pp. 281

- Glass D.J.(2003).
Molecular mechanisms modulating muscle mass
Trends in Molecular Medicine, 9, pp. 344-350.
- Glass D.J.(2005).
A signaling role for dystrophin: Inhibiting skeletal muscle atrophy pathways.
Cancer Cell, 5, pp. 351-352.
- Goddard M.E., Hayes B.J. (2007).
Genomic selection.
Journal of Animal Breeding Genetics, 124, pp. 323–330.
- Goddard M.E., Hayes B.J. (2009)
Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes
Nature Reviews Genetics, 10, pp. 381-391
- Goldspink, Geoffrey PhD, Williams, Pamela, Simpson, Hamish M.D, (2002).
Gene Expression in Response to Muscle Stretch.
Clinical Orthopaedics & Related Research, 403 , pp S146-S152
- Goureau A, Yerle M, Schmitz A, Riquet J, Milan D, Pinson P. Frelat G, Gellin. (1996).
Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting.
Genomics, 36, pp. 252-262.
- Grignani A. (1935).
I suini della razza di Garlasco.
Critica Zootecnica, Brescia, p. 430.
- Gustavsson I (1990).
Chromosome of the pig.
Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine, 34, pp. 73-107.
- Haley C., Vissher P. (2000).
DNA markers and genetic testing in farm animal improvement: current applications and future prospects.
Roslin Institute Annual Report, 98-99, pp. 28-39.
- Hall T.A. (1999).
BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
Nucleic Acids Symposium Series, 41, pp. 95-98.
- Hamasima N., Suzuki H., Mikawa A., Morozumi T., Plastow G., Mitsuhashi T. (2003).
Construction of a new porcine whole-genome framework map using a radiation hybrid panel.
Animal Genetics, 34 (3), pp. 216–220.
- Hamilton D.N., Ellis M., Miller K.D., McKeith F.K., Parrett D.F. (2000).
The effect of the Halothane and Rendement Napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs.
Journal of Animal Science, 78, pp. 2862-2867.

- Hanai T., Hamada H., Okamoto M. (2006).
Application of bioinformatics for DNA microarray data to bioscience, bioengineering and medical fields.
 Journal of Bioscience and Bioengineering, 101, pp. 377-384.
- Harlizius B, Rattink AP, de Koning DJ, Faivre M, Joosten RG, van Arendonk JA, Groenen MA. (2000)
The X chromosome harbors quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs.
 Mammalian Genome, 11(9), pp. 800-2.
- Hausman GJ, Poulos SP, Richardson RL, et al.(2006).
Secreted proteins and genes in fetal and neonatal pig adipose tissue and stromal-vascular cells.
 Journal of Animal Science, 84, pp. 1666–1681.
- 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.
 Mammalian Genome, 10, pp. 824-830.
- Hayashi K. (1991).
PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA.
 PCR methods and applications 1, pp. 34-38.
- Hindrik HD Kerstens, Kollers S., Kommadath A., del Rosario M., Dibbits B, Kinders S.M, Crooijmans P.R., Groenen M.A.M. (2009).
Mining for single nucleotide polymorphisms in pig genome sequence data.
 BMC Genomics, 10, p. 4.
- Hocquette J. F., Ortigues-Marty I., Pethick D., Herpin P., Fernandez X. (1998).
Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals.
 Livestock Production Science, 56 (2), pp. 115-143.
- Hocquette J.F., Lehnerta S., Barendse W., Cassar-Maleka I., Picarda B. (2007).
Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality.
 Animal, 1, pp. 159-173 Cambridge University Press
- Houde A., Pommier S.A., Roy R.
Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia in purebred swine populations.
 Journal of Animal Science. 1993, 71: 1414-1418.
- Hu Z.L., Dracheva S., Jang W., Maglott D., Bastiaansen J., Rotschild M.F. (2005).
A QTL resource and comparative tool for pigs: pigQTLDB.
 Mammalian Genome, 16, pp. 792-800.
- Hu ZL, Fritz ER, Reecy JM. (2007).
AnimalQTLdb: a livestock QTL database tool set for positional QTL information mining and beyond.
 Nucleic Acids Research, 35, pp. 604-609.

- Hwang K.C., Keun C.S., Hoon L.S., Yi P.J., Nam K.D. (2009).
Depigmentation of skin and hair color in the somatic cell cloned pig.
Developmental Dynamics, 238, pp. 1701–1708.
- Jeon J.T., Carlborg Ö., Törnsten A., Giuffra E. (1999).
A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus.
Nature Genetics, 21, pp. 157-158.
- Iacuaniello S; Castiglioni B; Gorni C; Stella A; Mariani P; Pagnacco G (2007).
Microarray analyses to identify differentially expressed genes for assessing meat quality in swine.
Italian Journal of Animal Science, 6, pp.144-146.
- Iacuaniello S; Stella A; Liaubet, L. Gorni C; Mariani P; Pagnacco G; Castiglioni B (2008).
RH mapping and real time evaluation of seven porcine candidate genes for meat quality previously identified by means of microarray.
Chromosome Research 16, pp 1050-1051.
- Jincheng Li, Donath S., Li Y. Qin D., Prabhakar B.S, Li Peifeng. (2010)
miR-30 Regulates Mitochondrial Fission through Targeting p53 and the Dynamin-Related Protein-1 Pathway
PLoS Genet. 6, p. e1000795.
- Jones SW, Parr T, Sensky PL, Bardsley RG, Buttery PJ. (1998).
Fibre type-specific expression of the calpain proteolytic system in skeletal muscle.
Biochemical Society Transaction, 26, S267.
- Jungerius B.J., Rattink A.P., Crooijmans R.P.M.A., van der Poel J.J., van Oost B.A., M.F.W. Te Pas, Groenen M.A.M. (2002).
Development of a single nucleotide polymorphism map of porcine chromosome.
Animal Genetics, 34, pp.429–437.
- Kaminski S.; Help H.; Brym P.; Rusc A.; Wójcik E. (2008).
SNiPORK-a microarray of SNPs in candidate genes potentially associated with pork yield and quality-development and validation in commercial breeds.
Animal Biotechnology, 19, pp. 43-69
- Karlsson A.H., Klont R.E, Fernandez X. (1999).
Skeletal muscle fibres as factors for pork quality.
Livestock Production Science, 60, pp. 255–269
- Kim, Y., Stephan W. (2002).
Detecting a local signature of genetic hitchhiking along a recombining chromosome.
Genetics, 160, pp. 765–777.
- Kim Y., Nielsen R. (2004).
Linkage Disequilibrium as a Signature of Selective Sweeps.
Genetics, 167, pp. 1513–1524.

- Kim Y., Stephan W. (2002).
Detecting a local signature of genetic hitchhiking along a recombining chromosome.
Genetics, 160, pp. 765–777.
- King A. H., Jiang Z., Gibson J. P., Haley C.S, Archibald A.L. (2003).
Mapping Quantitative Trait Loci Affecting Female Reproductive Traits on Porcine Chromosome 8.
Biology of Reproduction, 68 (6), pp. 2172-2179.
- Knap PW, Sosnicki AA, Klont RE, et al. (2002).
Simultaneous improvement of meat quality and growth and carcass traits in pigs.
In: Proceedings of the 7th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production Prod. INRA, Castanet-Tolosan, France, pp. 339–346
- Knott S. A., Marklund L., Haley C. S., Andersson K., et al. (1998).
Multiple Marker Mapping of Quantitative Trait Loci in a Cross Between Outbred Wild Boar and Large White Pigs.
Genetics, 149, PP. 1069–1080
- Kocwin-Podsiadla M., Kuryl J., Krzeczio E., Zybert A., Przybylsky W. (2003).
The interaction between calpastatin and RYR1 genes for some pork quality traits.
Meat Science, 65, pp. 731–735.
- de Koning D.J., Harlizius B., Rattink A.P, Groenen M.A., Brascamp E.W., van Arendonk J. A.(2001).
Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs.
Journal of Animal Science, 79 (11), pp. 2812-2819.
- Lalley P., Mckusick V. (1985).
Report of the committee on comparative mapping.
8th International Workshop on Human Gene Mapping, Cytogenetics and Cell Genetics, 40, pp. 536-566.
- Lalley P., Davidsson M., Graves J., O'Brien S., Womack J., Roderick T., Cre-Goldberg M., Hillyard A., Doolittle D., Rogers J. (1989).
Report of the committee on comparative mapping. Tenth International Workshop on Human Gene Mapping.
Cytogenetics and Cell Genetics, 51, pp. 503-532.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. (2002).
MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.
EMBO Journal, 21, pp. 4663-4670.
- Lee Y., Ahn C, Han J, Choi H, et al. (2003).
The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.
Nature, 425, 415-419.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW. (2004).
Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways.
Cell., 117, pp 69-81.

- Kim, Y. and Nielsen, R. (2004).
Linkage disequilibrium as a signature of selective sweeps.
Genetics, 167, pp. 1513–1524.
- Knott S. A., Marklund L., Haley C. S., Andersson K., et al. (1998).
Multiple Marker Mapping of Quantitative Trait Loci in a Cross Between Outbred Wild Boar and Large White Pigs.
Genetics, 149, pp. 1069–1080.
- Larkin JE, Frank BC, Gavras H, et al. (2005).
Independence and reproducibility across microarray platforms.
Nat Methods, 2, pp 337–344.
- Le Roy P., Naveau J., Elsen J. M., Sellier P. (1990).
Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs.
Genetic Research, 55, pp. 33–40.
- Le Roy P., Caritez J. C., Billon Y., Elsen J. M., Talmant A., Vernin P., Lagant H., Larzul C., Monin G., Sellier P. (1995).
Etude de l'effet du locus RN sur les caracteres de croissance et de carcasse: premiers resultats.
Journal de Recherche du Porc. Fr., 27, pp. 165-170.
- Lee MT, Whitmore GA. (2002).
Power and sample size for DNA microarray studies.
Statistical Medical, 21, pp. 3543–3570.
- Leeb T, Reftenberger G, Hameister H, Brem G, Brenig B (1995).
Construction of a porcine YAC library and mapping of the cardiac muscle ryanodine receptor gene to chromosome 14q22-q23.
Mammalian Genome, 6, pp. 37–41.
- Vykoukalová Z., Knoll ADvořák., J., Čepica S.(2006).
New SNPs in the IGF2 gene and association between this gene and backfat thickness and lean meat content in Large White pigs.
Journal of Animal Breeding and Genetics, 123 (3), pp. 204–207.
- Looft C., Reinsch N., Rudat I., Kalm E. (1996).
Mapping the porcine RN gene to chromosome 15.
Genetic Selection Evolution, 28, pp. 437-442.
- Malek M., Dekkers J. C.M., Lee H. K., Baas T. J., Rothschild M. F. (2001).
A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition.
Mammalian Genome., 12, pp. 630–636.
- Mariani P., Johansson M., Ellegren H., Harbitz I., Juneja R. K., Andersson L. (1992).
Multiple restriction fragment length polymorphisms in the porcine calcium release channel gene (CRC): assignment to the halothane (HAL) linkage group.
Animal Genetics., 23(3), pp. 257-62.

- Mariani P., Lundström K., Gustafsson U., Enfält A. C., Juneja R.K., Andersson L. (1996).
A major locus (RN) affecting muscle glycogen content is located on pig Chromosome 15.
Mammalian Genome, 7, pp. 52–54.
- Marklund L., Nyström P.E., Stern S., Andersson L.E., Andersson L. (1999).
Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4.
Heredity, 82, pp. 134–141.
- Martins-Wess F., Rohrer G., Voß-Nemitz R., Drögemüller C., Brenig B., Robic A., Yerle M., Milan D., Leeb T.
Generation of a 5.5-Mb BAC/PAC contig of pig chromosome 6q1.2 and its integration with existing RH, genetic and comparative maps.
Animal Genomics, 102, pp.116-120.
- Mascheroni E., (1927).
I suini.
Edizioni UTET, Torino
- Meijerink E., Fries R., Vogeli P., Masabanda J., Wigger G., Stricker C. Neuenschwander S., Bertschinger H.U., Stranzinger G. (1997).
Two a(1,2) fucosyltransferase genes on porcine Chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci.
Mammalian Genome, 8, pp. 736–741.
- Mercadé, A., J. Estellé, J. L. Noguera, J. M. Folch, L. Varona, L. Silio, A. Sanchez, and M. Perez-Enciso. (2005).
On growth, fatness and form: A further look at porcine's chromosome 4 in an Iberian x Landrace cross.
Mammalian Genome, 16, pp. 374–382.
- Meuwissen T.H.E., Hayes B., Goddard M. E. (2001).
Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps.
Genetics, 157, pp. 1819–1829
- Meyers SN, Rogatcheva MB, Larkin DM, Yerle M, Milan D, Hawken RJ, Schook LB, Beaver JE. (2005)
Piggy-BACing the human genome II. A high-resolution, physically anchored, comparative map of the porcine autosomes.
Genomics, 86(6), pp. 739-752.
- Meyers SN, Rodriguez-Zas SL, Beaver JE. (2007).
Fine-mapping of a QTL influencing pork tenderness on porcine chromosome 2.
BMC Genetics, 8, p. 69.
- Mikawa A., Suzuki H., Suzuki K, Toki D., Uenishi H., Awata T., Hamasima N.
Characterization of 298 ESTs from porcine back fat tissue and their assignment to the SSRH radiation hybrid map.
Mammalian Genome, 15 (4) , pp. 315-322.

Milan D., Bidanel J.P., Iannuccelli N., Riquet J., Amigues Y., Gruand J., Le Roy P., Renard C., Chevalet C. (2002).

Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs.

The Genetic Selection of Evolution. 34, pp. 705–728.

Milan D., Le Roy P., Woloszyn N., Caritez J. C., Elsen J. M., Sellier P., Gellin J. (1995).

The RN locus for meat quality maps to pig chromosome 15.

The Genetics Selection of Evolution. 27, pp. 195-199.

Milan D, Woloszyn N, Yerle M, Le Roy P (1996).

Accurate mapping of the acid meat RN gene on genetic and physical maps of pig chromosome 15.

Mammalian Genome, 7, pp. 47-51.

Milan, D., Jeon J.T., Looft C., Amarger V., et al. (2000).

A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle.

Science, 288, pp.1248–1251

Lafaucheur L, Missohou A, Ecolan P, Monin G, Bonneau M. (1992).

Performance, plasma hormones, histochemical and biochemical muscle traits, and meat quality of pigs administered exogenous somatotropin between 30 or 60 kilograms and 100 kilograms body weight.

Journal of Animal Science, 70, pp. 3401-3411.

Monin G e Sellier P.(1985).

Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: the case of the Hampshire breed.

Meat Science,13, pp. 49–63

Monin G., Mejenes-Quijano A., Talmant A., Sellier P. (1987).

Influence of breed and muscle metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs.

Meat Science, 20, pp. 149-158.

Monin G., Larzul C., Le Roy P., Culioli J., Mourot J., Rousset-Akrim S., Talmant A., Touraille C., Sellier P. (1999).

Effects of the Halothane Genotype and Slaughter Weight on Texture of Pork.

Journal of Animal Science 77:408-415.

Nagamine Y, Pong-Wong R., Visscher P.M., Haley C.S. (2009).

Detection of multiple quantitative trait loci and their pleiotropic effects in outbred pig populations

Genetics Selection Evolution, 41, p. 44.

Neveau J. (1986).

Contribution a l'étude du déterminisme génétique de la qualité de viande porcine: Heritabilité du Rendement Technologique Napole.

Journal de Recherche Porcine, 18, pp. 265-276.

Nedbal S., Zink N., Lahm H., Hoeflich A., Wolf E. (2000).

Functional dissection of the insulin like growth receptor (IGF) system-prospect for animal breeding.

Archiv Tierzucht / Archives Animal Breeding, 43, pp. 223-230.

- Nezer C, Moreau L, Brouwers B, Coppieters W, et al. (1999).
An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs.
Natural Genetics, 21, pp. 155-156.
- Nobis W., Ren X., Suchyta S.P., Zanella A.J., Coussens P.M. (2003).
Development of a porcine brain cDNA library, EST database and microarray resource.
Physiological Genomics, 16, pp. 153-159.
- NiJman I.J., Kuipers S., Verheul M., Guryev V., Cuppen E. (2008).
A Genome-Wide SNP panel for mapping and association studies in the rat.
BMC Genomics, 9, p. 95.
- Otsu, K., Khanna, V.K. and Archibald, A.L. (1991).
Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and a probable causal mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families.
Genomics, 11, pp. 744-750.
- Ovilo C., Clop A., Noguera J. L., Oliver M. A., et al. (2002).
Quantitative trait locus mapping for meat quality traits in an Iberian x Landrace F2 pig population.
Journal of Animal Science., 80, pp. 2801–2808.
- Pan Q., Bakowski M.A., Morris Q., Zhang W., Frey B.J., Hughes T.R., Blencowe, B.J. (2005).
Alternative splicing of conserved exons is frequently species-specific in human and mouse.
Trends in Genetetics, 21, pp 73-77.
- Parr, T., Sensky P.L., Scother G.P., Bardsley R.G., Buttery P.J., Wood J.D., Warkup C. (1999).
Immunochemical study of the calpain system in porcine longissimus muscle with high and low shear force values.
Journal of Animal Science 77(1), p.164.
- Parsch, J., Meiklejohn, C.D., and Hartl, D.L. (2001).
Patterns of DNA sequence variation suggest the recent action of positive selection in the janus-ocnus region of Drosophila simulans.
Genetics 159, pp. 647–657.
- Picarda B., Lefaucheur L., Berric C., Duclos M.J. (2002).
Muscle fibre ontogenesis in farm animal species.
Reproduction Nutrition Developement , 42, pp. 425-231.
- Piras M., Casu S., Salaris S., Usai M.G., Carta A. (2009)
The Pecora Nera di Arbus: a new sheep breed in Sardinia, Italy.
Animal Genetic Resources Information, 2009, 45, pp. 91–92.
- Plastow G, Sasaki S, Yu TP, et al. (2004)
Practical application of DNA markers for genetic improvement. Record of Proceedings.
National Swine Improvement Federation Conference and Annual Meeting 2003.
Available on: www.nsif.com/Conferences/pdf/PracticalDNAMarkers.pdf.

- Ponsuksili S, Murani E, Schellander K, et al. (2005).
Identification of functional candidate genes for body composition by expression analyses and evidencing impact by association analysis and mapping.
Biochim BiophysActa, 1730, pp. 31–40.
- Przeworski, M. (2002).
The signature of positive selection at randomly chosen loci.
Genetics 160, pp. 1179–1189.
- Qanbari S., Pimentel E.C.G, Tetens J., Thaller G., Lichtner P., Sharifi A.R., Simianer H. (2010).
A genome-wide scan for signatures of recent selection in Holstein cattle.
Animal Genetics, 41, pp. 377–389.
- Raimondi R. (1951).
Indagine sulla razza suina di Garlasco.
Edizioni Istituto zootecnico e caseario per il Piemonte, Torino.
- Ramos A.M., Glenn K.L., Serenius T.V., Stalder K.J., Rothschild M.F. (2008).
Genetic markers for the production of US country hams.
Journal of Animal Breeding and Genetics, 125, pp. 248–527.
- Ramos A.M., Crooijmans R.P.M. A., Affara N.A., Amaral A.J Archibald A. L. et al.(2009).
Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology.
PLoS ONE, 4, e6524.
- Rathje T.A., Rohrer G.A, Johnson R.K. (2004).
Evidence for quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs.
Journal of Animal Science, 75, pp. 1486-1494
- Rattink A.P., Jungerius B.J, Faivre M., Chardon P., Harlizius B., Groenen M.A.M (2001)
Improving the comparative map of SSC2p-q13 by sample sequencing of BAC clones
Animal Genetics, 32, pp 274–280.
- Rettenberger G, Klett C, Zechner U, Kunz J, Vogl W, Hameister H. (1995)
Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting.
Genomics, 26, pp. 372-378
- Rink A., Santschi E.M., Eyer K.M., Roelofs B., Hess M., Godfrey M., Karajusuf E.K., Yerle M., Milan D., Beattie C.W. (2002).
A first-generation EST RH comparative map of the porcine and human genome.
Mammalian Genome, 13, pp. 578–587.
- Robic A., Riquet J., Yerle M., Milan D., Lahbib-Mansais Y., Dubut-Fontana C., Gellin J. (1996).
Porcine linkage and cytogenetic maps integrated by regional mapping of 100 microsatellites on somatic cell hybrid panel.
Mammalian Genome, 7, pp 438-445.

- Rogel-Gaillard C., Bourgeaux N., Billault A., Vaiman M., Chardon P. (1999).
Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements.
Cytogenetics Cell Genetics 85, pp. 205–211.
- Rogel-Gaillard C, Bourgeaux N, Save JC, Renard C, Coullin P et al. (1997).
Construction of a swine YAC library allowing an efficient recovery of unique and centromeric repeated sequences.
Mammalian Genome, 8, pp. 186–192.
- Rohrer, G.A., Alexander, L.I., Keele, J.W., Smith, T.P., Beattie, C.W. (1994).
A microsatellite linkage map of the porcine genome.
Genetics, 136, pp. 231-245.
- Rohrer GA., Alexander, LJ., Hu Z., Smith TP., Keele JW., Beattie, C. W. (1996).
A comprehensive map of the porcine genome.
Genome Research, 6, pp. 371–391.
- Rohrer GA., Ford JJ., Wise TH., Vallet JL., Christenson RK. (1999).
Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a multigeneration Meishan-White composite swine population.
Journal of Animal Science, 77, pp. 1385-1391.
- Rohrer GA., Wise TH., Lunstra DD., Ford JJ. (2001).
Identification of genomic regions controlling plasma FSH concentrations in Meishan-White Composite boars.
Physiol Genomics, 6, pp. 145-151.
- Rothschild MF., Jacobson C., Vaske D., Tuggle C., et al. (1996).
The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs.
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 93, pp. 201–205
- Rothschild MF, Jiang Z. (2007).
Swine Genome Science Comes of Age.
International Journal of Biology Science, 3, pp 129-131.
- Rubin C.J., Zody M.C., Ericsson J., et al. (2010).
Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication.
Nature, 464, pp.587-591
- Russo V., Nanni Costa L., Lo Fiego D.P., De Grossi A. (1991).
Early estimation of seasoning loss in Parma ham production.
37th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST).
- Russo V., Davoli R., Tagliavini J., Dall'Olio S., Bigi D., Costosi E., et al. (1993).
Identificazione del genotipo dei suini per la sensibilità all'alotano a livello di DNA mediante PCR.
Zootecnia e Nutrizione Animale, 19, pp. 89–93.
- Russo V., Dall'Olio S., Coscelli M.B. (1994).
Study of the halothane locus by PCR-typing of CRC gene in pig breeds reared in Italy.
Animal Genetics, 25, (2) , p 60.

- Russo V, Nanni Costa L. (1995).
Suitability of pig meat for salting and the production of quality products.
Pig News Information, 16, p. 17.
- Russo V., Dall'Olio S., Davoli R., Coscelli M.B., Bigi D.(1996).
Studio del locus Alotano nelle razze suine allevate in Italia mediante test PCR
Zootecnia e Nutrizione Animale, 22, pp. 33-38
- Russo V., Fontanesi L., Davoli R., Nanni Costa L., Cagnazzo M., Buttazzoni L., Virgili R., Yerle M. (2002).
Investigation of candidate genes for meat quality in dry-cured ham production: the porcine cathepsin B (CTSB) and cystatin B (CSTB) genes.
Animal Genetics,, 33, pp. 123–131
- Ryu YC, Kim BC. (2006).
Comparison of histochemical characteristics in various pork groups categorized by postmortem metabolic rate and pork quality.
Journal of Animal Science, 84, pp. 894-901.
- Ryu YC., Choi Y.M., Lee S.H., Shin H.G., Choe J.H., Kim J.M.,. Hong K.C, Kim B.C. (2008).
Comparing the histochemical characteristics and meat quality traits of different pig breeds.
Meat Science, 80, 2008, pp. 363-369
- Sanchez MP, Iannuccelli N, Basso B, Bidanel JP, et al.(2007).
Identification of QTL with effects on intramuscular fat content and fatty acid composition in a Duroc x Large White cross.
BMC Genetics, 16; p. 55.
- Sato S, Atsuji K, Saito N, Okitsu M, Sato S, et al. (2006).
Identification of quantitative trait loci affecting corpora lutea and number of teats in a Meishan x Duroc F2 resource population.
Journal of Animal Science, 84, pp. 2895-901.
- Schadt EE, Lamb J, Yang X, et al. (2005).
An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease.
Nature Genetics, 37, pp. 710–717.
- Schook L. (2007).
Mapping the return on investment (ROI) QTL: a progress report on animal genomics.
CABRevPerspectAgri, Vet Sci, Nutritional Nat Resource, 005, p. 12.
- Sellier P. (1998).
Genetics of meat and carcass traits.
The Genetics of the Pig. Wallingford, UK: CAB International, pp.463–510.
- Sheller, K., Mitchell B., Buys N. (2002).
Marker assisted selection for the IGF2-II polymorphism increases uniformity of hogs.
NSIF proceedings, pp. 63–80.

- Shu C.L., Catanese J.J., de Jong P.J. (2001).
A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration
 Mammalian Genome, 12, pp. 472–474.
- Singh S.K, Pal Bhadra M, Girschick H.J, Bhadra U.(2008).
MicroRNAs—micro in size but macro in function.
 FEBS Journal, 275, pp. 4929–4944
- Smith CA. (1986).
The development of human linkage analysis.
 Annals of Human Genetics., 50, pp.293-311.
- Smith M.J., HAIGH J. (1974).
The hitch-hiking effect of a favorable gene.
 Genetic Research, 23, pp. 23–35.
- Smith C, Bampton PR. (1977).
Inheritance of reaction to halothane anesthesia in pigs.
 Genetical Research., 29, p. 287.
- Smith TP, Fahrenkrug SC, Rohrer GA, Simmen FA, Rexroad CE, Keele JW. (2001).
Mapping of expressed sequence tags from a porcine early embryonic cDNA library.
 Animal Genetics, 32(2), pp. 66-72.
- Spelman R.J., Van Arendonk J.A.M. (1997).
Effect of Inaccurate Parameter Estimates on Genetic Response to Marker-Assisted Selection in an outbred population.
 Journal of Dairy Science, 80, pp. 3399-3410.
- Southwood O.I., Van Der Steen H.A.M., Mileham A.J., Cuthbert-Heavens D. (1995).
Evaluation of the oestrogen receptor (ESR) gene in meishan synthetic and Large white pigs.
 Book of Abstract of the 46th Annual Meeting of the European Association of Animal Production, 53. Wageningen Pers, Wageningen, Netherlands.
- Stella A. , Ajmone-Marsan P., Lazzari B., Boettcher P. (2010).
Identification of Selection Signatures in Cattle Breeds Selected for Dairy Production.
 Genetics, 185 ,pp.1451-1461.
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, et al. (2004).
The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors.
 Molecular Cell, 7, 395-403.
- Suzuki K, Asakawa S, Iida M, Shimanuki S, Fujishima N et al. (2000).
Construction and evaluation of a porcine bacterial artificial chromosome library.
 Animal Genetics, 31, pp. 8–12.
- Taylor R.G., Geesink G.H., Thompson V.F., Koohmaraie M., Goll D.E. (1995).
Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization?
 Journal of Animal Science., 73:1351–13.

- Te Pas M., Wit A.A.C., De Priem J., Cagnazzo M., Davoli R., Russo V., Pool M.H. (2005).
Transcriptome expression profiles in prenatal pigs in relation to myogenesis.
Journal of Muscle Research and Cell Motility, 26, pp. 157-165.
- Tosser-Kopp G., Benne F., Bonnet A., Mulsant P., Gasser F., Hatey F. (1997).
A first catalog of gene involved in pig ovarian follicular differentiation.
Mammalian Genome, 8, pp. 250-254.
- Tribout T., Iannuccelli N., Druet T., Gilbert H., Riquet J., Gueblez R., Mercat M.-J., Bidanel J.-P., Milan D., Le Roy P. (2008).
Detection of quantitative trait loci for reproduction and production traits in Large White and French Landrace pig populations.
Genetic Selection Evolution, 40, pp. 61–78
- Turri F. (2007).
Crioconservazione delle risorse genetiche: l'esperienza di un suino nero della lomellina.
Tesi di Laurea in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Animali, Università degli Studi di Milano, Anno Accademico 2006-2007.
- Tuggle CK, Dekkers JC, Reecy JM. (2006).
Integration of structural and functional genomics.
Animal Genetics; 37(1), pp. 1–6.
- Tuggle CK, Wang Y, Couture O. (2007).
Advances in swine transcriptomics.
International Journal of Biological Science, 3, pp. 132–52.
- Wang L., Yu T. P., Tuggle C. K., Liu H. C., Rothshild M. F., (1998).
A direct search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs.
Journal of animal science., 76, pp. 2560-2567.
- Van Laere A.S., Nguyen M., Braunschweig M., Nezer C., Collette C., Moreau L., Archibald A.L., Haley C.S., Buys N., Tally M., Andersson G., Georges M., Andersson, L. (2003).
A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig.
Nature, 425, pp. 832–836
- Villanueva B., Pong-Wong R., Fernández J., Toro M. A.(2005).
Benefits from marker-assisted selection under an additive polygenic genrtic model.
Journal of Animal Science, 83, pp. 1743-1752
- Walker J. M., Rapley R. (2005).
Medical BioMethods Handbook.
Ed. Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Wang L., Yu T. P., Tuggle C. K., Liu H. C., Rothshild M. F. (1998)
A direct search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs.
Journal of Animal Science, 76, pp. 2560-2567.
- Weir, B. S., A. D. Anderson, A. B. Hepler. (2006).
Genetic relatedness analysis: Modern data and new challenges.
Nature Reviews Genetics, 7(10), pp. 771-780.

Wernersson R., Schierup M.H, Jørgensen F.G, Gorodkin J., Panitz F., Stærfeldt H., Christensen O.F, et al., (2005).

Pigs in sequence space: A 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing.
BMC Genomics, 6, p. 70.

Wiedmann R.T, Smith T.P.L, Nonneman D.J. (2008).

SNP discovery in swine by reduced representation and high throughput pyrosequencing.
BMC Genetics, 9, p. 81.

Wilkie P.J., Paszek A.A., Beattie C.W., Alexander L.J., Wheeler M.B., Schook L.B. (1999).

A genome scan of porcine reproductive trait loci (QTLs)for number of corpora lutea.
Mammalian Genome, 10, pp. 573-578.

Wintero A.K., Fredholm M., Davies W. (1996).

Evaluation and characterization of a porcine small intestine cDNA library.
Mammalian Genome, 7, pp. 509-517.

Woodsdalek J.E. (1913).

Spermatogenesis of the pig with special reference to the accessorychromosomes.
Biological Bulletin, 25, pp. 8-32.

Yang YH, Speed T. (2002).

Design issues for cDNA microarray experiments.
Nat Rev Genetics, 3, pp. 579–588.

Yao J, Coussens PM, Saama P, Suchyta S, Ernst CW (2002).

Generation of expressed sequence tags from a normalized porcine skeletal muscle cDNA library.
Anim Biotechnol 13, pp. 211–222.

Yerle M., Lahib Mansais Y., Mellink C., Goureau A., Pinton P. et al. (1995).

The PigMap consortium cytogenetic map of the domestic pig (Sus scrofa domestica).
Mammalian Genome, 6, pp. 176-186.

Yerle M., Echard G., Robic A., Miral A., Dubut-Fontanat C., Riquet J., Pinton P., Milan D., Lahib-Mansais Y., Gellin J. (1996).

A somatic cell hibrid panel forpig regional gene mapping characterized by molecolar cytogenetic.
Cytogenetics and Cell Genetics, 73, pp. 194-202.

Yerle M, Pinton P., Robic A., Alfonso A., Palvadeau Y., Delcros C., Hawken R., Alexander L., Beattie C., Schook L., Milan D., Gellin J. (1998).

Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs.
Cytogenetics and Cell Genetics, 82, pp. 182-188

Yerle M, Pinton P., Delcros C, Arnal N., Milan D., Robic A. (2002).

Generation and characterization of a 12,000-rad radiation hybrid panel for fine mapping in pig.
Cytogenetics and Cell Genetics, 97, pp. 219-228.

Zhaoa S.M, Rena L.J., Guoa L., Chenga M.L., Zhanga X., Gea C.R. and Gao S.Z. (2010).

Muscle lipid metabolism gene expression in pigs with different H-FABP genotypes.
Livestock ScienceVolume 128, Issues 1-3, pp. 101-107.

Zhao S.-H., Nettleton D, Liu W., Fitzsimmons C., Ernst C.W, Raney N.E., Tuggle C. K. (2003). *Complementary DNA macroarray analyses of differential gene expression in porcine fetal and postnatal muscle.* Journal of Animal Science, 81, pp. 2179-2188.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Giulio Pagnacco per aver permesso la realizzazione di questo progetto; la Dott.ssa Bianca Castiglioni per avermi guidato durante questo percorso ed avermi dimostrato che questo lavoro può anche non essere noioso, se lo si fa con le persone giuste.

Ringrazio tutti coloro con cui ho avuto il piacere e l'onore di lavorare:

Stefania Chessa per il supporto scientifico, morale e tecnologico.. spero di poter ricambiare.. a modo mio...;

Paola Cremonesi , perché ormai non so più come farò a sdebitarmi. Un sincero grazie per tutto, dal punto di vista lavorativo ed umano;

Manuela Madeddu:, perché porta allegria col suo accento sardo;

Federica Turri, perché di gente così non se ne incontra tutti i giorni....

Un sentito ringraziamento a tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi : la Prof.ssa Anna Caroli (che se tutti i ricercatori fossero così, avrei le idee chiare su cosa vorrei fare da grande); la Dott.ssa Alessandra Stella per il supporto bionformatico; la Prof.ssa Paola Crepaldi per i preziosi insegnamenti, ma non solo; la Dott.ssa Letizia Nicoloso, perché ha davvero una pazienza illimitata; il Prof. Mortarino per la preziosa consulenza sui microRNA.

Un ringraziamento alla mia famiglia e agli amici sempre presenti:

Linda, perché oramai anche il tuo direttore è mio amico, e perché torneremo ad essere noi stesse; Splinty, con il suo eterno progetto di portarmi negli States, Mapty, perché è sempre una gioia averla vicina.

Come dimenticare Glory, volutamente omessa dai ringraziamenti pseudo-seri, altrimenti saremmo alla frutta davvero. Un grazie sincero per lo sbattimento. Ricambierò.

Ringrazio Milena, che è lontana ma è come se fosse qui ed Andrea Pastori perché è in grado di farmi sorridere in qualsiasi situazione. Ringrazio di cuore Ibrahimovich perché, anche nel marasma totale, è riuscito a distrarmi con le sue magie.

Last but not least, ovviamente, Cucciolo, perché da quando l'ho incontrato è sempre stato uno stimolo e mai un limite. Come chiedere di meglio.

AD MAIORA