

INDUSTRIE ALIMENTARI

IL BOSS DELLE TORTE HA SCELTO MINIPAN.



Comby3, colatrice, siringatrice, tagliafilo www.minipan.com



ROBERTA CIAMPOLINI* - FRANCESCA CECCHI

Dipartimento di Scienze Veterinarie - Università di Pisa - V.le delle Piagge 2 - 56124 Pisa - Italia

ELENA CIANI

Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"
Via Amendola 165/A - 70126 Bari - Italia

MARZIA ALBENZIO - AGOSTINO SEVI

Dipartimento di Scienze delle Produzioni e dell'Innovazione nei Sistemi Agro-alimentari Mediterranei
Università degli Studi di Foggia - Via Napoli 25 - 71100 Foggia - Italia

LAURA SANTORO

Consorzio per la Sperimentazione, Divulgazione e Applicazione di Biotecnologie Innovative (ConSDABI) Sub National Focal
Point italiano FAO Biodiversità Mediterranea - Località Piano Cappelle - 82100 Benevento - Italia

MARIA SILVIA D'ANDREA - FABIO PILLA

Dipartimento di Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente - Università degli Studi del Molise
Via De Sanctis - 86100 Campobasso - Italia

*email: rciampol@vet.unipi.it

LA RINTRACCIABILITÀ DI RAZZA DELLA CARNE OVINA MEDIANTE MARCATORI MOLECOLARI STR: RISULTATI PRELIMINARI

The breed traceability of sheep meat by using molecular STR markers: preliminary results

Parole chiave: tracciabilità razziale, marcatori STR, approccio probabilistico, prodotti ovini
Keywords: breed traceability, STR markers, probabilistic approach, sheep products

INTRODUZIONE

L'ovinicoltura gioca un ruolo di estrema importanza sul territorio nazionale, soprattutto per le aree collinari e montane dell'appennino meridionale e insulari svantaggiate e marginali, con importanti ripercussioni dal punto di vista sociale, economico e ambientale. La garanzia di sicurezza e di qualità di un prodotto alimentare di origine animale è una problematica estremamente sentita dai produttori, dai trasformatori, dai distributori e soprattutto dai consumatori. Nonostante alcuni accorgimenti, il sistema attualmente applicato è ancora esposto a numerosi rischi, per la possibilità di interferire sulla filiera con deviazioni dolose o colpose, non sempre facilmente evidenziabili. Un sistema di rintracciabilità del prodotto, effettuato con metodiche di genetica molecolare, può essere risolutivo dal momento che il DNA rappresenta una vera e propria etichetta indele-

bile e inalterabile che accompagna l'animale dalla nascita al piatto del consumatore, permettendo di risalire – dalla carne in qualunque stadio della catena produttiva e distributiva (diagramma di flusso) – all'identità dell'animale che l'ha prodotta e/o alla sua razza d'origine. La possibilità di utilizzare metodiche basate sull'analisi del DNA per realizzare dei sistemi di assegnazione razziale è stata precedentemente dimostrata per diverse specie di interesse zootecnico (Bjornstad *et al.*, 2001; Blott *et al.*, 1999; Ciampolini *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001; MacHugh *et al.*, 1998; Maudet *et al.*, 2002; Roques *et al.*, 1999; Matassino *et al.*, 2010). Un approccio metodologico ampiamente utilizzato fa ricorso al concetto di likelihood (verosimiglianza che un genotipo multilocus di un soggetto di origine ignota appartenga a una specifica razza di riferimento, sulla base delle frequenze riscontrate, per gli alleli che compongono quel genotipo, in quella determinata

SOMMARIO

La ricerca propone la messa a punto di un sistema di rintracciabilità della carne ovina mediante metodiche di genetica molecolare. Sono stati tipizzati mediante 19 marcatori STR un totale di 800 campioni di cui: (a) 90 appartenenti a un gruppo costituito sia da soggetti di importazione di razza indefinita che da prodotti di incrocio locali reperibili presso macelli e punti vendita; (b) i restanti campioni appartenenti a sette razze ovine autoctone dell'Italia Centro-Meridionale. È stato adottato un test di assegnazione di tipo probabilistico per valutare la possibilità di attribuire i singoli campioni alla propria razza d'origine. Tutti i campioni di razza Sarda sono risultati correttamente assegnati, così come oltre il 98% dei campioni delle altre razze. I risultati preliminari sembrano molto promettenti, anche se ulteriori analisi si rendono necessarie per meglio comprendere la potenza statistica di un simile test di assegnazione razziale prima di inserirlo nella catena di produzione della carne ovina.

SUMMARY

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



razza); tale approccio è proprio di alcuni software di uso comune in genetica di popolazione, tra i quali Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). I risultati di questa ricerca contribuiscono alla protezione della carne ovina italiana integrando un sistema di certificazione e di controllo dei processi e dei prodotti mediante metodologie genomiche per la rintracciabilità delle razze allo studio. Con la presente ricerca si è inteso contribuire a realizzare un sistema di rintracciabilità della carne ovina basato sulla tipizzazione di marcatori genetici in tessuti o in tagli di carne, prelevati nelle diverse fasi del diagramma di flusso.

MATERIALI E METODI

Oggetto della ricerca sono state le maggiori razze autoctone dell'Italia meridionale continentale: Altamura, Bagnolese, Gentile di Puglia, Laticauda, Leccese, la Sarda e la Comisana, razze a più ampia diffusione nazionale. A partire dalle informazioni raccolte attraverso le indagini aziendali e dai dati provenienti dal Libro Genealogico, è stato individuato, per ogni razza, un campione costituito da soggetti non imparentati almeno fino alla terza generazione, assortito in modo da assicurare la maggiore rappresentatività sul territorio di ciascuna realtà genetica. Per ogni razza oggetto di studio sono stati campionati 100 soggetti provenienti da più aziende rappresentative dell'intera area di allevamento. Al fine di effettuare le analisi di rintracciabilità genetica sui prodotti, che comunemente si trovano realmente in commercio

in periodi stagionali di massima richiesta del mercato sono stati inoltre campionati capi di importazione di provenienza estera reperibili sul mercato italiano e di origine razziale ignota (provenienti dalla Romania, Spagna, Ungheria) nonché agnelli merinizzati e trimeticci di provenienza nazionale, per un totale di 90 capi.

Da ciascun soggetto sono stati prelevati 2 mL di sangue periferico, conservato a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA effettuata mediante utilizzo del kit GenElute Blood Genomic Dna Kit Minipreps (Sigma-Aldrich). Sono stati considerati 19 marcatori genomici STR selezionati dal panel proposto dalla Commissione ISAG/FAO per la "Measurement of Domestic Animal Diversity" (2004). Per ognuno di essi sono state elaborate delle reazioni teoriche di amplificazione in multiplex e considerate eventuali sostituzioni, sulla base delle valutazioni e delle informazioni ottenute dalle banche genomiche. L'analisi dei marcatori STR è stata condotta con 5 reazioni di multiplex-PCR utilizzando il kit commerciale Multiplex PCR Kit (Cat. N. 206143, QIAGEN). Gli amplificati sono stati separati ed analizzati in elettroforesi capillare mediante sequenziatore automatico ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Per ogni campione, sono state ottenute le taglie alleliche dei 19 marcatori analizzati. Il dato molecolare grezzo è stato categorizzato e sottoposto all'analisi statistica relativa ai parametri di genetica di popolazione. Quest'analisi preliminare è necessaria al fine di valutare la fattibilità di un

test di assegnazione di razza (Mburu *et al.*, 2003). Il metodo proposto richiede infatti il rispetto dell'equilibrio di Hardy Weinberg, l'assenza di linkage disequilibrium tra loci, oltre al grado di separazione tra le razze, parametro importante per la precisione di assegnazione (Cornuet *et al.*, 1999). Mediante il software Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005) sono stati calcolati il numero di alleli per marcatore, quello per razza ed è stato effettuato il test di assegnazione degli individui alla popolazione di appartenenza. Il software Arlequin analizza i profili allelici degli individui e restituisce un valore di likelihood (verosimiglianza) indicante la probabilità per ogni individuo, di appartenere ad ognuna delle razze analizzate. Il valore più alto corrisponde alla razza alla quale è più probabile che l'individuo appartenga. I valori di likelihood restituiti dal software sono stati confrontati tra razze, soggetto per soggetto, allo scopo di identificare la presenza di errori di assegnazione. Mediante una funzione implementata su foglio di calcolo Excel, per ogni individuo è stato verificato che il valore di likelihood più alto corrispondesse alla probabilità di appartenere alla razza corretta piuttosto che a qualsiasi altra tra quelle analizzate. La verifica è stata possibile in questa fase di ottimizzazione della metodica dato che il lavoro è stato condotto su campioni di cui è nota la provenienza. Al fine di determinare l'appartenenza o meno di un particolare campione biologico a una specifica razza, è stata inoltre utilizzata la funzione di Tracciabilità Razziale implementata nel Sof-



Tabella 1 - Localizzazione cromosomica dei marcatori STR e numerosità allelica riscontrata nelle razze allo studio.

| Marcatori STR | Localizzazione cromosomica | N. alleli totali |
|---------------|----------------------------|------------------|
| BM1824 | 1 | 10 |
| BM8125 | 17 | 11 |
| ILSTS11 | 9 | 14 |
| ILSTS5 | 7 | 18 |
| ILSTS28 | 3 | 24 |
| INRA063 | 14 | 20 |
| MAF214 | 16 | 31 |
| MAF65 | 15 | 12 |
| MAF70 | 4 | 21 |
| MAF209 | 17 | 18 |
| MAF33 | 9 | 18 |
| MCM140 | 6 | 17 |
| OarAE129 | 5 | 14 |
| OarJMP29 | 24 | 21 |
| OarFCB128 | 2 | 16 |
| OarFCB193 | 11 | 18 |
| OarFCB304 | 19 | 21 |
| OarJMP58 | 26 | 20 |

tware "TraceDNA2" messo a punto dal nostro gruppo di ricerca (dati non ancora pubblicati) che si basa sulla metodica di Ciampolini *et al.* (1995). Tale metodologia prevede l'impiego del Genotipo Multilocus Individuale (IMG). Ogni soggetto è stato definito mediante il proprio genotipo multilocus (nel nostro caso 19 loci di microsatelliti) costituito da una serie di 38 alleli per ogni animale. Per stimare la rassomiglianza genetica tra due individui o tra due gruppi di individui, viene calcolata la proporzione (P) di alleli comuni (A) in relazione alle 2L possibilità (L = numero di loci considerati). La rassomiglianza genetica è misurata da $P=A/2L$ e la distanza genetica è calcolata come $1-P$. Le rassomiglianze calcolate tra ogni coppia di soggetti sono mediate per ottenere valori di rassomiglianza entro razze o sottopopolazioni. Per stimare la rassomiglianza

(o la distanza genetica) intra popolazione e/o tra razze o sottopopolazioni vengono calcolati i valori medi delle rassomiglianze tra ogni soggetto di un gruppo e ciascun soggetto del gruppo a confronto. Il Software TraceDNA2 ha confrontato i genotipi multilocus ottenuti dai campioni biologici dei prodotti commercializzati prelevati sul mercato, con i genotipi multilocus delle razze presenti nel database oggetto di confronto.

RISULTATI E CONCLUSIONI

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

($\pm 4,95$) (**tab. 1**). Adottando l'approccio di maximum likelihood per il campione relativo alla popolazione complessiva, costituito dai dati genotipici, tutti i soggetti di razza Sarda sono stati assegnati correttamente alla razza d'origine e per tutte le altre razze le percentuali di corretta assegnazione superano il 98%. Per ciascuna possibile coppia di razze, utilizzando i valori di log-likelihood dei soggetti appartenenti alle due razze, sono stati calcolati i valori di log-likelihood ratio (logLR). A titolo esemplificativo, sono riportati, in **fig. 1**, i plot relativi ai valori di log-likelihood ratio (logLR) ottenuti mediante analisi con loci STR per le coppie Altamura vs Sarda e Bagnolese vs Laticauda. Come è possibile osservare le razze Sarda e Altamura sono perfettamente discriminate, mentre le razze Bagnolese e Laticauda vengono discriminate con un livello di precisione inferiore dovuto alla forte similarità genetica esistente tra le due popolazioni. I loci STR mostrano di avere una modesta performance di corretta attribuzione per la coppia di razze campane. Previa verifica dell'ipotesi di normalità dei dati (test di Kolmogorov-Smirnov), per ciascuna coppia di razze, media e deviazione standard delle distribuzioni di logLR osservate sono state utilizzate per ottenere le proporzioni di falsi positivi (α) e di veri positivi ($1 - \beta$) a diversi valori di logLR. A partire da tali valori, la probabilità a posteriori $Pr(\text{razza } J)$ che un individuo origini dalla razza J, data l'ipotesi alternativa che origini dalla razza K e dato il rapporto $\gamma = (1 - \beta)/\alpha$, è stata calcolata come $Pr(\text{razza } J) = \gamma/(\gamma + 1)$. A titolo esemplificativo, in **tab. 2** sono mostrate,

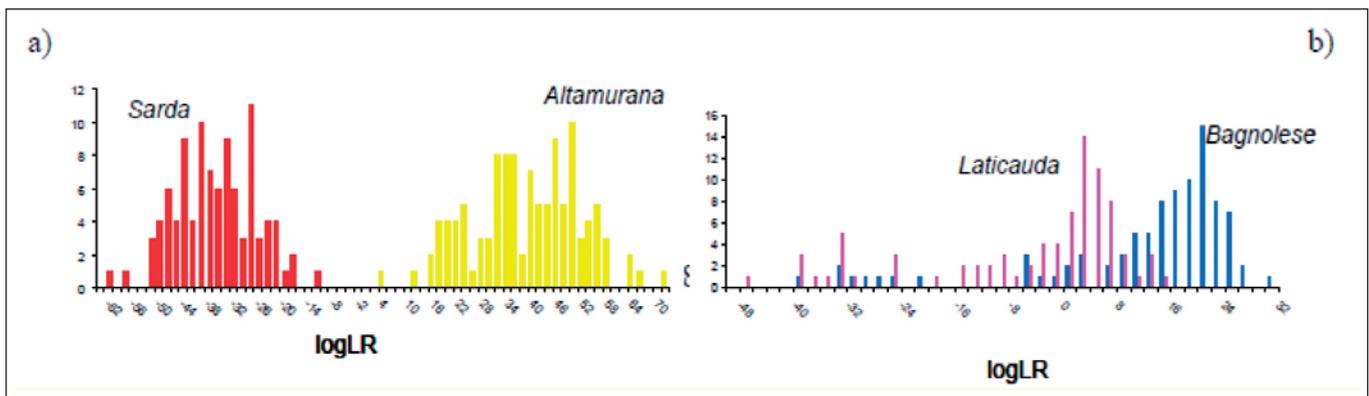


Fig. 1 - Grafici dei valori di *log-likelihood ratio* ottenuti mediante analisi con *loci* STR per le coppie Altamura vs Sarda (a) e Bagnolese Laticauda (b).

per ciascuno dei tre valori soglia di logLR (0, 1 e 2) arbitrariamente adottati, le proporzioni di falsi positivi e di veri positivi per i confronti Altamura vs Sarda e Bagnolese vs Laticauda nell'analisi condotta con loci STR. La tabella mostra anche i valori della probabilità a posteriori che ogni soggetto con logLR maggiore rispetto al valore soglia considerato derivi dalla razza presunta, assumendo una uguale probabilità a priori per le due razze. Utilizzando la funzione di Tracciabilità Razziale implementata nel Software TraceDNA2, tutti i soggetti appartenenti alle sette razze autoctone sono stati attribuiti correttamente alla propria razza, mentre alcuni

capi di importazione sono stati attribuiti a razze pure, come ad esempio alla razza Laticauda, alla Comisana ed alla Bagnolese. Per quanto riguarda gli agnelli trimeticci, il Software TraceDNA2 non ha attribuito questi soggetti ad alcuna delle razze pure presenti nel database, mentre ha riconosciuto come pecore Comisane alcuni dei soggetti presenti nel gruppo delle merinizzate. Tra i possibili obiettivi della rintracciabilità razziale della carne ovina, accanto a quello di difendere le produzioni delle razze autoctone da quelle a più ampia diffusione nazionale (Sarda e Comisana), vi è la necessità di difendere le produzioni delle razze autoctone da

eventuali aggressioni sleali da parte del mercato estero. A seguito degli allarmanti episodi di contaminazione delle derrate alimentari di importazione, la preoccupazione dei consumatori circa la sicurezza delle carni e la richiesta di informazioni concrete è andata grandemente crescendo e la rintracciabilità razziale è divenuta di estrema importanza, sia per il mercato interno che per quello internazionale. L'obiettivo del lavoro è stato quello di valutare la possibilità di mettere a punto una metodica di rintracciabilità genomica della carne ovina, efficace e sicura, in grado di essere competitiva sul mercato. I risultati ottenuti sono incoraggianti, tuttavia, al fine di sag-

Tabella 2 - Analisi della potenza del test di assegnazione razziale con i marcatori STR.

| Test value of logLR | True positive | False positive | Probability | True positive | False positive | Probability |
|---------------------|--------------------------|----------------|-------------|-------------------------------|----------------|-------------|
| | <i>Altamura vs Sarda</i> | | | <i>Bagnolese vs Laticauda</i> | | |
| 0 | 0,9974 | 0,0021 | 0,9979 | 0,7904 | 0,2943 | 0,7287 |
| 1 | 0,9963 | 0,0015 | 0,9985 | 0,7708 | 0,2825 | 0,7318 |
| 2 | 0,9948 | 0,001 | 0,9989 | 0,7503 | 0,2709 | 0,7347 |



giarne la solidità e la conseguente applicabilità all'interno di una filiera alimentare, si rendono necessarie ulteriori analisi di conferma. Il passo successivo sarà quindi quello di effettuare una più approfondita analisi della potenza statistica del test alla base della metodica attraverso saggi mirati. Il limite di questa ricerca è stato quello di non aver potuto verificare a priori se i soggetti di importazione estera attribuiti a razze pure dal software TraceDNA2 lo fossero realmente, e questo a causa delle problematiche esistenti lungo la filiera di produzione della carne ovina proveniente dall'estero. Infatti, la documentazione ufficiale di accompagnamento di tali soggetti non riportava l'indicazione della tipologia genetica di appartenenza. La metodica che proponiamo per la rintracciabilità razziale prodotta con i risultati di questa ricerca, potrebbe costituire un valido sostegno alle produzioni delle razze oggetto dello studio, nel caso in cui queste venissero protette da un disciplinare che sancisse uno status di prodotto monorazza relativo ai prodotti carnei tradizionali e tipici.

BIBLIOGRAFIA

- Bjørnstad G., Røed K.H. Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. *Animal Genetics*, 32, 2, 59-65, 2001.
- Blott S.C., Williams J.L., Haley C.S. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity*, 82, 613-619, 1999.
- Ciampolini R., Levezuel H., Mazzanti E., Grohs C., Cianci D. Genomic identification of the breed of an individual or its tissue. *Meat Science*, 54, 35-40, 2000.
- Ciampolini R., Moazami-Goudarzi K., Vaiman D., Dillmann C., Mazzanti E., Foulley J.L., Levezuel H., Cianci D. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphism to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *Journal of Animal Science*, 73, 3259-3268, 1995.
- Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153, 4, 1989-2000, 1999.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 1, 47-50, 2005.
- Hansen M.M., Kenchington E., Nielsen E.E. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers: Methods and applications. *Fish and Fisheries*, 2, 93-112, 2001.
- ISAG/FAO Standing Committee. Secondary Guidelines for Development of National Animal Genetic Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (Mo-DAD): Recommended Microsatellite Markers. Recommendations of joint ISAG/FAO Standing Committee. <http://dad.fao.org/> Accessed Jan. 26, 2009. ISAG/FAO per la "Measurement of Domestic Animal Diversity", 2004.
- Mburu D.N., Ochieng J.W., Kuria S.G., Jianlin H., Kaufmann B., Rege J.E., Hanotte O. Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel (*Camelus dromedarius*) populations: implications for their classification. *Animal Genetics*, 34, 1, 26-32, 2003.
- MacHugh D.E., Loftus R.T., Cunningham P., Bradley D.G. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics*, 29, 333-340, 1998.
- Matassino D., Blasi M., Bongioni G., Incoronato C., Occidente M., Pane F., Pasquariello R., Negrini R. Authentication of swine derived products by means of SNP and STR markers. In: Book of Abstracts of the 61st Meeting of the European Association for Animal Production, Heraklion, Crete (Grecia), 23-27 agosto 2010: 212.
- Maudet C., Luikart G., Taberlet P. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science*, 80, 4, 942-950, 2002.
- Roques S., Duchesne P., Bernatchez L. Potential of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case study. *Molecular Ecology*, 8, 1703-1717, 1999.