



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI  
RISORSE NATURALI E AMBIENTE**

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ANIMALI**

**Studio di associazione tra polimorfismi in geni candidati  
e produzione, composizione chimica e contenuto  
in cellule somatiche nel latte di bovine di razza Bruna**

Relatore: Prof. Cecchinato Alessio

Correlatrice: Dott. Bobbo Tania

Laureanda: Bevilacqua Martina  
matricola n. 1027477

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

# INDICE

1.- INTRODUZIONE.....	2
1.1- Il settore lattiero-caseario italiano.....	2
1.2- Caratteri di qualità del latte.....	4
1.2.1.- Composizione chimica del latte.....	5
1.2.2.- Contenuto in cellule somatiche.....	8
1.3- Miglioramento genetico.....	10
1.3.1. Selezione assistita da marcatori.....	13
1.4- La razza Bruna.....	16
2- OBIETTIVI.....	20
3- MATERIALI E METODI.....	21
3.1- Raccolta dei campioni.....	21
3.2- Analisi dei campioni.....	22
3.3- Selezione dei geni candidati e degli SNP.....	22
3.4- Analisi statistica.....	23
4- RISULTATI E DISCUSSIONE.....	24
4.1- Statistiche descrittive.....	24
4.2- Stima dell'ereditabilità.....	25
4.3- Frequenze alleliche.....	26
4.4- Studio di associazione.....	28
5- CONCLUSIONI.....	32
6- BIBLIOGRAFIA.....	33
7- SITOGRAFIA.....	43
8- APPENDICE.....	44

# **1.- INTRODUZIONE**

## **1.1- Il settore lattiero-caseario in Italia**

Gli allevamenti di bovini da latte in Italia, come riportato da Clal (2013), presentano un patrimonio di vacche da latte di 1.862.000 capi, di cui 1.300.000 circa al Nord. Oltre il 50% degli allevamenti di vacche da latte è concentrato in cinque regioni: Trentino Alto Adige, Lombardia, Piemonte, Campania e Veneto.

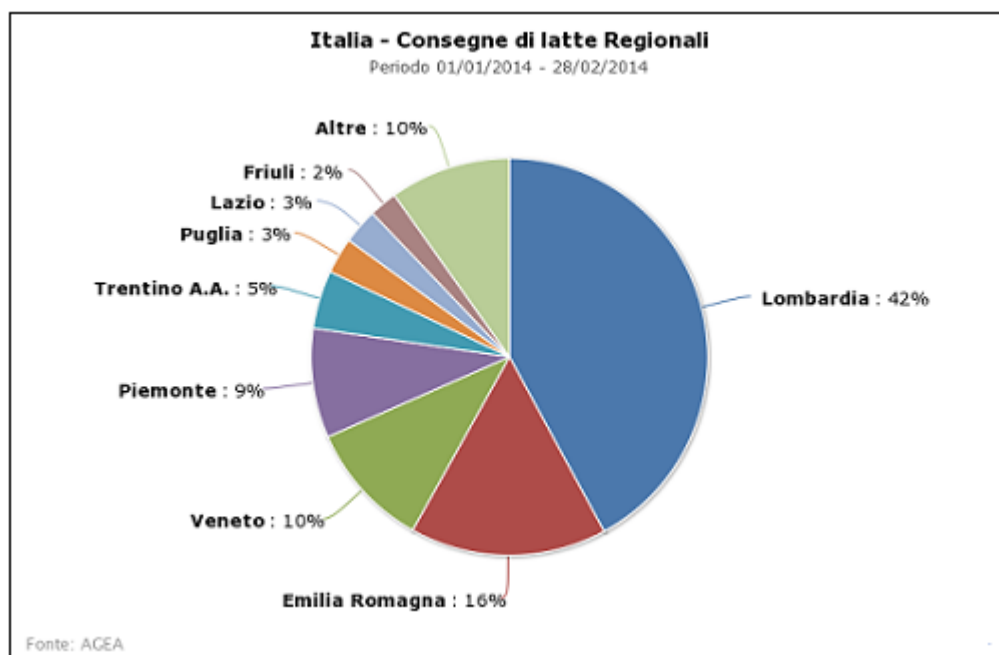
Negli ultimi tempi grandi trasformazioni nel mondo dell'allevamento hanno condotto ad una riduzione del numero di allevamenti di piccole dimensioni e con pochi capi, favorendo invece lo sviluppo di strutture più competitive, caratterizzate da una gestione di tipo imprenditoriale. Infatti, come si può osservare dai dati Istat, nel corso del ventennio 1990-2010, si è assistito a una consistente riduzione delle aziende da latte da 79.000 a 50.000 (-61%), con un aumento dei capi per azienda da 13 a 31. Attualmente le aziende di grandi dimensioni rappresentano il 17% del totale e complessivamente realizzano il 70% della produzione nazionale (oltre 500 t/anno). Le aziende di piccole dimensioni sono ancora abbastanza numerose (36%), ma realizzano solo il 3% della produzione (<50 t/anno). La tipologia aziendale più rappresentativa a livello nazionale è quella delle aziende con dimensione produttiva media (50-500 t/anno), che rappresenta il 47% del totale (Ismea, 2012).

Il comparto lattiero-caseario ha un'importanza strategica per l'agroalimentare italiano se si considera che esso, con un valore di 14,9 miliardi di euro, incide per l'11% sul fatturato del settore agroalimentare (Ismea, 2012).

Nel corso dell'anno 2013 le aziende agricole hanno prodotto 10,7 milioni di tonnellate di latte vaccino e rispetto al 2012, il latte di vacca raccolto è diminuito, registrando un calo del 1,51% (Clal). Le regioni più produttive, negli anni scorsi ed anche nel 2014, nell'ordine risultano essere: la Lombardia, l'Emilia-Romagna, il Veneto ed il Piemonte (Figura 1). Queste ultime da sole registrano, infatti, il 77% delle consegne di latte di vacca.

Per quanto concerne l'impiego del latte raccolto, si evidenzia che nel 2013 l'industria lattiero-casearia ha prodotto principalmente: 2,5 milioni di tonnellate di latte alimentare, 955 mila tonnellate di formaggi di latte bovino, 324 mila tonnellate di yogurt, 109 mila tonnellate di panna e 95 mila tonnellate di burro (Clal, 2013).

Figura 1: Consegne regionali di latte nei primi due mesi del 2014 (CLAL).



L'Italia è l'unico paese che destina una quota così elevata di latte, ossia circa il 70%, alla trasformazione in prodotti caseari (Istat) e contribuisce per circa il 14% alla produzione comunitaria di latte. Da questi dati si può facilmente intuire l'importanza della composizione chimica del latte e della qualità tecnologica del latte in relazione alla trasformazione casearia, per lo sviluppo economico del settore lattiero-caseario.

In Italia poi, grande rilievo è assunto dai prodotti a Denominazione di Origine Protetta (DOP), poichè essi tutelano la produzione e le conferiscono maggior pregio, essendo formaggi genuini e di qualità. I formaggi DOP costituiscono, infatti, circa il 40% del latte di produzione italiana e i sette principali formaggi DOP (Grana Padano, Parmigiano Reggiano, Gorgonzola, Pecorino Romano, Mozzarella di bufala Campana, Asiago e Provolone Val Padana) interessano, da soli, il 92% della produzione di formaggi a Denominazione di Origine Protetta (circa 450 mila tonnellate) (Clal, 2013).

La qualità dei prodotti lattiero-caseari italiani è andata migliorando sensibilmente negli ultimi venti anni, rispondendo così ai nuovi stili di consumo alimentare orientati agli aspetti nutrizionali e salutistici, di freschezza e leggerezza, qualità e tipicità.

Gli acquisti domestici nazionali di latte e derivati, hanno segnato nel 2013 un calo rispetto all'anno precedente. Secondo i dati rilevati da Clal, i consumi pro capite nel 2013 sono stati:

- latte: 51 kg. Nel nostro Paese il consumo di latte è notevolmente inferiore a quello di tutti gli altri Stati europei.

- formaggi: 22.7 kg. I consumi pro capite di formaggio sono tra i più alti in Europa e in continua crescita.
- yogurt: 8.6 kg.
- burro: 2.3 kg. Il consumo di burro risente della concorrenza dell'olio di oliva e di altri grassi vegetali.

Per quanto concerne le esportazioni la congiuntura è ancora molto positiva: in particolar modo i formaggi ottengono un aumento del 4,5% nel primo semestre 2013 (Ismea).

L'Italia riveste un'importanza significativa sul mercato internazionale dei prodotti caseari e rispetto agli altri Paesi si distingue per un alto posizionamento di prezzo dei suoi prodotti che raggiungono una fascia alta del mercato, grazie alla loro tipicità, alle loro caratteristiche qualitative, organolettiche e al loro status di prodotti di lusso della gastronomia, pur soffrendo di problemi quali l'*Italian sounding* e l'*agropirateria* (Cecchinato et al., 2008).

## 1.2- Caratteri di qualità del latte

La qualità di un alimento è definita da più fattori, quali le sue caratteristiche nutrizionali, sensoriali, e la sua risposta a requisiti di qualità e salubrità attesi dai consumatori (Hocquette e Gigli, 2005).

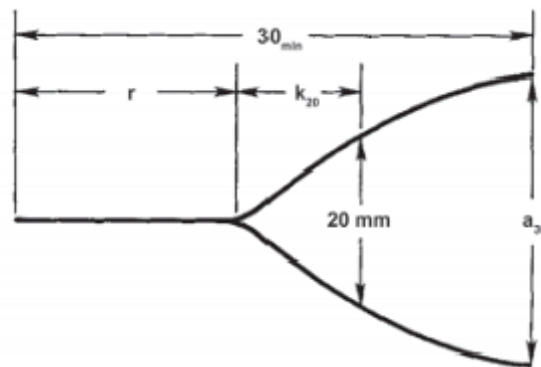
Nello specifico, la qualità del latte comprende: la composizione chimica del latte, cioè requisiti nutrizionali come soprattutto il contenuto di proteina e grasso, i parametri igienico-sanitari e quelli tecnologici-caseari, intesi come capacità del latte di trasformarsi, con alte rese, in prodotti di elevata qualità organolettica (Bittante et al., 2003).

In termini di qualità del latte, un aspetto fondamentale per il nostro Paese è legato alle proprietà tecnologiche per la trasformazione in formaggi tipici, le quali sono influenzate dalla composizione chimica del latte (Stefanon et al., 2002). Il rapporto tra qualità del latte e del prodotto trasformato diviene ancora più importante se ci si riferisce a formaggi DOP a media o lunga stagionatura, prodotti da latte crudo, per i quali le modifiche apportabili alla materia prima sono ridotte se non vietate (Verdier et al., 1995). La qualità tecnologica del latte è notevolmente importante per la valutazione del latte destinato a trasformazione casearia e può essere espressa in termini di attitudine alla coagulazione (Mariani et al., 2002). Quest'ultima è comunemente valutata tramite analisi lattodinamografica (LDG), che considera il comportamento del latte all'aggiunta di caglio.

Come riportato da Bittante et al. (2012), i tre parametri che la definiscono sono:

- il tempo di coagulazione (RCT, min), intervallo di tempo che intercorre tra l'aggiunta del caglio (tempo 0) e l'apertura del tracciato;
- il tempo di rassodamento ( $k_{20}$ , min), tempo necessario al coagulo per raggiungere una resistenza meccanica tale da determinare un'ampiezza del tracciato di 20 mm;
- la consistenza del coagulo a 30 minuti ( $a_{30}$ , mm), ampiezza del tracciato a 30 minuti dall'aggiunta del caglio (Figura 2).

Figura 2: Esempio di tracciato ottenuto con lattodinamografo dopo l'aggiunta di caglio nel latte: RCT,  $k_{20}$ ,  $a_{30}$  (McMahon e Brown, 1984).



### 1.2.1 Composizione chimica del latte

Il latte è un alimento ricco d'acqua (87%) e fornisce energia (2.98 MJ/kg) attraverso i suoi costituenti principali (grassi, proteine, carboidrati) e quelli minori (minerali, vitamine, enzimi..) (INRAN).

La composizione del latte nell'ambito della stessa specie, varia in rapporto a fattori genetici (razza, individuo), fisiologici (stadio di lattazione, n° di parti), patologici (mastiti) ed ambientali (tipo di stabulazione, alimentazione etc.) (Cecchinato et al., 2008).

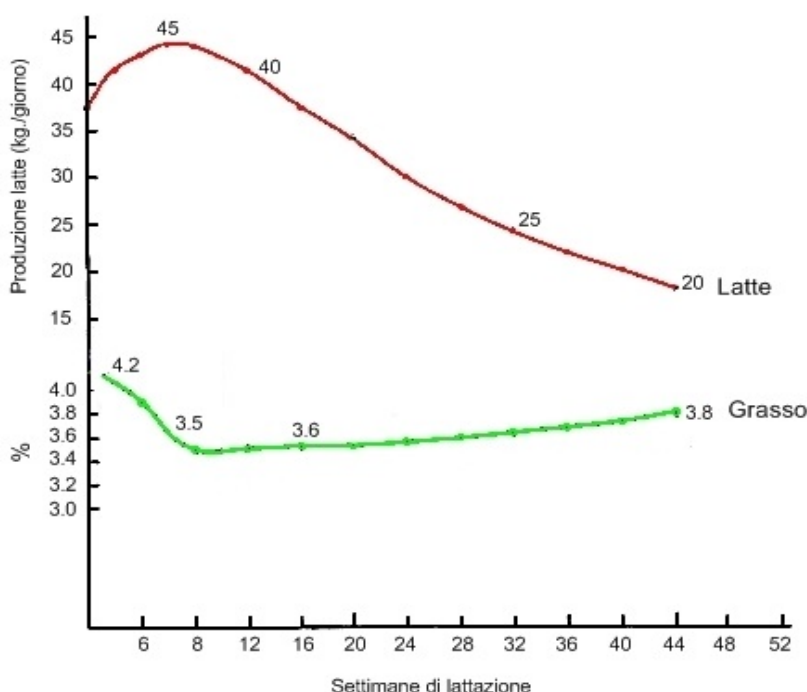
#### Grasso

I lipidi nel latte sono principalmente trigliceridi e ne rappresentano il 3.6% circa (INRAN), costituiscono la principale fonte di energia del latte, ne determinano il sapore ed influenzano le proprietà reologiche del latte (Laben, 1963). Nelle prime fasi della caseificazione generalmente il grasso non prende parte ad attività importanti, esso però viene inglobato ed entra a far parte del reticolo caseinico influenzandone la struttura e la consistenza, svolgendo un ruolo importante in fase di maturazione e stagionatura, influenzando in maniera determinante le caratteristiche

organolettiche del prodotto finito (Salvadori Del Prato, 1998).

La quantità e la composizione di grasso sono fortemente influenzate da vari fattori, tra cui lo stadio di lattazione e l'alimentazione (il pascolo per esempio migliora il profilo acidico del latte) (Bailoni et al., 2005). In Figura 3 si può osservare come il contenuto di grasso nel latte raggiunga il valore minimo a 2-3 mesi dal parto, in corrispondenza del picco di produzione, mentre tenda poi a un progressivo aumento, che però non torna a toccare il valore più elevato di inizio lattazione.

Figura 3: confronto tra la curva di produzione (---) e quella di grasso (---) del latte in relazione allo stadio di lattazione (Accomando G., 2011).



## Proteine

Le proteine costituiscono circa il 3.3% del latte, di cui il 75% è rappresentato da caseine (alfas1, alfas2, beta, kappa e gamma) e il 25% da proteine del siero (lattoalbumine, lattoglobuline) (INRAN).

La frazione proteica del latte ha un valore nutrizionale unico grazie al suo bilanciato contenuto di aminoacidi essenziali (Laben, 1963) e la sua composizione è importante ai fini della trasformazione casearia (Mariani et al., 1976).

Il contenuto di proteina è influenzato da vari fattori, tra cui: lo stadio di lattazione (il valore più

basso di proteina si ha al picco di lattazione), l'età della bovina (il contenuto proteico decresce con l'età) e l'alimentazione (per esempio razioni a scarso contenuto proteico o elevata fibrosità riducono la proteina nel latte) (Laben, 1963).

### **Caseine**

Le variazioni quanti-qualitative della caseina si ripercuotono in misura determinante sul rendimento industriale della trasformazione casearia e, nel contempo, sono in grado di influire in misura significativa su alcune caratteristiche reologiche della cagliata, con riflessi diretti sulla struttura della pasta e sulla qualità del formaggio (Mariani et al., 2002).

Come riportato da Aleandri et al. (1986) e Ng-Kwai-Hang et al. (1986), le caseine  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  influenzano in modo significativo il contenuto di proteina, mentre la  $\kappa$ -caseina influenza il contenuto di caseina totale (Ng-Kwai-Hang et al., 1986), la resa casearia (Mariani et al., 1976; Aleandri et al., 1990), e il contenuto di proteina (Ng-Kwai-Hang et al., 1984; Aleandri et al., 1986, 1990; Ikonen et al., 1999). La  $\beta$ -caseina è associata alla percentuale di grasso e proteine (Ng-Kwai Hang et al., 1984), e alla consistenza del coagulo (Ikonen et al., 1999).

Le varianti genetiche delle caseine, ad esempio quelle della  $\kappa$ -caseina soprattutto, esercitano influenze diverse nei riguardi della resa casearia. La variante B è la più favorevole per il latte destinato alla trasformazione casearia in quanto determina una coagulazione generalmente in tempi più rapidi e la formazione di un coagulo più consistente. Il latte  $\kappa$ -caseina A, invece, tende più frequentemente a collocarsi tra quelli la cui attitudine alla coagulazione risulta meno favorevole.

### **Lattosio**

La frazione glucidica del latte è costituita prevalentemente da lattosio e rappresenta circa il 4.9% del latte (INRAN). Il lattosio svolge un ruolo importante ai fini della trasformazione del latte in quanto rappresenta il substrato essenziale utilizzato dai batteri filo-caseari. Infatti a partire dal lattosio essi producono acido lattico che conduce al progressivo abbassamento del pH, quindi un abbassamento di questo disaccaride comporta un allungamento dei tempi di acidificazione della cagliata. Questo ritardo porta a uno sviluppo di batteri anticaseari fermentanti che può provocare la comparsa di gonfiori nel formaggio (CoRFiLaC).

Secondo Welper e Freeman (1992), la percentuale di lattosio è correlata positivamente con le percentuali di grasso e proteina.



## **Urea**

L'urea è il principale composto azotato non proteico presente nel latte. Concentrazioni elevate di urea nel latte hanno un effetto negativo sulle caratteristiche di caseificabilità del latte: in primo luogo infatti, esse causano un aumento dei tempi di coagulazione, come rilevato da Castagnetti et al. (1995).

Inoltre numerose ricerche, confermate e approfondite recentemente da uno studio statistico di Hristova et al. (2014) sulle bovine di razza Holstein di allevamenti in Macedonia, hanno dimostrato che il contenuto di urea è direttamente coinvolto, oltre che nel tempo di coagulazione, anche nella qualità della cagliata. Infatti, elevate concentrazioni di urea sono la causa diretta o indiretta di numerosi problemi, quali formazione di una cagliata non consistente, un'elevata proteolisi e la comparsa precoce di fermentazioni anomale.

### **1.2.2 Contenuto in cellule somatiche**

Il termine "cellule somatiche" fu riportato per la prima volta nel 1910 da Prescott e Breed, i quali ritenevano che l'aumento delle cellule contenute nel latte di un animale con mastite fosse dovuto allo sfaldamento delle cellule epiteliali della mammella. Oggi le cellule somatiche hanno mantenuto questo nome, ma è stato dimostrato che si tratta soprattutto di neutrofili provenienti dal sangue (Zecconi, 2007).

La mastite, infiammazione della ghiandola mammaria, danneggia le cellule secernenti della mammella, provocando un rialzo nel contenuto di cellule somatiche nel latte (SCC) e causando un declino della quantità di latte prodotto e drastici cambiamenti nella composizione qualitativa del latte, che rendono il latte meno adatto al consumo e alla trasformazione (Harmon, 1994). Le cellule somatiche quindi, oltre ad essere indice di mastite, sono anche accettate come standard di qualità del latte prodotto (Zecconi, 2007).

Per stimare il calo della produzione si fa riferimento alla consolidata relazione che esiste tra SCC e quantità di latte prodotto (Barlett et al., 1990). Secondo Jones (1986), abbassare il contenuto in cellule somatiche porta un vantaggio sia ai produttori che ai trasformatori, infatti i valori più bassi di SCC si riscontrano con alte produzioni di latte e con latte di migliore qualità. Ciò è dimostrato anche dallo studio di Kukovics et al. (1996) sulla correlazione fenotipica negativa che intercorre tra SCC e quantità di latte prodotto. Un livello di SCC superiore a 200,000 cellule/mL indica un latte mastitico, una mammella ormai non più sana ed è stato stimato che in una mandria con valori di SCC di 500,000 cellule/mL si può avere una riduzione nella produzione di latte del 6% (National Mastitis Council, 1996).

La mastite inoltre interferisce con la sintesi di proteine, grassi e lattosio (Schallibaum, 2001). Harmon (2004) evidenzia che, anche se il contenuto totale di proteine diminuisce poco, il tipo di proteine presenti nel latte cambia. Infatti si assiste a una diminuzione della caseina, principale proteina del latte di elevata qualità nutrizionale, ed a un aumento delle proteine di bassa qualità nutrizionale, come le proteine del siero, che passano nel latte a causa di cambi della permeabilità vascolare. Haenlein et al. (1973) riportano una diminuzione significativa del contenuto di caseina quando il latte delle bovine Holstein o Guernsey supera il valore SCC di 500,000; e diminuisce in modo molto evidente intorno a valori di SCC di un milione. Un SCC di circa 500,000 è stato associato con una scarsa qualità del formaggio, a causa di incrementi nel tempo di coagulazione e minore consistenza del coagulo, la resa casearia è pertanto nettamente inferiore.

La mastite provoca inoltre una riduzione del valore nutritivo del latte in termini di contenuto di grasso, come riportato da Sharif et al. (2007). Gudding (1982) ha scoperto che l'infezione da *Staphylococcus aureus* causa un aumento nella concentrazione di acidi grassi liberi (NEFA) del latte, mentre Everson (1980) ha osservato che il latte con un livello di SCC di 700,000 o più era rancido. Saperi rancidi sono dovuti alla diminuzione del grasso e a un cambiamento di composizione del grasso, ossia all'aumento di acidi grassi a corta catena.

Si ha anche una diminuzione del lattosio, che altera l'equilibrio osmotico del latte, causando un minore afflusso d'acqua alla mammella e una riduzione del volume di latte prodotto (Schalm et al., 1971).

In caso di mastite, si assiste inoltre a uno squilibrio del contenuto di minerali del latte (Harmon, 1994). La concentrazione di minerali nel sangue e nel liquido extracellulare aumenta, poiché i vasi sanguigni sono più permeabili e dotti ed epitelio secernente sono danneggiati per l'infiammazione. Per questo, sodio e cloro passano nel latte e, per mantenere l'equilibrio osmotico, il potassio viene riassorbito nel sangue. Il calcio decresce, concorrendo a una coagulazione anomala (Zecconi, 2007).

Gli enzimi collegati alla sintesi del latte diminuiscono e quelli relativi all'infiammazione invece aumentano. Infatti, gli enzimi che originano dai fagociti si accrescono esponenzialmente, essi includono N-acetyl--D-glucosaminidase (NAGase), beta-glucuronidasi e catalasi. Anche l'attività degli enzimi che provengono dal sangue aumenta, per esempio quella del plasminogeno, che viene attivato localmente a plasmina, un enzima proteolitico che degrada fibrina e caseina (Pyörälä, 2003).

Nella tabella 1 vengono riportati schematicamente i cambiamenti nella composizione chimica del latte causati dalla mastite.

Tabella 1. Principali cambiamenti nella produzione e nella composizione del latte causati dalla mastite (Pyörälä, 2003).

Decrease	Degree of change	Increase	Degree of change
Quarter milk yield	-(--)	Somatic cell count	+++
Dry matter	-	Whey proteins	+++
Lactose	-	Bovine serum albumin	+
Fat	-	Immunoglobulins	+++
Long-chained fatty acids	-	$\kappa$ casein	+(+)
Total casein	--	Protease peptones	++
$\alpha_{S1}$ casein	--	Free fatty acids	++
$\beta$ casein	---	Short-chained fatty acids	+
$\alpha$ lactalbumin	-	Sodium	++
$\beta$ lactoglobulin	---	Chloride	++
Calcium	---	Lactate	+++
Magnesium	---	Enzyme activity	
Phosphorus	---	Lipase	++
Zinc	-	Lysozyme	+++
Potassium	-	NAGase	+++
		$\beta$ glucuronidase	+++
		Plasmin	+++

### 1.3 Il miglioramento genetico

Il miglioramento genetico in zootecnia è la tecnica che porta ad ottenere un aumento nelle prestazioni produttive e riproduttive degli animali d'allevamento attraverso la scelta dei riproduttori considerati più validi. Esso è un metodo di produzione a disposizione dell'allevatore al pari di altri (quali l'alimentazione, la mungitura, la riproduzione, la stabulazione..), tuttavia, rispetto a questi, gli incrementi di produttività portati dal miglioramento genetico sono di tipo permanente (Pulina, 2000).

I caratteri d'interesse del miglioramento genetico sono quantitativi e in quanto tali presentano diverse caratteristiche: sono misurabili, hanno variabilità continua, sono influenzati dall'ambiente e si esprimono secondo un modello poligenico additivo, ma possono risentire anche di effetti genetici non additivi (Bittante et al., 2005).

In primo luogo, in un programma di miglioramento genetico bisogna fissare gli obiettivi e le priorità, in modo da identificare gli animali che maggiormente vi si avvicinano. È fondamentale quindi decidere quali caratteri selezionare, per individuare poi quali e quanti debbano essere gli animali da avviare alla riproduzione. L'obiettivo prioritario è quello di massimizzare il reddito dell'allevatore, perciò si selezionano le caratteristiche degli animali che portano ad un risvolto economico vantaggioso, incrementando i ricavi (ottenuti in gran parte dalla vendita del prodotto) e contenendo il più possibile i costi (per esempio il risparmio dell'allevatore dovuto ad animali longevi o con buone caratteristiche riproduttive) (Miglior et al., 1998).

Nella razza Frisona per esempio, l'obiettivo prioritario circa 50 anni fa era principalmente quello di aumentare la quantità di latte prodotta, così questo carattere subì una selezione intensa; mentre negli ultimi decenni è aumentato in modo considerevole l'interesse per caratteri "secondari", come longevità, fertilità e soprattutto qualità delle produzioni (Bagnato e Maltecca, 2003).

Una volta definitivi gli obiettivi, si procede alla valutazione genetica dei riproduttori, alla cui base stanno le registrazioni anagrafiche, che consentono di conoscere le relazioni di parentela tra gli animali e sono contenute nei libri genealogici (LG). Le attività del libro genealogico sono gestite dalle Associazioni Nazionali di Razza, le quali collaborano con le Associazioni Regionali Allevatori e con quelle Provinciali per le province autonome (es. Trento e Bolzano) (ANARB, 2006). Per poter stimare il valore riproduttivo dei soggetti inoltre, è indispensabile poter disporre delle misurazioni delle performance loro e dei loro parenti. In Italia la registrazione dei dati produttivi e riproduttivi dei bovini da latte è affidata all'Associazione Italiana Allevatori (AIA, 1981), che rileva questi dati tramite controlli funzionali. La stima del valore riproduttivo o indice genetico (EBV = "Estimated Breeding Value) degli individui oggetto di selezione è il punto essenziale in un programma di miglioramento genetico dei caratteri quantitativi; questa stima infatti deve essere la migliore possibile (Pagnacco, 1996). Per effettuare la valutazione genetica i caratteri devono essere ereditabili; più l'ereditabilità del carattere è elevata (cioè più gli effetti genetici incidono sul fenotipo), maggiore è la possibilità di effettuare stime accurate dei valori riproduttivi. I caratteri produttivi hanno valori di ereditabilità medi, mentre i caratteri morfologici hanno valori molto variabili, per esempio la statura ha ereditabilità alta, mentre i caratteri che descrivono il piede hanno i valori più bassi. La selezione richiede anche che vi sia variabilità: se tutti gli individui fossero uguali non ci sarebbero individui migliori da scegliere come riproduttori (ANARB, 2008).

L'accuratezza indica quanto la stima si avvicina al reale valore genetico ed è determinata come detto dall'ereditabilità del carattere, ma anche dalla quantità e dalla qualità delle fonti di informazioni utilizzate nel processo di stima. Infatti, la scelta del modello e del metodo di stima

più adatto al tipo di carattere preso in esame, alla modalità di registrazione dei dati fenotipici e al tipo di popolazione è la base fondamentale per poter effettuare una stima dell'indice genetico attendibile (ANARB, 2008). I metodi di stima dell'EBV sono diversi e possono basarsi sul fenotipo dell'individuo stesso (performance test), degli ascendenti (indice pedigree), dei collaterali (sib test) o dei discendenti (progeny test). Ma possono essere usate anche tutte le informazioni disponibili contemporaneamente, come accade con l'Animal Model, calcolato con procedura BLUP (Best Linear Unbiased Prediction); esso è il più complesso e accurato metodo di stima oggi presente (Bittante et al., 2005).

Una volta valutati i riproduttori e scelti secondo criteri di selezione precisi, ci si trova di fronte al passaggio più importante: la previsione della risposta ottenibile con un determinato programma di selezione. Allo scopo il miglioramento genetico impiega il parametro del progresso genetico previsto, che serve appunto per la valutazione del grado di efficienza di un determinato schema di selezione. La scelta degli animali migliori in base all'indice genetico infatti produce, generazione dopo generazione, un miglioramento genetico della popolazione. Tale risposta alla selezione misura quanto la media dei figli, per i diversi caratteri, si sposti rispetto alla media dei genitori (Pulina, 2000).

Il progresso genetico annuale di una popolazione si può stimare con la seguente formula generale (Bittante et al., 2005):

$$\Delta_g = \frac{r \times i \times \sigma_a}{N}$$

dove

$\Delta_g$  = progresso genetico annuale

r = accuratezza di stima

i = intensità di selezione

$\sigma_a$  = deviazione standard

N = intervallo di generazione.

Negli ultimi 50 anni si è ottenuto un progresso genetico molto forte per i principali caratteri di produzione e questo è stato possibile principalmente grazie a: un aumento dell'accuratezza delle valutazioni genetiche, una diminuzione dell'intervallo di generazione dovuta ad una maggiore precocità degli animali e, soprattutto, all'introduzione di tecniche riproduttive che hanno permesso di aumentare notevolmente l'intensità di selezione (Nicoletti, 2011).

### **1.3.1- Selezione assistita da marcatori**

Il tradizionale miglioramento genetico delle produzioni, che prevede l'uso di informazioni fenotipiche e sulle parentele per stimare gli indici genetici, ha avuto molto successo. Però, è possibile aumentare l'accuratezza degli indici genetici usando anche le informazioni sulle variazioni presenti a livello delle sequenze di DNA tra i vari animali (Goddard e Hayes, 2007).

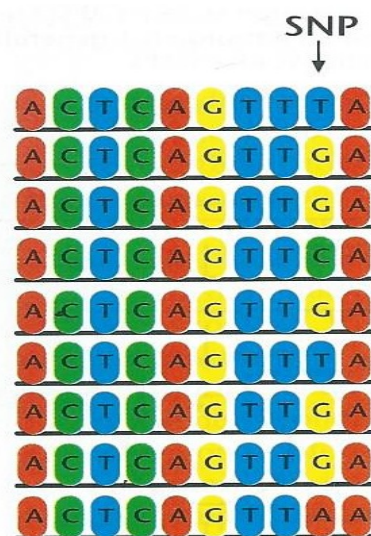
I tradizionali metodi di selezione artificiale si possono integrare con la genetica molecolare, applicando la MAS, o selezione assistita da marcatori, dove per marcatore si intende quel locus genetico che distingue in modo univoco il tratto cromosomico col quale si identifica e le regioni circostanti (Lande e Thompson, 1990). Infatti, i marcatori associati ai quantitative trait loci (QTL) -ossia regioni del genoma che contengono geni associati con un particolare carattere quantitativo (Collard et al., 2005)- possono essere utilizzati per la MAS, così da incrementare il progresso genetico (Kashi et al., 1990). La selezione non avviene sui QTL direttamente, ma sul marcatore a esso associato, mediante linkage disequilibrium (Daetwyler et al., 2008).

Sebbene l'idea di usare i marcatori per incrementare il guadagno negli allevamenti ci fosse già da decenni (Smith, 1967; Soller e Beckman, 1983), l'adozione della selezione assistita da marcatori da parte degli allevamenti è avvenuta solo di recente e ci sono diverse ragioni per questo. Molti caratteri quantitativi, come quelli relativi alla produzione, sono interessati ognuno da un gran numero di loci, e ogni locus cattura solo una limitata proporzione della varianza genetica totale. Di conseguenza, con un limitato numero di marcatori e il costo elevato della genotipizzazione, c'erano poche possibilità di guadagno (Hayes et al., 2009).

Ma, sempre come riportato Hayes et al. (2009), due nuovi sviluppi hanno rivoluzionato la selezione genomica. Il primo è stato il sequenziamento del genoma bovino, che ha portato alla scoperta di migliaia di marcatori del tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism), e una concomitante riduzione dei costi di genotipizzazione. Il secondo, la dimostrazione che era possibile prendere decisioni selettive attendibili basandosi sui dati ricavati da marcatori ad alta densità, quindi attraverso la selezione genomica (Meuwissen et al., 2001). Quest' ultima infatti utilizza gli indici genomici (GEBV), derivati da un equazione di stima basata sugli SNP combinata agli indici genetici tradizionali (Rossoni, 2009).

Gli SNP (Figura 4) sono mutazioni puntiformi disperse casualmente lungo tutto il genoma e sono i marcatori del DNA più diffusi, cioè uno ogni 500-1000 nucleotidi (Blasi et al., 2005). Identificano polimorfismi di singoli nucleotidi sia nelle regioni non codificanti che in quelle codificanti del DNA (Dwight et al., 2000).

Figura 4: Esempio di una sostituzione nucleotidica (SNP) (Barcaccia G. e Falcinelli M., 2006).



L'obiettivo principale di quasi tutti, se non tutti, gli studi sui QTL riguardanti le bovine da latte è quello di identificare regioni genomiche che possano essere utilizzate nella selezione assistita da marcatori (Spelman e Garrick, 1998). Dalla prima completa analisi del genoma nelle bovine da latte sono stati avviati molti studi di mappatura (Bovenhuis e Schrooten, 2002), che hanno portato alla scoperta di un gran numero di QTL per caratteri di media o alta ereditabilità come la produzione e la composizione di latte (Daetwyler, 2008).

Per esempio, l'analisi del genoma per la ricerca di QTL che interessano la produzione di latte nelle bovine da latte di razza Norvegese ha rilevato QTL per uno o più dei caratteri che influenzano produzione e composizione del latte (produzione di latte, percentuale di proteina, produzione di proteina, percentuale di grasso e produzione di grasso) sui cromosomi 3, 5, 6, 11, 13, 18 and 20 (Olsen et al., 2002). Un QTL altamente significativo per proteina e grasso percentuali è stato trovato nel mezzo del cromosoma 6, vicino al marcatore FBN9. L'analisi ha anche indicato che un QTL che influenza la produzione di latte potrebbe essere posizionato nella stessa regione.

I progressi nell'identificazione di loci e di regioni cromosomiche che riguardano i tratti di interesse economico aprono prospettive interessanti per il miglioramento della produzione di latte. La selezione assistita da geni, cioè, l'uso di mutazioni funzionali direttamente responsabili delle differenze tra fenotipi, al momento è l'opzione più efficiente della selezione assistita da marcatori (Dekkers, 2004). Loci con effetti noti sulla fisiologia della produzione di latte sono stati proposti come geni candidati e le relazioni tra i loro polimorfismi e diversi caratteri che influenzano la produzione del latte sono stati testati (Hayes e Goddard, 2001; Grisart et al.,

2002; Khatib et al., 2008).

Il gene SCD (stearoyl-CoA desaturase) per esempio, influenza il profilo acidico del latte (Gautier et al., 2006), un aspetto fondamentale della qualità nutrizionale (Bauman et al., 2006), quindi il polimorfismo al locus SCD potrebbe essere utilizzato per migliorare la qualità del latte. In un campione di Frisone italiane si è visto che questo polimorfismo è associato anche con la produzione di latte e di proteina (Macciotta et al., 2008). Nelle Figure 5 e 6, infatti, si può notare come il genotipo VV sia associato a maggiore produzione di latte e di proteina rispetto al genotipo AA, associato invece ai valori più bassi. Le vacche con genotipo AV presentano invece valori intermedi.

*Figura 5: Curve medie di lattazione per la produzione di latte nelle vacche con differenti genotipi SCD (Macciotta et al., 2008).*

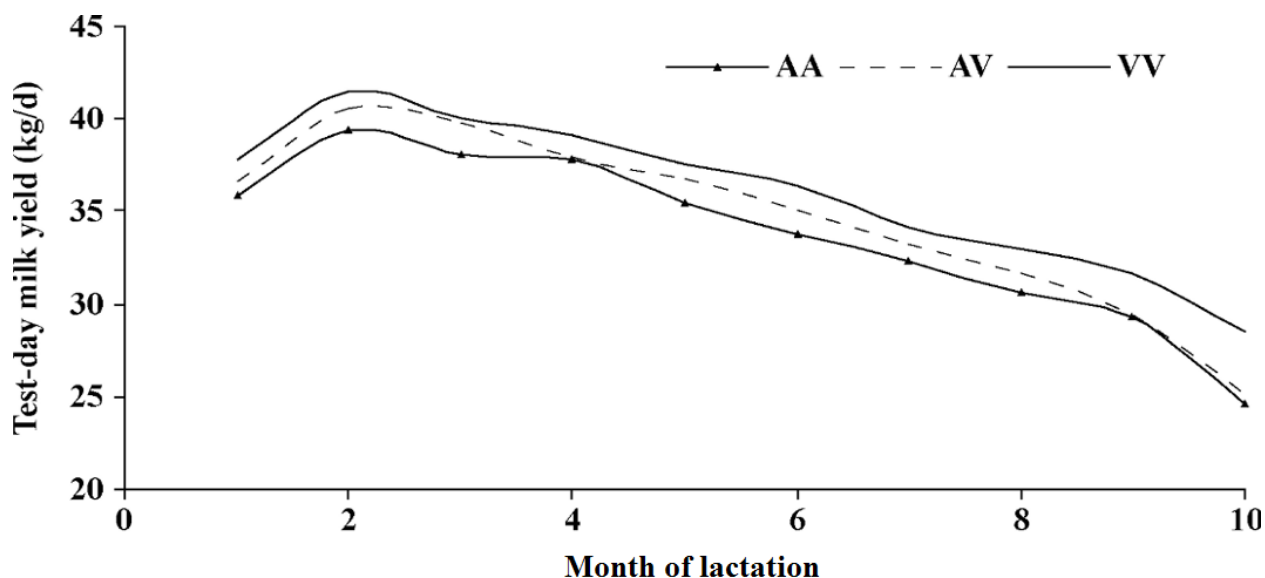
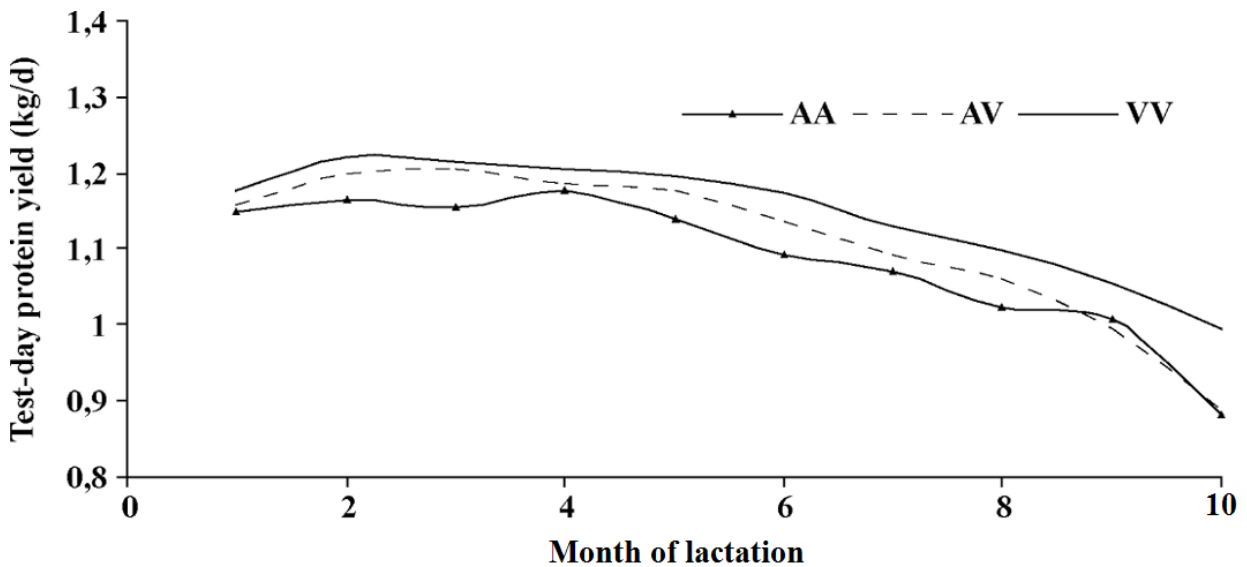




Figura 6: Curve medie di lattazione per la produzione di proteina nelle vacche con differenti genotipi SCD (Macciotta et al. 2008).



## 1.4- La razza Bruna italiana

La Bruna Alpina, come si chiamava un tempo, conobbe una grande diffusione anche al di fuori delle Alpi e nel 1950 era la razza bovina da latte più importante d'Italia, ma la diffusione negli anni successivi della razza Frisona portò ad una forte diminuzione della Bruna in pianura. Per compensare il sempre maggior scarto tra la produzione della Bruna e della Frisona vennero introdotti riproduttori da altri paesi europei, ma soprattutto, a partire dal 1972, dagli Stati Uniti, dove era allevata la Brown Swiss. Il ceppo italiano di Bruna da allora si è avvicinato sempre più a quello americano, determinando una sostanziale trasformazione della razza, che ha assunto le caratteristiche di razza specializzata "spinta" per la produzione del latte e ha perso in parte le caratteristiche che ne facevano una discreta produttrice di carne, adatta alle condizioni di allevamento della montagna, nonché una vacca longeva e resistente. Dal 1981, preso atto del sostanziale cambio dell'identità della razza, il nome di Bruna Alpina è stato abbandonato a favore di Bruna Italiana (Corti, 2008).

Negli anni '90 vede la luce l'ITE (Indice Totale Economico), un indice globale che indica il valore riproduttivo dell'animale nel suo insieme e che considera simultaneamente più caratteri ritenuti importanti per la selezione. Tali caratteri sono esaminati all'interno dell'ITE con un peso diverso in funzione della loro diversa importanza economica, tenendo conto delle correlazioni

esistenti tra tutti i caratteri (ANARB, 2008).

L'ITE ha subito diverse modifiche dal 1990 ad oggi, infatti inizialmente considerava solo gli obiettivi di quantità e qualità (Carollo, 2010), mentre le correzioni portano nel 2006 ad un indice complessivo ancor più composito che conteneva quantità e qualità, ma anche longevità, mungibilità/sanità, morfologia (Figura 7) (Rossoni et al., 2006).

*Figura 7: Rappresentazione schematica dell'ITE e le sue variazioni nel corso del 2005-2006 (Rossoni et al., 2006).*

	Vecchio Ite (fino a maggio 2005)		Ite 2005 (da maggio 2005 a maggio 2006)		Nuovo Ite 2006 (da maggio 2006)	
	Peso statistico	Importanza relativa	Peso statistico	Importanza relativa	Peso statistico	Importanza relativa
Grasso kg	1	19%				
Grasso %	0,1	2%				
Proteina kg	3	57%	5	59%	5	45%
Proteina %	0,4	8%	1	12%	1	9%
Longevità	0,8	15%	1	12%	2	18%
Velocità di mungitura			1	12%	1	9%
Cellule somatiche			0,5	6%	0,5	5%
Punteggio finale					1	9%
Forza delle pastoie					0,5	5%

Gli obiettivi di selezione sono quindi l'aumento quali-quantitativo delle produzioni, mantenendo però la longevità e la funzionalità degli animali. Per aumentare i ricavi, gli obiettivi specifici della razza riguardano la resa in formaggio e parallelamente l'incremento della qualità, quindi i kg di proteina, la percentuale di proteina e la variante genetica della della k-caseina (ANARB, 2008). Infatti, l'indice "kg di proteina" nell'ITE è rivalutato del 5% se l'animale ha un genotipo per la k-caseina di tipo BB, che è il genotipo più favorevole nella caseificazione. Per gli animali con genotipo AB si ha una rivalutazione del 2,5% dell'indice "kg di proteina" (Ghiroldi et al., 2005).

Gli elementi che incidono sulle spese di produzione sono molteplici, quelli di maggiore rilevanza individuati sono la longevità degli animali, la predisposizione alla resistenza all'insorgenza di mastiti, la velocità di mungitura e l'armonia nell'aspetto morfologico (ANARB, 2008).

Successivamente al calcolo dell'ITE si può dividere la popolazione in fasce di merito

denominate fasce di rank (ranghi). Se per esempio un animale è rank 99, significa che fa parte del miglior 1% della popolazione per ITE (ANARB, 2008).

Negli ultimi anni l'associazione nazionale di razza Bruna si è dimostrata all'avanguardia anche nel campo della genomica: nel 2002 infatti, è entrata a far parte del progetto BOVMAS, finanziato dall'Unione Europea, il cui obiettivo era la ricerca di QTL (Rossoni et al., 2003). Inoltre quella della Bruna è stata la prima associazione di razza a livello mondiale che, nel 2009, ha partecipato a un progetto comune internazionale sulla genomica, con un accordo firmato dalla Federazione europea della Bruna e da Interbull (Santus, 2009). Nel tempo, con l'aumento dei soggetti esaminati e lo sviluppo tecnologico che ha portato a poter analizzare più SNP a un minor costo, si è giunti a un aumento dell'attendibilità delle valutazioni genomiche, il che ha portato nel 2011 a poter commercializzare animali con queste valutazioni (Rossoni, 2011). Inizialmente le valutazioni riguardavano soltanto i tori, ma nel 2012 si sono estese anche alla popolazione femminile (Rossoni, 2012).

Numerosi progetti di mappaggio di QTL hanno permesso di identificare diverse regioni cromosomiche associate a caratteri di interesse produttivo (Bagnato et al., 2005). Per esempio, in uno studio del 2009-2010 dell'Università di Milano sulla razza Bruna (Schiavini, 2010) sono state identificate 41 regioni contenenti QTL nei 29 autosomi bovini (BTA) e la loro posizione.

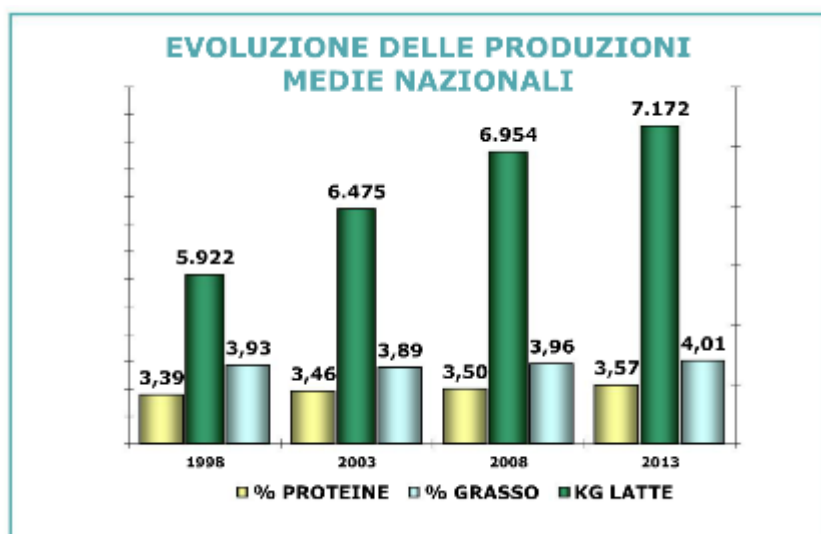
Le regioni contenenti QTL sono distribuite su tutti e 29 i BTA, eccetto i BTA 14, 16, 22, 25 e 27. Il numero più elevato di QTL è stato identificato nel BTA1, con 4 diverse regioni. Tre regioni sono state identificate sui BTA 8 e 18. Undici cromosomi (BTA 2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 26, 28, and 29) hanno mostrato 2 regioni, e i dieci rimanenti cromosomi (BTA 5, 10, 11, 15, 17, 19, 20, 21, 23 and 24) ne hanno mostrata solo una .

Invece nel lavoro di Bagnato et al. (2005) riguardante la razza Bruna, sono state identificate 2 possibili regioni QTL anche sul cromosoma 14 nelle quali sono stati trovati marcatori in associazione con latte (kg) e proteina (%). Nella regione centromerica è stato inoltre studiato il genotipo per il gene DGAT1, il quale è stato recentemente proposto come causativo di un maggior contenuto lipidico nel latte.

Recentemente inoltre le varianti alleliche del gene SCD sono state associate con il contenuto di proteina e caseina e con la consistenza del coagulo (Cecchinato et al., 2012).

La selezione negli anni ha portato ad ottenere bovine di razza Bruna con produzioni di latte di 70 quintali all'anno, con 4,01% di grasso e 3,57 % proteina (Figura 8) e una maggioranza di soggetti con variante BB della caseina.

Figura 8: Evoluzione delle produzioni medie nazionali dal 1998 al 2013 (ANARB, 2013).



## **2.- OBIETTIVI**

Scopo primario di questo lavoro è stato quello di studiare il polimorfismo di alcuni marcatori SNP con caratteri legati alla produzione e alla composizione del latte, al fine di poter valutare la possibilità di utilizzo di tali marcatori all'interno degli attuali schemi selettivi.

Sono stati presi in considerazione 96 marcatori SNP scelti sulla base della letteratura scientifica e attraverso la consultazione di database genomici.

Nello specifico, quindi, gli obiettivi di questo lavoro sono stati: 1] lo studio frequenze alleliche e genotipiche nella razza Bruna e 2] lo studio di associazione tra tutti i marcatori SNP polimorfici e alcuni caratteri legati alla composizione del latte.

## **3.- MATERIALI E METODI**

### **3.1- Raccolta dei campioni**

Il Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali ed Ambiente (DAFNAE) dell'Università degli Studi di Padova, in collaborazione con la Federazione Provinciale degli Allevatori della Provincia Autonoma di Trento, ha condotto una prova sperimentale su 1271 campioni di bovine di razza Bruna provenienti da 85 allevamenti situati nella provincia di Trento, con l'obiettivo di studiare l'attitudine casearia del latte. Il sistema di allevamento, l'uso del terreno, le strategie di alimentazione, le pratiche di management e la destinazione del latte degli allevamenti selezionati sono stati descritti da Sturaro et al. (2013). In particolare, sono stati considerati quattro sistemi di allevamento : "tradizionale originale", "tradizionale senza pascoli estivi", "tradizionale con insilato", e "moderno". Gli allevamenti "moderni" erano caratterizzati dalla presenza di strutture costruite di recente, stabulazione libera, sale di mungitura, grandi dimensioni delle mandrie e alti livelli di produzione di latte. La strategia di alimentazione consisteva in razioni unifeed a base di insilati. Le aziende invece "tradizionali originali" erano caratterizzate dalla presenza di strutture meno recenti, di dimensione medio/piccola, stabulazione fissa ed utilizzavano principalmente foraggi aziendali e pascoli estivi. Le 4 categorie possono essere viste come gli step di una evoluzione dal sistema tradizionale a quello intensivo. Gli allevamenti moderni, però, sono in minoranza e questo è spiegato dal fatto che molti allevamenti destinano il latte prodotto a DOP e altri formaggi tipici e tradizionali.

Degli 85 allevamenti considerati nella ricerca, ne è stato campionato uno al giorno, perciò a una certa data corrisponde un singolo allevamento preso in esame. Sono stati presi due campioni di latte per ogni vacca e questi sono stati subito refrigerati a 4 °C senza conservanti. Uno a caso dei due campioni è stato trasportato al laboratorio Qualità della Federazione Allevatori di Trento per le analisi sulla composizione. Inoltre, sono stati raccolti dei campioni di sangue da ciascun animale in provette Vacutainer da 5 ml, contenenti sodio citrato come anticoagulante e sono state conservate a -20 °C. I dati sulle vacche e sugli allevamenti sono stati forniti dalla Federazione Allevatori di Trento, mentre le informazioni sui pedigree sono state ottenute grazie all'Associazione Nazionale Allevatori della Razza Bruna (ANARB). Si è poi tenuto conto solo delle vacche di cui erano disponibili le registrazioni fenotipiche per le caratteristiche analizzate e di cui si conoscevano i dati sulle parentele.

## **3.2- Analisi dei campioni**

I campioni di latte individuale sono stati analizzati per contenuto in grasso, proteine, caseine, lattosio (espressi in %) e urea (MUN, Milk Urea Nitrogen, espressa in mg/100g) usando il MilkoScan FT6000 (Foss, Hillerød, Denmark). Il conteggio delle cellule somatiche (SCC), invece, è stato ottenuto mediante lo strumento Fossomatic FC Counter (Foss) e convertito in somatic cell score (SCS) tramite trasformazione logaritmica, in modo da ottenere una distribuzione Gaussiana.

Per quanto riguarda i campioni di sangue, l'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il Kit DNeasy<sup>®</sup> 96 per sangue e tessuti (Qiagen) utilizzando 100 µl di sangue. Per il controllo di qualità, il DNA estratto è stato analizzato attraverso elettroforesi su gel di agarosio all' 1%, dopo averlo accoppiato con una sonda fluorescente SYBR Safe 108<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tutti i campioni di DNA sono stati quantificati con il sistema QBit (Invitrogen).

## **3.3- Selezione dei geni candidati e degli SNP**

I geni candidati considerati in questo studio sono stati selezionati attraverso due diversi approcci. Il primo è stato un approccio di tipo funzionale: tramite ricerca bibliografica, sono stati selezionati dei geni con funzione nota, coinvolti nella sintesi di proteine, acidi grassi e componenti del sistema immunitario. Il secondo è stato un approccio posizionale: tramite ricerca nei database pubblici, sono stati identificati geni posizionati in QTL noti, quindi regioni cromosomiche associate con qualità e proprietà tecnologiche del latte.

Per quanto riguarda i geni candidati selezionati, sono stati scelti inizialmente 113 SNP, da utilizzare poi in un pannello OPA (Oligo Pool Assay) da 96. Dato che al momento della scelta degli SNP erano disponibili poche informazioni sulla loro frequenza nella razza Bruna, la maggior parte dei marcatori sono stati scelti basandosi sui dati relativi ad altre razze. Prima di eseguire l'analisi di associazione è stato perciò necessario verificare le frequenze alleliche nella popolazione di Bruna, per vedere prima di tutto se gli SNP fossero presenti e polimorfici anche nella razza da noi presa in esame. Ci si aspettava chiaramente qualche differenza causata dalle diverse strategie di selezione nelle diverse razze. È importante sottolineare che individuare SNP polimorfici con lo stesso effetto in razze diverse può essere interessante ai fini selettivi.

I 113 SNP selezionati sono stati inviati ad Illumina per l'attribuzione di un punteggio, utilizzato poi per individuare i 96 più adatti all'analisi, e in particolare sono stati scelti 89 SNP con

punteggio >0,6 (alto tasso di successo) e 7 con punteggio compreso tra 0,5 e 0,6 (moderato tasso di successo). I 96 SNP risultano localizzati in 54 geni e causano mutazioni sinonime (mutazione che non determina variazioni nella sequenza aminoacidica della proteina codificata), non sinonime (mutazione che determina variazioni nella sequenza aminoacidica della proteina codificata) e mutazioni nella regione del promotore (zona in cui ha inizio la trascrizione). I polimorfismi sono stati genotipizzati usando il sistema GoldenGate (Illumina, San Diego, CA), in accordo col protocollo standard. Per vedere quale allele fosse presente è stato usato il software GeneCall (Illumina) con una soglia CG di 0.25.

### **3.4- Analisi statistica**

Le frequenze alleliche, genotipiche e l'equilibrio di Hardy-Weimberg sono stati determinati usando il programma Genepop (versione 1.2; Raymond and Rousset, 1995). Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato un modello animale che teneva conto di alcuni effetti non genetici quali lo stadio di lattazione, l'ordine di parto, l'allevamento e l'effetto genetico additivo dell'animale (circa 8000 animali presenti nel pedigree). Tale modello è stato utilizzato per la stima delle componenti di (co)varianza e ereditabilità dei caratteri oggetto di studio. Lo stesso modello è stato fittato in un secondo momento con l'aggiunta dei marcatori SNPs con lo scopo principale di stimare l'effetto di sostituzione allelica dei marcatori.



## 4.- RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1- Statistiche descrittive

Le statistiche descrittive per i caratteri analizzati sono riportate in Tabella 2. I dati relativi a produzione di latte, contenuto di grasso, proteina e caseina sono risultati tutti in linea con le statistiche AIA e quindi rappresentativi della popolazione italiana di Bruna. In particolare abbiamo riscontrato una media di 24.62 kg/d di latte prodotto, invece per quanto concerne la composizione chimica, la percentuale di grasso contenuto nel latte era 4.21, quella di proteina era 3.69, mentre la caseina rappresentava il 2.88%. Osservando i dati riportati da Cassandro et al. (2008), si può verificare che il latte di Bruna rispetto a quello di Frisona, risulta essere più ricco in grasso, proteina e caseina, ma la quantità prodotta è lievemente inferiore. Riguardo al lattosio, il valore medio registrato (4.85 %) è in linea con le percentuali riportate da Samorè et al. nel 2007 (4.9%) sulla razza Bruna e da Miglior et al. nel 2006 (4.58%) e Stoop et al. nel 2007 (4.63%) sulla razza Frisona.

Il valore medio di MUN ottenuto in questo studio (25.99 mg/100g) è in accordo con i risultati ottenuti da Samorè et al. in uno studio del 2007 sulla razza Bruna, dove sono stati riscontrati valori di MUN di 25.9 mg/dl. Il nostro dato risulta invece leggermente più alto di quello riportato da Butler et al. (1996) sulla razza Frisona, per la quale erano stati rilevati valori di MUN di 22.8 mg/dl per le vacche non gravide, 21.3 mg/dl per vacche più tardi identificate come gravide e valori medi complessivi di 22.3 mg/dl. Valori di urea più bassi, sempre nella razza Frisona, erano stati trovati anche da Yoon et al. nel 2004 (16.68 mg/dl) e da Miglior et al. nel 2006 (11.11 mg/dl); più recentemente ancora, sono stati riportati livelli di MUN di 17.9 mg/dl (Rius et al., 2010) e di 15.5 mg/dl. Le cause di queste differenze possono derivare dal fatto che i livelli di MUN sono influenzati da diversi fattori, quali modalità di campionamento, stagione, razza, fattori nutrizionali, livello produttivo, stadio di lattazione, degradazione ruminale delle proteine inefficiente, sintesi proteica della ghiandola mammaria meno efficiente, cambiamenti nel processo di conversione. I dati riscontrati in letteratura riguardano principalmente la razza Frisona e anche il tipo di alimentazione andrebbe tenuto in considerazione; perciò una comparazione precisa è impossibile. In questo studio vengono riportati valori di MUN espressi in mg/100g, che può essere considerato approssimativamente simile all'unità di misura in mg/dl. Le cellule somatiche presentavano un punteggio di 2.92 U nella razza Bruna, in linea con quello

di 2.41 U riportato da Cecchinato et al. (2011), mentre valori più elevati sono stati riscontrati nella Frisona da Cassandro et al. nel 2008 (3.08 U) e da Cecchinato et al. nel 2011 (3.07 U). Poichè la Frisona è una razza che è stata altamente selezionata per la produzione di latte, si trova ad essere più soggetta a mastiti ed è per questo che presenta un punteggio SCS maggiore.

## 4.2- Stima dell'ereditabilità

In tabella 3 sono riportate le stime di ereditabilità (senza considerare l'effetto degli SNPs) dei caratteri presi in esame. L'ereditabilità relativa alla quantità di latte prodotta (18.2%) è lievemente superiore rispetto alle stime riportate da Samorè et al. (2007) e Ikonen et al. (2004), 10% e 16% rispettivamente. Le stime riguardanti la composizione del latte (proteina = 27.9%, grasso = 12.2%, caseina = 28.2%) sono risultate in linea con quelle ottenute da Cecchinato et al. nel 2011 nelle vacche di razza Bruna (proteina = 29%, grasso = 10.8%, caseina = 27.5%) e leggermente inferiori rispetto a quelle riportate da Tyrisevä et al. nel 2004 (proteina = 32%, grasso = 16%) in vacche Finnish Ayrshire e Frisone. Anche Ikonen et al. (2004) hanno stimato ereditabilità del 29% per la proteina in una popolazione di Finnish Ayrshire, ma ereditabilità più elevate per il grasso (18%) e per la caseina (35%). Un risultato simile ad Ikonen et al. (2004) per la caseina (31%) è stato ottenuto da Samorè et al. (2007) nella razza Bruna. In Samorè et al. (2007) sono state inoltre riportate stime simili a quelle di questo studio per quanto riguarda proteina (32%) e grasso (14%).

Per le cellule somatiche l'ereditabilità stimata (9.6%) è di poco superiore a quella di Samorè et al. (2007) e Ikonen et al. (2004), 6 e 7% rispettivamente, ma molto simile al 9% ottenuto da Ikonen et al. nel 1999.

I valori di ereditabilità per la produzione di latte, il contenuto di proteina e caseina e SCS risultano tutti all'interno della media  $\pm$  d.s. delle stime riportate da Bittante et al. (2012).

L'ereditabilità stimata per il contenuto in lattosio (17%) è molto più bassa del valore di circa 50% rilevato da Stoop et al. (2007), Miglior et al. (2007) e Loker et al. (2012) in diverse razze e con diversi modelli statistici.

In questo studio, la stima dell'ereditabilità per MUN è pari a 35,6% e la letteratura (Wood et al., 2003; Mitchell et al., 2005; Miglior et al., 2007) riporta che questo valore può variare tra 14% e 44%, in base allo strumento utilizzato e all'ordine di parto. Per esempio Mitchell et al. (2005) hanno stimato un'ereditabilità del 22% mediante spettroscopia a infrarossi (IR) per vacche che hanno avuto un solo parto, ma ottennero una stima del 14% attraverso analisi chimica; Wood et

al. (2003) hanno stimato un'ereditabilità alta (44%) per MUN determinato con IR usando analisi di regressione casuale; e Miglior et al. (2007) hanno riportato valori che variano da 38.4% a 41.4% in base all'ordine di parto.

Le incongruenze tra studi possono riflettere vari fattori, inclusa la razza, le procedure di analisi, i modelli e i metodi di stima utilizzati.

### 4.3- Frequenze alleliche

Dei 96 SNP selezionati, ne sono stati genotipizzati con successo 76, localizzati in 44 geni. I restanti 20 sono risultati invece di difficile analisi. Dei 76 SNP genotipizzati, 25 sono monomorfici nella popolazione di Bruna presa in considerazione in questo studio (Tabella 4), anche se sono polimorfici nella Frisona e/o in altre razze, confermando la necessità di testare marcatori molecolari in razze diverse, prima di usarli nella MAS. Alcuni alleli che sono associati con differenti caratteri di produzione e composizione del latte nelle altre razze, non sono presenti nella popolazione di Bruna considerata. Per esempio: l'allele A del gene CSN2 rs109299401 che ha frequenza 0% (Minor Allele Frequency, MAF A=0%), l'allele T del gene PPARGC1A rs109579682, presente invece con frequenza 0,25 nella Frisona olandese (Schennink et al., 2009), e l'allele A del gene SPP1 rs133929040, che nella razza Frisona ha frequenza 0.57% ed è associato a vari caratteri del latte (Cohen-Zinder et al., 2005). Altri, che sono presenti in altre razze, risultano fissati nella nostra popolazione, come la variante A del gene CSN2 rs43703012 (MAF A = 100%), l'allele G di GHR rs109231659, l'allele T di FADS2 e l'allele A di ABCG2 rs43702337, questa variante del gene ABCG2 ha invece frequenza del 54.4% nella Frisona, secondo quanto riportato da Cohen-Zinder et al. (2005), mentre risulta monomorfico nei tori Frisoni olandesi (Schennink et al., 2009).

Per quanto riguarda gli SNPs polimorfici, ACACA rs110562092 e STAT5A rs137182814 hanno mostrato frequenze alleliche perfettamente bilanciate (gene ACACA: A=50%, G=50%; gene STAT5A: C=50%, G=50%), mentre ABCG2 rs41577868, PLCB1 rs41624761, LxR-alpha rs134390757, FGF2 rs110937773, GRLF1 rs41572288 e SCD-1 rs136334180 hanno mostrato frequenze quasi perfettamente bilanciate.

In termini di MAF, 23 SNPs hanno frequenze comprese tra 0.5 e 0.3 e 28 tra 0.28 e 0.05, e di questi ultimi solo 7 hanno frequenze < a 0,10. Quindi, tutti gli SNP polimorfici genotipizzati con successo sono stati sottoposti a studi di associazione.

Per molti SNPs, come quelli nei geni LPIN1, XDH, PLCB1, LIPE, CCL3, PLIN, AGPAT1,

PLCE1 e AGPAT6, le frequenze alleliche precedentemente non erano conosciute nella razza Bruna. Per altri, l'allele minore nella nostra popolazione è lo stesso descritto in un'altra popolazione, ma le frequenze alleliche sono diverse. Questo è il caso di STAT1 rs43705173, dove l'allele T ha una frequenza di 0.37 nella popolazione di Bruna studiata, comparata con 0.33 nella Frisona (Cobanoglu et al., 2006); LEP rs29004508, dove l'allele T ha frequenza di 0.17 e 0.25, rispettivamente, nella popolazione di Bruna e nella razza Frisona olandese (Liefers et al., 2004); CARD15 rs43710288, dove l'allele T ha frequenza di 0.38 e 0.46, rispettivamente, nella razza Bruna e nella razza Frisona (Pant et al., 2007); CCR2 rs41257559, dove l'allele T ha frequenza di 0.31 nella razza Bruna e 0.46 nella razza Frisona canadese (Leyva-Baca et al., 2007) e SCD-1 rs41255693, con frequenza dell'allele T di 0.15% nella Bruna, mentre di 0.06% nella Jersey e 0.35% nella Valdostana (Moioli et al., 2007).

CCL2 rs41255714 ha lo stesso allele minore riportato da Leyva-Baca et al. (2007) nella razza Frisona canadese (allele G, con frequenza di 0.35 e 0.44, rispettivamente) e lo stesso vale per il gene LEP rs29004508, il quale presenta lo stesso MAF sia nella popolazione di Bruna considerata (T = 0,17) che nelle vacche di razza Bruna e Frisona studiate da Buchanan et al. (2003), anche se queste ultime presentavano una frequenza più alta dell'allele T (0.46 e 0.45 rispettivamente). Anche LEPR rs43349286, presenta lo stesso allele minore, T, con frequenza 0,26 nella Bruna e 0.07 nella Frisona inglese (Banos et al., 2008).

Per FABP4 rs110757796, l'allele minore è A (0.16), mentre Cho et al. (2008) hanno riportato G (0.375) come allele minore. In quest'ultimo caso, la differenza può essere dovuta a diverse strategie selettive tra la razza Bruna da latte e la Native Korean da carne. Il gene OLR1 presenta frequenza 0,10 per l'allele C della popolazione di Bruna, mentre nella Frisona olandese l'allele C ha frequenza 0.71 (Schennink et al., 2009), CCL2 rs41255713 presenta T (0.23) come allele minore nella popolazione di Bruna e C (0.32) nella Frisona canadese (Leyva-Baca et al., 2007). Invece Kulig et al. (2010) avevano rilevato genotipi diversi nelle vacche di razza Jersey (cioè CC e CG) da quelli della Bruna (AC e AG) per FABP4, come anche Pannier et al. (2010), hanno riscontrato genotipi diversi (CC, GG, GC) per questo gene nelle vacche di razza Limousine, Charolaise e Frisona. Infine nel gene GHR rs109136815, uno SNP nell'esone 10 che determina una mutazione silente nell'aminoacido 545 e che era stato precedentemente associato con la produzione di latte (Blott et al., 2003), è caratterizzato da una frequenza dell'allele minore (C) due volte più alta nella Bruna rispetto al valore trovato in altre 5 razze studiate da Waters et al. (2011).

## 4.4- Analisi di associazione

La stima dell'effetto di sostituzione allelica e la proporzione di variabilità genetica spiegata da ogni SNP relativamente ai caratteri di produzione, composizione chimica e contenuto in cellule somatiche del latte sono riportate in Tabella 5. Le analisi statistiche, eseguite fittando il modello ad ogni SNP (il modello è stato fittato quindi 51 volte per ogni carattere considerato), hanno evidenziato associazione con almeno un carattere per 14 dei 51 SNPs polimorfici. Di questi, 8 risultano associati a un solo carattere (PRLR rs109428015, CCL2 rs41255714, CSN3 rs43703015, SCD-1 rs136334180, PI rs41257077, ADRB2 rs132839139, ACACA rs110562092 e STAT1 rs43706906), mentre i restanti 6 a più di un carattere (GRLF1 rs41572288, GH rs41923484, LTF rs43765461, SCD-1 rs41255693, CARD15 rs43710288 e LPIN1 rs137457402), come mostrato in figura 9.

Considerando la produzione di latte, sia PRLR rs109428015 che CCL2 rs41255714 -gene che codifica per proteine coinvolte nei processi infiammatori (Leyva-Baca et al., 2007)- sono associati solo a questo carattere. Stando a quanto riportato da Viitala et al. (2006), nella razza Finnish Ayrshire PRLR risulta associato anche alla produzione di proteina e grasso, oltre che alla quantità di latte prodotta. Nel gene PRLR rs109428015 un allele T, piuttosto che C, porta a un aumento di 0.786 kg di latte prodotto e questo gene spiega il 5.46% della variabilità genetica totale. Infatti, l'ormone prolattina riveste notevole rilievo nel mantenimento della lattazione e la sua soppressione può causare una importante riduzione nella produzione di latte (Lacasse et al., 2012). Il gene CCL2 rs41255714 è associato positivamente con la produzione di latte, la variante A del gene porta un aumento di 0.65 kg e questo gene spiega il 4.68% della varianza genotipica totale. PRLR è già stato associato con la produzione di latte nella razza Frisona (Zhang et al., 2008) e nella Finnish Ayrshire, mentre CCL2 nella razza Frisona Canadese (Leyva-Baca et al., 2007). Invece, il gene GRLF1 rs41572288 è associato sia con la produzione di latte (l'allele T a questo locus aumenta la produzione di latte 0.56 kg) che con la % di lattosio. In questo gene, due SNPs sono stati precedentemente associati con l'ingestione di alimento e il tasso di conversione dell'alimento, il che sta ad indicare che esso è coinvolto nella produzione di energia nella vacca da latte e questo potenzialmente spiega la sua relazione con la % di lattosio. Comunque, sono necessarie ricerche aggiuntive per esaminare il ruolo di questo gene nella produzione di latte.

La percentuale di grasso risulta essere altamente influenzata dal gene SCD-1: l'allele T di SCD-1 rs41255693 causa un miglioramento dello 0.194% rispetto all'allele C, con  $V_a = 18.82\%$ , il quale modifica anche indice caseinico e MUN; l'allele A di SCD-1 rs 136334180 aumenta di 0.069 la

% di grasso rispetto alla variante G ed ha  $V_a = 4.65\%$ . Esso è già stato associato precedentemente al contenuto di grasso, proteina e/o caseina nelle razze Belgian Blue Red e White, Jersey, Montbeliarde, Normande (Soyeurt et al., 2008), Frisona (Macciotta et al., 2008) e Bruna (Soyeurt et al., 2008; Cecchinato et al., 2012).

I geni CARD15 rs43710288 e LPIN1 rs137457402, invece, risultano influenzare le percentuali di proteina e caseina. Nel gene CARD15, un allele T porta un miglioramento dello 0.032% per la proteina ( $V_a=2.19\%$ ) e dello 0.028% per la caseina ( $V_a=9.24\%$ ), rispetto all'allele A. CARD15 rs43710288 (A > T) è associato positivamente con l'EBV per SCS, profondità della mammella, produzione di latte e di proteina, mentre lo SNP di CARD15 con A>C è associato con la produzione di latte, grasso e proteina nei tori Canadian Holstein (Pant et al., 2007). Diversamente dalla Bruna, in uno studio di Beecher et al. (2010), CARD15 (A>T) nella Frisona è associato sfavorevolmente con produzione di latte, grasso e proteina.

Gli autori dello studio hanno concluso che questi due SNP, insieme ad altri geni polimorfici, possono essere geneticamente selezionati per la resistenza alla mastite e la produzione, e ritengono che CARD15 sia un candidato per ulteriori studi funzionali.

L'allele T, rispetto a G, del gene LPIN1 porta un aumento della percentuale di proteina dello 0.027 e di caseina dello 0.021 e questo gene spiega quasi il 2% della varianza genotipica totale di entrambe le caratteristiche. Studi recenti hanno mostrato che le proteine lipine giocano un ruolo cruciale durante lo sviluppo del tessuto adiposo e l'accumulo del triacyl-glicerolo (Phan and Reue, 2005). Inoltre, è stato dimostrato che i livelli di espressione del gene LPIN1 influenzano la lattazione. Finck et al. (2006) hanno osservato che LPIN1 è essenziale per l'attivazione di PPAR $\alpha$ , suggerendo che LPIN1 potrebbe essere coinvolto nella regolazione della trascrizione di altri geni coinvolti nella sintesi del grasso del latte. Comunque ulteriori ricerche saranno necessarie per chiarire il suo ruolo nella produzione di latte.

La percentuale di lattosio è influenzata da GRLF1 (la stima dell'effetto di sostituzione allelica è di +0.019% per l'allele T rispetto a C; con  $V_a=6.01\%$ ) e da CSN3 rs43703015, dove T vs G porta a un peggioramento di 0.029%, con quasi il 10% di varianza fenotipica totale spiegata da questo gene. E' interessante notare che questa è l'unica associazione che coinvolge le varianti della caseina, confermando il loro modesto effetto sulla composizione del latte (Penasa et al., 2010). GH rs41923484 e LTF rs43765461, influenzano entrambi la % di lattosio e l'indice caseinico. In particolare, l'allele C allele del gene GH rs41923484 riduce sia la percentuale di lattosio (dello 0.026, con  $V_a = 8.26\%$ ) sia l'indice caseinico (dello 0.003, con  $V_a = 0.08\%$ ), anche l'allele T allele del gene LTF rs43765461 è associato con lattosio e indice caseinico, ma aumentandoli, con un forte effetto sulla % di lattosio (+0.077), spiegando una proporzione molto alta di variabilità

genotipica totale (35.57%). L'effetto di ogni SNP sull'indice caseinico è molto limitato, anche considerando il gene SCD-1 rs41255693 (T vs C  $=+0.005$ ;  $V_a = 0.16\%$ ). Il gene GH è stato associato anche a produzione di latte, grasso e proteina nelle bovine di razza Frisona, come riportato da Yao et al. (1996).

Un'altra interessante associazione è stata trovata tra i geni ADRB2 rs132839139, PI rs41257077 e il contenuto di urea. Per ADRB2 rs132839139, l'effetto stimato A vs G è  $-2.262$  mg/100 g ( $V_a = 6.99\%$ ). Per PI rs41257077, il corrispondente effetto stimato per l'allele A è  $-0.676$  mg/100 g ( $V_a = 2.33\%$ ). Anche il gene SCD-1 è stato associato a MUN (allele T  $=+1,908$ mg/100g) con più del 13% di varianza fenotipica totale spiegata da questo gene. Poiché l'urea nel latte viene sintetizzata come conseguenza di uno sbilanciamento tra l'azoto della dieta e l'energia presente nel rumine, gli autori dello studio hanno ipotizzato che l'effetto del gene ADRB2 possa essere relazionata nel coinvolgimento dei recettori  $\beta$ -adrenergici nella lipolisi e nella regolazione della crescita muscolare a scapito del grasso di deposizione. Sebbene si sia dimostrato che la stimolazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici nella ghiandola mammaria influenzi le caratteristiche del latte, inclusa la produzione, ci sono poche informazioni sulle bovine. Si è visto che, le vacche con grandi meriti genetici in termini di produzione di latte, aumentano la lipolisi del tessuto adiposo, la stimolazione  $\beta$ -adrenergica e l'attività dell'ormone lipasi sensibile (LIPE), mentre diminuiscono la lipogenesi (McNamara, 1994, 2004; McNamara and Hillers, 1989; Vernon, 2003), in comparazione ad animali con meriti genetici nella media (McNamara and Hillers, 1989; Smith and McNamara, 1990). Così la relazione dei geni ADRB2 e PI con lo sbilanciamento energetico e le caratteristiche del latte, vanno analizzate ulteriormente. Il gene PI è localizzato in un QTL associato con la produzione di latte e il benessere, il suo ruolo principale è quello di proteggere i tessuti contro la digestione proteolica causata dall'elastasi neutrofila (Khatib et al., 2005). Nello studio sulla popolazione di Bruna, sono state trovate associazioni solo per PI con MUN, anche se nella Frisona questo gene era stato associato a produzione di latte, grasso, proteina e SCS (Khatib et al., 2005). Nella ghiandola mammaria umana PI, può influenzare la sopravvivenza di proteina del latte, quali lattoferrina e lisozima (Chowanadisai e Lonnerdal, 2002). Così, uno SNP che influenza sfavorevolmente la protezione di queste proteine, può aumentare MUN.

Infine, due geni hanno mostrato significanti effetti su SCS. L'allele A di ACACA rs110562092 è stato associato con SCS ( $-0.191$ ) e presenta una  $V_a$  rilevante: 7.18%. Anche STAT1 rs43706906 spiega una  $V_a$  notevole (9.12%) per SCS nella popolazione di Bruna considerata (l'allele C aumenta questa caratteristica di 0.218 U). STAT1 è un trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione, che è attivato da numerose citochine, fattori di crescita e ormoni, ed è coinvolto

nello sviluppo e nella differenziazione della ghiandola mammaria. Ragione per cui ci si aspettava un'associazione con SCS. Lo SNP di STAT1 rs43705173, il quale non è stato associato con alcuna caratteristica del latte nella popolazione di Bruna considerata, era invece già stato correlato precedentemente con SCS ed altre caratteristiche del latte (produzione di latte, proteina e grasso) nella razza Frisona da Cobanoglu et al. (2006) e nella Frisona cinese da Chu et al. (2009). In particolare, l'espressione di STAT1 è strettamente correlata con l'accumulo lipidi e ACACA codifica un'enzima chiave nella regolazione della sintesi di acidi grassi. Peraltro è stato provato da Matsumoto et al. (2012) che il gene ACACA ha effetto sulla composizione acidica del latte di Frisona. Gli acidi grassi sono essenziali per la formazione delle membrane cellulari e sono utilizzati per sintetizzare grasso per lo stoccaggio nel tessuto adiposo o per la secrezione nel latte da parte della ghiandola mammaria. Così, i nostri risultati possono suggerire una complessa relazione tra STAT1 e ACACA.



## 5.- CONCLUSIONI

I polimorfismi in 51 SNP sono stati testati per le loro associazioni con caratteri di produzione, composizione chimica e contenuto in cellule somatiche nel latte di bovine di razza Bruna. SNP in 14 geni (ACACA, ADRB2, CARD15, CCL2, CSN3, GH, GRLF1, LPIN1, LTF, PI, PRLR, SCD-1, SCD-1 e STAT1) sono risultati associati con almeno uno dei caratteri su menzionati. In particolare, effetti notevoli sono stati trovati per: LTF rs43765461 sulla % di lattosio, questo gene spiega il 35.57% della varianza genetica totale per questo carattere, la variante T favorisce un aumento della % di lattosio rispetto alla C (+0.077) e in aggiunta questo gene ha anche un leggero effetto sull'indice caseinico; SCD-1 rs41255693 sulla % di grasso (il 18.82% della varianza genetica totale è spiegata da SCD-1, con l'allele T positivamente associato alla % di grasso) con il 13.35% di varianza genetica totale spiegata per MUN (allele T = +1.908), e un leggero effetto sull'indice caseinico; CSN3 rs43703015 con praticamente il 10% di Va spiegata dallo SNP (l'allele T porta una diminuzione della % di lattosio di 0.029 e il gene è associato negativamente anche con l'indice caseinico); CARD15 rs43710288 è responsabile del 9.24% e del 2.19% della varianza genetica delle percentuali di proteina e caseina, rispettivamente (con allele T positivamente associato); STAT1 rs43706906 controlla il 9.12% della varianza genetica totale e un allele C rispetto a un allele G, aumenta il punteggio delle cellule somatiche di 0.218 U; invece l'allele A di ACACA rs110562092 diminuisce SCS e controlla una porzione inferiore della varianza genetica totale, cioè il 7.18%.

Il gene GH rs41923484 ha effetti meno rilevanti sulla % di lattosio e decisamente bassi sull'indice caseinico, questo perchè probabilmente ci sono altri geni con influenza maggiore su questi caratteri, infatti l'ormone GH, essendo l'ormone della crescita, ha altri ruoli principali.

Due geni con gli effetti più bassi sono LPIN1 rs137457402 e PI rs41257077: il primo con una Va di 1.62% per la proteina e 1.66% per la caseina (allele T positivamente associato a entrambe), il secondo con Va = 2.33% per MUN (allele A causa una riduzione di 0.676 mg/100 gr).

Queste informazioni possono essere utili nella selezione assistita da marcatori, con lo scopo di aumentare l'accuratezza della selezione, specialmente per la qualità e per aumentare il miglioramento genetico.

## 6.- BIBLIOGRAFIA

- AIA, 1981. Regolamento per lo svolgimento dei controlli della produzione del latte nella specie bovina (D.M. 24-5-1967 modificato con D.M. 28-9-1981). Cap. 1, art. 1.
- ANARB, 2006. Disciplinari del libro genealogico dei bovini di razza bruna. Cap. 1: 1-2.
- Aleandri R., Nardone A., Russo V. 1986. Milk yield for the cheesemaking process: Quantitative traits, loci, and selection strategies. 3rd World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. XII (64). Univ. Nebraska, Lincoln.
- Aleandri R., Buttazzoni L. G., Schneider J. C., Caroli A., Davoli R.. 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-production ability. *Journal of Dairy Science*, 73: 241– 255.
- Barcaccia G. e Falcinelli M., 2006. *Genetica e genomica*, Liguori Editore. Vol III, 17: 818.
- Barlett P. C., Miller G. Y., Anderson C. R., Kirk J. H., 1990. Milk production and somatic cell count in Michigan Dairy Herds. *Journal of Dairy Science*, 73: 2794- 2800.
- Bagnato A., Maltecca C., 2003. Produttività e riproduzione nei bovini da latte: aspetti genetici. Ipo fertilità della bovina da latte p.20.
- Bagnato A., Schiavini F., Dolezal M., Dubini S., Rossoni A., Maltecca C., Santus E., Medugorac I., Solkner J., Fontanesi L., Friedman A., Lipkin E., Soller M., 2005. The BovMAS Consortium: identification of QTL for milk yield and milk protein percent on chromosome 14 in the Brown Swiss breed. *Italian Journal of Animal Science*, 4: 13-15.
- Bailoni L., Battaglini L. M., Gasperi F., Mantovani R., Biasioli F., Mimosi A., 2005. Qualità del latte e del formaggio d'alpe, caratteristiche sensoriali, tracciabilità e attese del consumatore. *Quaderni SOZOOALP*, 2, 52-88.
- Banos G., Woolliams J. A., Woodward B. W., Forbes A. B., Coffey M. P., 2008. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. *Journal of dairy science*, 91.8: 3190-3200.
- Bauman D. E., Mather I. H., Wall R. J., Lock A. L., 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, 89:1235–1243.
- Beecher C., Daly M., Childs S., Berry D. P., Magee D. A., McCarthy T. V., Giblin L., 2010. Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. *BMC genetics*, 11.1: 99.
- Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M., 2003. *Tecniche di produzione animale*, Liviana

Editrice. 1: 13-17.

- Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M., 2005. Fondamenti di zootecnica, Petrini Editore. 8.1 : 36-39; 9.1: 55-59; 10.4.2: 97.
- Bittante G., Penasa M., Cecchinato A., 2012. Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 95: 6843-6870.
- Blasi M., Lanza A., Genzini E., Sassano A. Nuovo protocollo basato sull'analisi degli SNPs applicato alla tracciabilità della carne bovina. 4thWorld Italian Beef Cattle Congress, Italy, p. 267.
- Blott S., Kim J.J., Moisisio S., Schmidt-Küntzel A., Cornet A., Berzi P., Cambiaso N., Ford C., Grisart B., Johnson D., Karim L., Simon P., Snell R., Spelman R., Wong J., Vilkki J., Georges M., Farnir F., Coppeters W., 2003. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics*, 163: 253–266.
- Bovenhuis H. and Schrooten C., 2002. Quantitative Trait Loci for Milk Production Traits in Dairy Cattle. *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France, 31: 27-34
- Buchanan F. C., Van Kessel A. G., Waldner C., Christensen D. A., Laarveld B., Schmutz S. M., 2003. An Association Between a Leptin Single Nucleotide Polymorphism and Milk and Protein Yield. *Journal of Dairy Science*, 86.10: 3164-3166.
- Butler W.R., Calaman J.J. and Beam S.W., 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *Journal of Animal Science*, 74: 858–865.
- Cassandro M., Comin A., Ojala M., Zotto R. D., De Marchi M., Gallo L., Carnier P., Bittante G., 2008. Genetic parameters of milk coagulation properties and their relationships with milk yield and quality traits in Italian Holstein cows. *Journal of dairy science*, 91.1: 371-376.
- Castagnetti G.B., Cuoghi F., Gambini G., 1995. Contenuto e variabilità di urea nel latte massale e sua relazione con alcuni parametri di significato tecnologico caseario. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, XXVII: 107-108.
- Cecchinato A., Dal Zotto R., De Marchi M., Penasa M., Malacarne M., Summer A., Carnier P., Bittante G., 2008. Come migliorare l'attitudine casearia. *L'informatore agrario*, n.4, p 84.
- Cecchinato A., Dal Zotto R., De Marchi M., Penasa M., Malacarne M., Summer A., Carnier P., Bittante G., 2008. Come migliorare l'attitudine casearia. *L'informatore agrario*, n.4, p 86.

- Cecchinato A., Penasa M., De Marchi M., Gallo L., Bittante G., Carnier P., 2011. Genetic parameters of coagulation properties, milk yield, quality, and acidity estimated using coagulating and noncoagulating milk information in Brown Swiss and Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 94: 4205–4213.
- Cecchinato A., Ribeca C., Maurmayr A., Penasa M., De Marchi M., Macciotta N. P. P., Mele M., Secchiari P., Pagnacco G., Bittante G., 2012. Effects of  $\beta$ -lactoglobulin, stearoyl-coenzyme A desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein gene allelic variants on milk production, composition, acidity, and coagulation properties of Brown Swiss cows. *Journal of Dairy Science*, 95: 450–454.
- Cho S., Park T.S., Yoon D.H., Cheong, H.S., Namgoong S., Park B.L., Lee H.W., Han C.S., Kim E.M., Cheong C., Kim H., Shin, H. D., 2008. Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. *BMB Rep*, 41.1: 29-34.
- Chowanadisai W., Lönnnerdal B., 2002.  $\alpha$ 1-Antitrypsin and antichymotrypsin in human milk: Origin, concentrations, and stability. *The American journal of clinical nutrition*, 76.4: 828-833.
- Chu M., Zan, L. S., 2009. Association between Polymorphism of STAT1 Gene and Milk Production Traits in Chinese Holstein Cattle. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 3: 004.
- Cobanoglu O., Zaitoun I., Chang Y.M., Shook G.E., Khatib H., 2006. Effects of the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gene on milk production traits in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89: 4433–4437.
- Cohen-Zinder M., Seroussi E., Larkin D. M., Looor J. J., Everts-van der Wind A., Lee J. H., Drackley J.K., Band M. R., Hernandez A. G., Ron, M. (2005). Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Research*, 15.7: 936-944.
- Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J. B., Pang E. C. K., 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142: 169-170.
- Daetwyler H. D., Schenkel F. S., Sargolzaei M., Robinson A. B., 2008. A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. *Journal of Dairy Science*, 91: 3225.

- Dekkers J. C., 2004. Commercial application of marker-and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *Journal of Animal Science*, 82: 313-328.
- Dwight S. S., Eppig J. T., Davis A. P., Dolinski K., Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Cherry J. M., Sherlock G., Rubin J. M. et al., 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25: 25-29.
- Finck B.N., Gropler M.C., Chen Z., Leone T.C., Croce M.A., Harris T.E. Jr, Lawrence J.C., Kelly D.P., 2006. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metabolism*, 4: 199–210.
- Gautier M., Barcelona R. R., Fritz S., Grohs C., Druet T., Boichard D., Eggen A., Meuwissen T. H. E., 2006. Fine mapping and physical characterization of two linked quantitative trait loci affecting milk fat yield on BTA26. *Genetics*, 172: 425–436.
- Ghiroldi S., Nicoletti C., Santus E., Rossoni A., Bagnato A., 2005. ITE: the new selection index for the Italian Brown Swiss. *Proceeding of the 2005 Interbull Meeting*. Uppsala, Sweden. June 2-4. *Bollettino n°*. 33: 222-225.
- Goddard M. E., Hayes B. J., 2007. Genomic selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124: 323-333.
- Grisart B., Coppieters W., Farnir F., Karim L., Ford C., Berzi P., Snell, R., 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome research*, 12, 222-231.
- Gudding R., 1982. Increased fatty acid concentrations in mastitic milk. *Journal of Food Protection*, 45: 1143- 1146.
- Hayes B. J., Goddard M. E., 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157: 1819-1829.
- Haenlein G. T. W., Schultz L. H., Zikakis J. P., 1973. Comparison of proteins in milk with varying leukocyte contents. *Journal of Dairy Science*, 56: 1017-1023.
- Harmon R. J., 1994. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *Journal of dairy Science*, 77: 2103-2104.
- Hocquette J. F. and Gigli S., 2005. The challenge of quality. Indicators of milk and beef quality. *EAAP Publication*, 112: 13-22.
- Hristova V. K., Ahmad M. A., Tomovska J., Popov B.B., 2014. Study of coagulation properties of Holstein cow's milk depending on the level of milk urea nitrogen in Macedonia dairy farms. *International Journal of Enhanced Research in Science Technology & Engineering*, Vol. 3 Issue 3: 522-529.

- Ikonen T., Ojala M., Ruottinen O., 1999. Association between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *Journal of dairy Science*, 82: 1026–1033.
- Jones G. M., 1986. Reducing somatic cell counts: Meeting the 1986 challenge – Impact on producer and processor. *Journal of dairy Science*, 69: 1699-1707.
- Kashi Y., Hallerman E., Soller M., 1990. Marker assisted selection of candidate young bulls for progeny testing programmes. *Animal Production*, 51: 63-74.
- Khatib H, Heifetz E and Dekkers JC 2005. Association of the protease inhibitor gene with production traits in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 88: 1208–1213.
- Khatib H., Monson R. L., Schutzkus V., Kohl D. M., Rosa G. J. M., Rutledge J. J., 2008. Mutations in the STAT5A gene are associated with embryonic survival and milk composition in cattle. 91: 784–793.
- Kukovics S., Molnar A., Abraham M., Schuszter T., 1996. Phenotypic correlation between somatic cell count and milk components. *Allata. Takarm.*, 45: 205-215.
- Ikonen T., Morri S., Tyrisevä A.M., Ruottinen O., Ojala M., 2004. Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and pH of milk. *Journal of Dairy Science*, 87: 458–467.
- Laben R. C., 1963. Factor responsible for variation in milk composition. *Journal of Dairy Science*, 46: 1293-1296.
- Lande R., Thompson R., 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124: 743-744.
- Lacasse P., Lollivier V., Dessauge F., Bruckmaier R.M., Ollier S., Boutinaud M., (2012). New developments on the galactoproteic role of prolactin in dairy ruminants, *Dom. Anim. Endo.*, 43: 154 – 160;
- Leyva-Baca I., Schenkel F., Sharma B.S., Jansen G.B. and Karrow N.A., 2007. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine CCL2, IL8, CCR2 and IL8RA genes and their association with health and production in Canadian Holsteins. *Animal Genetics*, 38: 198–202.
- Liefers S.C., Veerkamp R.F., te Pas M.F.W., Delavaud C., Chilliard Y., Platje M., van der Lende T., 2004. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. *Animal Genetics*, 35: 138–141.
- Loker S., Bastin C., Miglior F., Sewalem A., Schaeffer L. R., Jamrozik J., Ali A., Osborne V., 2012. Genetic and environmental relationships between body condition score and milk production traits in Canadian Holsteins. *Journal of dairy science*, 95.1: 410-419.

- Macciotta N. P. P., Mele M., Conte G., Serra A., Cassandro M., Dal Zotto R., Cappio Borlino A., Pagnacco G., Secchiari P., 2008. Association between a polymorphism at the stearoyl CoA desaturase locus and milk production traits in Italian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 91: 3184-3189.
- Mariani P., Serventi P., Fossa E., 1997. Contenuto di caseina, varianti genetiche ed attitudine tecnologico casearia del latte delle vacche di razza Bruna nella produzione del formaggio grana. Allegato a *La Razza Bruna Italiana*, 2 : 8-9.
- Mariani P., Summer A., Formaggioni P., Malacarne M., 2002. La qualita casearia del latte di differenti razze bovine. *Riv. La razza Bruna*, 1: 7-8.
- Matsumoto H., Sasaki K., Bessho T., Kobayashi E., Abe T., Sasazaki S., Oyama K., Mannen H., 2012. The SNPs in the ACACA gene are effective on fatty acid composition in holstein milk. *Molecular biology reports*, 39.9: 8637-8644.
- McMahon D. J., Richardson, G. H., Brown R. J., 1984. Enzymic milk coagulation: role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *Journal of Dairy Science*, 67: 1185-1193.
- McNamara, J. P., 1989. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. Relationships of lipid synthesis and lipolysis with energy intake and utilization. *Journal of dairy science*, 72.2: 407-418.
- McNamara, J. P., 1994. Lipid metabolism in adipose tissue during lactation: a model of a metabolic control system. *The Journal of nutrition*, 124.8: 1383S-1391S.
- McNamara, J. P., 2004. Research, improvement and application of mechanistic, biochemical, dynamic models of metabolism in lactating dairy cattle. *Animal feed science and technology*, 112.1, 155-176.
- Meuwissen T. H., Goddard M. E., 2004. Mapping multiple QTL using linkage disequilibrium and linkage analysis information and multitrait data. *Genet. Sel. Evol.* 36:261–279.
- Miglior F., Canavesi F., Samorè A., Olzi E., 1998. Il miglioramento genetico nella Frisone italiana. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, XXX: 152-153.
- Miglior F., Sewalem A., Jamrozik J., Lefebvre D.M., Moore R.K., 2006. Analysis of milk urea nitrogen and lactose and their effect on longevity in Canadian dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89: 4886–4894.
- Miglior F, Sewalem A, Jamrozik J, Bohmanova J, Lefebvre DM and Moore RK, 2007. Genetic analysis of milk urea nitrogen and lactose and their relationship with other production traits in Canadian Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 90: 2468–2479.
- Mitchell R.G., Rogers G.W., Dechow C.D., Vallimont J.E., Cooper J.B., 2005. Milk urea

- nitrogen concentration: heritability and genetic correlations with reproductive performance and disease. *Journal of Dairy Science*, 88: 4434–4440.
- Moioli B., Contarini G., Avalli A., Catillo G., Orru L., De Matteis G., Masoero G., Napolitano F. (2007). Short Communication: Effect of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Polymorphism on Fatty Acid Composition of Milk. *Journal of dairy science*, 90.7, 3553-3558.
- National Mastitis Council, 1996. *Current Concepts of Bovine Mastitis*. 4th Ed., National Mastitis Council Inc., Madison, WI, USA.
- Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E., Monardes H. G., 1984. Associations of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat and protein production by dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 67: 835–840.
- Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., Moxley J. E., Monardes H. G., 1986. Relationships between milk protein polymorphism and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 69: 22–26.
- Nicoletti C., 2011. Fattori genetici nella scelta di nuovi parametri qualitativi del latte con particolare riguardo alla sua attitudine tecnologico casearia. Dottorato di ricerca in produzioni animali, biotecnologie veterinarie, qualità e sicurezza degli alimenti, 3.1.3.4: 24.
- Pagnacco G., 1996. *Genetica applicata alle produzioni animali*, Città studi. 9: 75.
- Pannier L., Mullen A. M., Hamill R. M., Stapleton P. C., Sweeney T., 2010. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in DGAT1, TG and FABP4 genes and intramuscular fat in crossbred *Bos taurus* cattle. *Meat science*, 85.3: 515-518.
- Pant S., Schenkel F., Leyva-Baca I., Sharma B., Karrow N., 2007. Identification of single nucleotide polymorphisms in bovine CARD15 and their associations with health and production traits in Canadian Holsteins. *BMC Genomics*, 8: 421.
- Phan J and Reue K 2005. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metabolism* 1, 73–83.
- Penasa M., Cassandro M., Pretto D., De Marchi M., Comin A., Chessa S., Dal Zotto R., Bittante G., 2010. Short communication: influence of composite casein genotypes on additive genetic variation of milk production traits and coagulation properties in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 93: 3346–3349.
- Prescott S. C., Breed R. S., 1910. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 7, n.5: 632-640.
- Pulina G., 2000. *Miglioramento genetico degli animali in produzione zootecnica*. Università degli Studi di Sassari – Facoltà di agraria – Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie, 1: 3; 7: 87-90.



- Pyörälä S., 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34: 567-569.
- Rossoni A., Bagnato A., Ghiroldi S., 2003. Progetto BOVMAS: a che punto siamo. *Rivista la Razza Bruna*, n.1: 15.
- Rossoni A., 2009. Come funzionano gli indici. *Rivista La Razza Bruna*, n.4: 4-6.
- Rossoni A., 2011. E' arrivata la genomica. *Rivista La Razza Bruna*, n.6: 52-53.
- Rossoni A., 2012. Quote rosa... in casa genomica. *Rivista La Razza Bruna*, n.4: 63-65.
- Rius A.G., McGilliard M.L., Umberger C.A., Hanigan M.D., 2010. Interactions of energy and predicted metabolizable protein in determining nitrogen efficiency in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 93: 2034–2043.
- Salvadori Del Prato O., 1998. *Trattato di tecnologia casearia*. Edagricole-Bologna.
- Santus E., 2009. Bruna e genomica: quando essere all'avanguardia è una scelta. *Rivista La Razza Bruna*, n.3: 3.
- Samoré A. B., Romani C., Rossoni A., Frigo E., Pedron O., Bagnato A., 2007. Genetic parameters for casein and urea content in the Italian Brown Swiss dairy cattle. *Italian Journal of Animal Science*, 6.1s: 201-203.
- Schallibaum M., 2001. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. 40th Annual Meeting, National Mastitis Council, Madison, WI, USA. Pp: 38-46.
- Schalm O. W., Carrol J. E., Jain N. C., 1971. *Bovine Mastitis*. 1st Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, USA, pp: 132-153.
- Schennink A., Bovenhuis H., Léon-Kloosterziel K. M., Van Arendonk J. A. M., Visker M. H. P. W., 2009. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Animal genetics*, 40.6: 909-916.
- Schiavini F., 2010. Mapping QTL in the Brown Swiss dairy cattle breed for milk quality traits. *Dottorato di ricerca in produzioni animali*. Pp. 104-107.
- Sharif A., Ahmad T., Bilal M. Q., Yousaf A., Muhammad G., 2007. Effect of severity of subclinical mastitis on somatic cell count and lactose contents of buffalo milk. *Pakistan Veterinary Journal.*, 27: 142- 144.
- Smith C. 1967. Improvement of metric traits through specific genetic loci. *Animal Production* 9:349–358.
- Smith T. H., McNamara J. P., 1990. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 6. Cellularity and hormone-sensitive lipase activity as affected by genetic merit and energy intake. *Journal of dairy science*, 73.3, 772-783.
- Soller M., Beckmann J. S., 1983. Genetic polymorphism in variety identification and genetic

- improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 67:25–33.
- Soyeurt H., Dehareng F., Mayeres P., Bertozzi C., Gengler N., 2008. Variation of delta(9)-desaturase activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 91: 3211–3224.
- Stefanon B., Summer A., Mariani P., 2002. Fattori alimentari, condizioni di allevamento e qualità del latte bovino. Proc. 1st Nat. Congr. of Mastitis Council Italy, Reggio Emilia, Italy. 141-142.
- Stoop W.M., Bovenhuis H., Van Arendonk J.A.M., 2007. Genetic parameters for milk urea nitrogen in relation to milk production traits. *Journal of Dairy Science*, 90: 1981–1986.
- Tyrisevä A. M., Vahlsten T., Ruottinen O., Ojala M., 2004. Noncoagulation of milk in Finnish Ayrshire and Holstein-Friesian cows and effect of herds on milk coagulation ability. *Journal of Dairy Science*, 87: 3958–3966.
- Verdier I., Coulon J.B., Pradel P., Berdagué J.L., 1995. Effect of forage type and cow breed on the characteristics of matured Saint-Nectaire cheeses. 75: 523-533.
- Vernon, R. G. (2003). Adipose tissue: an expanding role in the regulation of energy metabolism. *Publication - European Association for Animal Production*, 109: 451-464.
- Viitala, S., Szyda, J., Blott, S., Schulman, N., Lidauer, M., Mäki-Tanila, A., Georges M., Vilkki, J. (2006). The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Genetics*, 173.4: 2151-2164.
- Waters S.M., McCabe M.S., Howard D.J., Giblin L., Magee D.A., MacHugh D.E., Berry D.P., 2011. Associations between newly discovered polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein–Friesian dairy cattle. *Animal Genetics*, 42: 39–49.
- Welper R. D. and Freeman A. E., 1992. Genetic parameter for yield trait of Holstein, including lactose and somatic cell score. *Journal of Dairy Science*, 75: 1347.
- Wood G.M., Boettcher P.J., Jamrozik J., Jansen G.B., Kelton D.F., 2003. Estimation of genetic parameters for concentrations of milk urea nitrogen. *Journal of Dairy Science*, 86: 2462–2469.
- Yao J., Aggrey S. E., Zadworny D., Hayes J. F., Kühnlein U., 1996. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics*, 144.4: 1809-1816.
- Yoon J. T., Lee L. J., Kim C. K., Chung Y. C., Kim C. H., 2004. Effects of milk production, season, parity and lactation period on variations of milk urea nitrogen concentration and

milk components of Holstein dairy cows. *Asian Australasian Journal Of Animal Sciences*, 17.4: 479-484.

Zecconi A., 2007. Le cellule somatiche nel latte influenzano sanità e qualità. *L'informatore agrario*, 8: 66-69

Zhang J., Zan L., Fang P., Zhang F., Shen G., Tian W., 2008. Genetic variation of PRLR gene and association with milk performance traits in dairy cattle. *Canadian journal of animal science*, 88.1: 33-39.

## 7.- SITOGRAFIA

Accomando G., 2011. La galattopoiesi. Rivista di Agraria.org, n. 122.

Online: [http://www.rivistadiagraria.org/riviste/vedi.php?news\\_id=402&cat\\_id=211](http://www.rivistadiagraria.org/riviste/vedi.php?news_id=402&cat_id=211)

ANARB, Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna Italiana, 2008. Indici genetici, cosa sono e come utilizzarli al meglio.

Online: <http://www.anarb.it>

Biomedical Science- Marshall University.

Online: [http://www.science.marshall.edu/murraye/341/Images/416px-Dna-SNP\\_svg.png](http://www.science.marshall.edu/murraye/341/Images/416px-Dna-SNP_svg.png)

Carollo G., 2010. Funzioni ed attivita' commerciali di un consorzio di valorizzazione: il caso della razza bruna.

Online: [www.anarb.it](http://www.anarb.it)

C.L.A.L., Osservatorio Mercato prodotti lattiero-caseari.

Online: <http://www.clal.it>

CoRFiLaC, Consorzio Ricerca Filiera Lattiero Casearia.

Online: <http://www.corfilac.it/>

Corti M., 2008. RAZZA BRUNA- Ruralpini.

Online: [http://www.ruralpini.it/AlpeggiAnimali\\_Razze\\_Bovine\\_Brina.html](http://www.ruralpini.it/AlpeggiAnimali_Razze_Bovine_Brina.html)

INRAN, Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione.

Online: <http://www.nut.entecra.it/>

ISMEA, Istituto di servizi del mercato agro-alimentare.

Online: <http://www.ismea.it>

ISTAT, Istituto Nazionale di Statistica.

Online: <http://www.istat.it>

Rossoni A., Nicoletti C., Santus E., 2006. Il nuovo ITE da maggio 2006. Rivista La Razza Bruna.

Online: <http://www.anarb.it>

## 8.- APPENDICE

Tabella 2. Statistiche descrittive per i caratteri di produzione, composizione chimica e contenuto in cellule somatiche (N=1271).

Caratteri	Media	D.S.	P1 <sup>1</sup>	P99 <sup>2</sup>
Produzione di latte (kg/d)	24.62	7.81	9.20	45.30
Composizione chimica				
Grasso (%)	4.21	0.72	2.58	6.28
Proteina (%)	3.69	0.42	2.86	4.71
Caseina (%)	2.88	0.32	2.25	3.67
Lattosio (%)	4.85	0.19	4.30	5.22
Indice caseinico	0.78	0.01	0.74	0.80
MUN (mg/100 g) <sup>3</sup>	25.99	8.19	9.00	46.55
SCS (U) <sup>4</sup>	2.92	1.84	-0.47	7.54

<sup>1</sup>P1 = primo percentile.

<sup>2</sup>P99 = novantanovesimo percentile.

<sup>3</sup>MUN = milk urea nitrogen.

<sup>4</sup>SCS = somatic cell score.

Tabella 3. Ereditabilità stimata per i caratteri di produzione, composizione chimica e contenuto in cellule somatiche.

Caratteri	Ereditabilità (%)
Produzione di latte (kg/d)	18,2
Composizione chimica	
Grasso (%)	12,2
Proteina (%)	27,9
Caseina (%)	28,2
Lattosio (%)	17,0
Indice caseinico	15,1
MUN (mg/100 g) <sup>1</sup>	35,6
SCS (U) <sup>2</sup>	9,6

<sup>1</sup>MUN = milk urea nitrogen.

<sup>2</sup>SCS = somatic cell score.

Tabella 4. Lista degli SNP genotipizzati con successo, con indicati posizione sul cromosoma e frequenza dell'allele minore (MAF, Minor Allele Frequency).

Gene	Cr	Posizione	dbSNP	SNP	MAF
<i>POU1F1</i> (POU class 1 homeobox 1)	1	35013926		A/C	A=0
		35014129	rs109007595	C/T	C=0.35
<i>DGKG</i> (Diacylglycerol kinase, gamma)	1	81589478	rs41608610	C/T	C=0.16
<i>STAT1</i> (Signal transducer and activator of transcription 1- $\alpha$ /beta)	2	79888611	rs43705173	T/C	T=0.37
		79923716	rs43706906	C/G	C=0.42
<i>LEPR</i> (Leptin receptor)	3	80092003	rs43349286	T/C	T=0.26
<i>LEP</i> (Leptine)	4	93249281	rs29004170	C/G	C=0.43
		93263979	rs29004508	T/C	T=0.17
		93257549	rs110559656	A/G	G=0.31
<i>OLR1</i> (Oxidized low density lipoprotein receptor 1)	5	100247877	rs133629324	A/C	C=0.10
		100253752	rs135588030	A/G	G=0.22
<i>ABCG2</i> (ATP-binding cassette, sub-family G, member 2)	6	37983812	rs41577868	T/G	G=0.48
		38027010	rs43702337	A/C	C=0
<i>CSN1S1</i> (alpha s1 casein)	6	87141416	rs109817504	A/G	G=0.10
		87155366	rs110981354	C/G	G=0
		87157262	rs43703010	A/G	G=0.10
<i>CSN1S2</i> (alpha s2 casein)	6	87266180		T/C	C=0
<i>CSN2</i> (Beta casein)	6	87181453	rs43703013	G/C	C=0.16
		87181501	rs43703012	A/C	C=0
		87181542	rs109299401	A/C	A=0
		87181619	rs43703011	A/C	A=0.23
		87182992		T/C	T=0
<i>CSN3</i> (Kappa casein)	6	87390458	rs110870535	A/G	G=0
		87390576	rs43703015	T/C	C=0.22
<i>PPARGC1A</i> (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha)	6	44857081		A/C	C=0.05
		44875251	rs109579682	T/C	T=0
		44875315	rs133669403	A/G	G=0
<i>SPP1</i> (Secreted Phosphoprotein 1)	6	38121192	rs133929040	A/G	A=0
		38122665	rs110930453	T/C	T=0
<i>ADRB2</i> (Beta-2 adrenergic receptor)	7	62220606	rs132839139	A/G	G=0.05
<i>LPL</i> (Lipoprotein lipase)	8	67487606	rs110590698	T/A	T=0
		67497852	rs133043641	T/G	T=0
<i>TLR4</i> (Toll-like receptor 4)	8	108834063	rs8193048	A/G	G=0
		108838612	rs8193066	A/G	G=0
<i>LPIN1</i> (Lipin 1)	11	86056573	rs137457402	T/G	T=0.43
		86129986	rs136905033	T/C	T=0.10
<i>XDH</i> (Xanthine dehydrogenase)	11	14191183	rs42890834	A/G	G=0.39

<i>PLCB1</i> (Phospholipase C. beta 1)	13	1278678 1655502	rs110270855 rs41624761	T/C T/C	T=0.18 C=0.45
<i>FABP4</i> (Fatty acid binding protein 4)	14	46834401 46835065	rs135425060 rs110757796	A/C A/G	A=0 A=0.16
<i>LxR-alpha</i> (Oxysterols receptor LXR-alpha)	15	78324597	rs134390757	T/C	T=0.46
<i>FGF2</i> (Fibroblast growth factor 2)	17	35247491	rs110937773	A/G	A=0.48
<i>TLR2</i> (Toll-like receptor 2)	17	3952556 3952732	rs43706433 rs43706434	A/G A/G	A=0.36 A=0.15
<i>CARD15</i> (Caspase recruitment domain 15 protein)	18	19210671	rs43710288	T/A	T=0.38
<i>GRLF1</i> (Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1)	18	54450227	rs41572288	T/C	C=0.49
<i>LIPE</i> (hormone-sensitive lipase)	18	51214707	rs110137537	A/C	A=0.26
<i>ACACA</i> (Acetyl-CoA carboxylase alpha)	19	13794520 13887927	rs133999659 rs110562092	T/A A/G	T=0 G=0.5
<i>CCL2</i> (Chemokine ligand 2)	19	16233476 16234934	rs41255714 rs41255713	A/G T/C	G=0.35 T=0.23
<i>CCL3</i> (Chemokine ligand 3)	19	14673538	rs109686238	T/C	C=0.37
<i>GHI</i> (growth hormone 1)	19	48768916	rs41923484	C/G	C=0.23
<i>STAT5A</i> (Signal transducer and activator of transcription 5A)	19	43045807 43054393	rs137182814 rs109578101	C/G T/C	C=0.5 T=0.11
<i>GHR</i> (Growth hormone receptor)	20	31891078 32146186	rs109136815 rs109231659	T/C T/G	T=0.30 G=0
<i>PRLR</i> (Prolactin receptor)	20	39115344 39132325	rs135164815 rs109428015	A/G T/C	G=0 T=0.24
<i>PI</i> (serpin peptidase inhibitor)	21	59580932 59582394	rs136294648 rs41257077	A/C A/G	A=0 A=0.23
<i>PLIN</i> (perilipin 1)	21	21504687	rs134625550	C/G	C=0
<i>CCR2</i> (Chemokine receptor 2)	22	53613730	rs41257559	T/C	T=0.31
<i>LTF</i> (Lactotransferrin)	22	53538186 53538807	rs43765462 rs43765461	T/G T/C	G=0 C=0.10
<i>PPARG</i> (Peroxisome proliferative activated receptor. gamma)	22	57432122		A/G	A=0
<i>AGPAT1</i> (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1)	23	27017243	rs137499341	C/T	A=0.28
<i>PRL</i> (Prolactin)	23	35106206 35114464	rs211032652 rs110684599	C/T A/C	A=0.37 A=0.25
<i>PLCE1</i> (phospholipase C. epsilon 1)	26	15383866	rs41624917	T/C	T=0.27
<i>SCD-1</i> (Stearoyl-CoA desaturase)	26	21144708 21149234	rs41255693 rs136334180	T/C A/G	T=0.15 A=0.47
<i>AGPAT6</i> (1-acylglycerol-3-	27	36212557	rs110454169	T/C	T=0.38

phosphate O-acyltransferase 6)		36220692	rs109913786	T/C	T=0.17
<i>FADS2</i> (Fatty acid desaturase 2)	29	41078894	rs109043635	T/C	C=0

Tabella 5. Stima dell'effetto di sostituzione allelica e proporzione di variabilità genetica spiegata da ogni gene ( $V_a$ %) per i caratteri di produzione, composizione chimica e contenuto in cellule somatiche.

Gene	Caratteri	Allele	Stima	$V_a$ %
<i>ACACA</i> (rs110562092)	SCS (U) <sup>1</sup>	A vs G	-0,191	7,18
<i>ADRB2</i> (rs132839139)	MUN (mg/100 g) <sup>2</sup>	A vs G	-2,262	6,99
<i>CARD15</i> (rs43710288)	Proteine (%)	T vs A	0,032	2,19
	Caseina (%)	T vs A	0,028	9,24
<i>CCL2</i> (rs41255714)	Produzione di latte (kg/d)	A vs G	0,651	4,68
<i>CSN3</i> (rs43703015)	Lattosio (%)	T vs C	-0,029	9,95
<i>GH</i> (rs41923484)	Indice caseinico	C vs G	-0,003	0,08
	Lattosio (%)	C vs G	-0,026	8,26
<i>GRLF1</i> (rs41572288)	Produzione di latte (kg/d)	T vs C	0,556	3,75
	Lattosio (%)	T vs C	0,019	6,01
<i>LPINI</i> (rs137457402)	Proteine (%)	T vs G	0,027	1,62
	Caseina (%)	T vs G	0,021	1,66
<i>LTF</i> (rs43765461)	Indice caseinico	T vs C	0,007	0,22
	Lattosio (%)	T vs C	0,077	35,57
<i>PI</i> (rs41257077)	MUN (mg/100 g) <sup>2</sup>	A vs G	-0,676	2,33
<i>PRLR</i> (rs109428015)	Produzione di latte (kg/d)	T vs C	0,786	5,46
<i>SCD-1</i> (rs136334180)	Grasso (%)	A vs G	0,069	4,65
<i>SCD-1</i> (rs41255693)	Grasso (%)	T vs C	0,194	18,82
	MUN (mg/100 g) <sup>2</sup>	T vs C	1,908	13,35
	Indice caseinico	T vs C	0,005	0,16
<i>STAT1</i> (rs43706906)	SCS (U) <sup>1</sup>	C vs G	0,218	9,12

<sup>1</sup>SCS = somatic cell score.

<sup>2</sup>MUN = milk urea nitrogen.



Figura 9. Rappresentazione schematica delle relazioni che intercorrono tra i singoli geni e i vari caratteri del latte.

<sup>1</sup>MUN = milk urea nitrogen.

<sup>2</sup>SCS = somatic cell score.

