

## RELAZIONE CONCLUSIVA Progetto STALLA 20.20 – Misura 16.2

*"The safety and quality of milk and milk products is essential for a healthy population."*

Tom Heilandt (Codex Alimentarius, Commission Secretary)

---

Oggetto: **Misura 16.2** - Programma di Sviluppo Rurale 2014/2020 - Sostegno a progetti pilota e allo sviluppo di nuovi prodotti, pratiche, processi e tecnologie – FILIERA AGROALIMENTARE n. 497 - 11/08/2016

**Domanda di aiuto n. 21999**

Titolo: **Progetto STALLA 20.20: caratterizzazione genetica**

### 1. Working Areas: principali campi d'azione per la gestione delle stalle



**Figura 1.** Principali campi d'applicazione per la gestione della stalla.

Il principale obiettivo del progetto è inquadrare un modello di gestione della stalla che sia poi ripetibile nel futuro per il controllo di caratteri genetici in funzione delle esigenze delle singole aziende, in base ai piani di accoppiamento e al miglioramento continuo del prodotto finito e del benessere animale.

L'igiene e la sanificazione rappresentano uno degli obiettivi cardine per il mantenimento dei requisiti di qualità del prodotto finito e per mantenere elevati gli standard qualitativi è necessario un piano preciso di management della stalla. In questo quadro si inseriscono poi i requisiti per l'ottenimento e il mantenimento

di certificazioni sanitarie, necessarie per aprire nuove opportunità di mercato e per aumentare il valore della materia prima latte.

Cooperlat, come coordinatore di progetto, ha svolto la sua attività di coinvolgimento dei partner aderenti al progetto di filiera, al fine di cogliere le singole esigenze e di armonizzare le attività di ciascuno per il raggiungimento degli obiettivi finali. Oltre all'attività di coordinamento, Cooperlat ha organizzato meeting periodici per lo scambio di informazioni relativo al progetto e per la crescita continua nel confronto diretto tra aziende e organizzazioni pubbliche.

Il crescente consumo di prodotti lattiero-caseari è associato ad un aumento del rischio o dell'aggravamento dei sintomi di alcuni disturbi, tra cui:

- 1) disfunzione gastrointestinale (ad esempio: dispepsia, gastrite, duodenite, colite);
- 2) disturbi correlati all'immunità (malattie autoimmuni);
- 3) infiammazione intestinale ed extra-intestinale.

Alcuni di questi effetti sono attribuiti a un gruppo di peptidi (proteine) presenti nel latte, derivati dalla lisi della BETA-caseina, in particolare la  $\beta$ -casomorfina-7.

La caseo-MORFINA deriva unicamente dalla digestione della Caseina A1 (non dalla Caseina A2), i due principali tipi di  $\beta$ -caseina presenti nel latte. Uno o entrambi questi tipi possono essere espressi nel latte delle mucche, a seconda della composizione genetica dei singoli animali. La caseina e i suoi derivati, in particolare la caseo-MORFINA, esercitano una varietà di effetti sulla funzione gastrointestinale nei modelli animali, inclusa la riduzione della frequenza e dell'ampiezza delle contrazioni intestinali aumentando la secrezione di muco e sopprimendo la proliferazione dei linfociti.

L'ipotesi è che il consumo di A1  $\beta$ -caseina porta alla produzione e all'esposizione del tessuto intestinale ed extra-intestinale (anche il cervello) alla caseo-MORFINA, con conseguenti effetti pro-infiammatori tra cui:

- 1) attività di segnalazione alterata;
- 2) disturbi redox (aumento dell'ossidazione);
- 3) alterazione della regolazione epigenetica.

Una conseguenza di questi cambiamenti è L'INTERRUZIONE DEL PROCESSO DIGESTIVO, che può manifestarsi come sintomi di intolleranza al lattosio.

Negli ultimi 10 anni è aumentata l'attenzione e l'interesse verso il latte A2. In Europa, e in particolare in Italia, per il momento è ancora un prodotto di nicchia, pochissimo conosciuto, mentre è molto popolare in altri paesi, in particolare Australia e Nuova Zelanda, Cina e ora anche gli Stati Uniti, dove ha conquistato ingenti quote di mercato. A partire dagli anni 2000 sono stati pubblicati diversi studi scientifici in letteratura dedicati al latte con la Beta-caseina A2, dai quali emergerebbe una maggiore digeribilità.

Gli effetti della pandemia in atto hanno modificato le abitudini alimentari dei consumatori, che scelgono prodotti in modo consapevole e premiano i prodotti premium, a maggior valore aggiunto e percepito. Le vendite del latte delattosato hanno registrato un incremento del 35% negli ultimi 5 anni e rappresentano il 17% del fatturato complessivo del mercato. Il latte senza lattosio può essere considerato il capofila di una serie di prodotti rivolti al mercato *healthy*.

**Altre aziende produttrici di latte hanno già intrapreso la commercializzazione del latte unicamente A2, frutto di una selezione genetica mirata ad ottenere la beta-caseina solo di tipo A2** (che si tratti di latte fresco pastorizzato o di latte pastorizzato a temperatura elevata).

La sola presenza di Beta-caseina A2 sembra amplificare i benefici del consumo abituale del latte, eliminando i disturbi gastrointestinali associati alla digestione del latte, e favorendo un più rapido tempo di transito, gastrointestinale. Per valutare il gradimento del prodotto e le sensazioni che evoca a chi lo prova, è stato condotto con l'istituto di ricerca **Adacta**, un test coinvolgendo 100 consumatori di latte fresco. Il test si è svolto in modalità blind, ossia sono stati inviati ai consumatori prescelti dei campioni di prodotto chiedendo di provarli per 3-4 giorni, senza rivelare né la tipologia né la marca, così da non influenzare in nessun modo il giudizio. Al termine del test è stato chiesto loro di rispondere a un breve questionario, da cui è emerso che l'81% del campione intervistato ha dichiarato che il prodotto dà una sensazione di leggerezza e maggiore digeribilità. La medesima percentuale di consumatori acquisterebbe abitualmente il prodotto.

Il polo Agrifood della regione Piemonte ha supportato il progetto per l'incremento della beta-caseina A2 nel latte, al fine di commercializzare un prodotto finito unicamente A2, con un profilo proteico ad aumentata digeribilità rispetto al latte convenzionale.

Obiettivo di un progetto analogo a Stalla 20.20, inserito nel contesto dell'innovazione di prodotto contestualmente alla Misura 16 – PSR della Regione Emilia-Romagna - è realizzare una filiera corta di vendita del formaggio con una Dop (dalla storia quasi millenaria), come il Parmigiano Reggiano interamente A2A2, (nome del progetto: **Parmaggrega**). Per realizzare l'obiettivo di selezionare bovine A2A2 sono stati necessari quattro anni. Partendo dall'analisi del patrimonio genetico presente nella stalla San Pier Damiani e con una selezione spinta degli animali nei programmi di fecondazione grazie all'utilizzo di tori geneticamente A2, si è

arrivati ad ottenere una massa critica di latte da destinare alla caseificazione in Parmigiano Reggiano. Nel 2020 è stato raggiunto il numero minimo di bovine A2A2 ed è iniziata la raccolta e lavorazione separata, con l'obiettivo di arrivare nel 2025 al 100% di vacche e latte A2A2.

È così iniziato il processo di produzione di Parmigiano Reggiano A2A2, che è stato sottoposto a certificazione di un ente terzo. A marzo di quest'anno le prime forme hanno raggiunto i 12 mesi di stagionatura necessari per ottenere la certificazione Dop e per essere messo in commercio.

## 2. Il LATTE A2: Cenni Storici

Per la Beta-Caseina si conoscono ben 13 varianti ma solo due, la A1 e la A2, sono le prevalenti nelle razze maggiormente allevate per la produzione di latte.

La sigla 'A2' si riferisce alla frazione  $\beta$  della caseina presente nel latte, che esiste principalmente nelle due varianti: A1 e A2, le quali differiscono per la presenza in posizione 67 della catena aminoacidica della istidina nel caso della A1 e della prolina nel caso della A2.

Questa minima differenza apparentemente non-significativa, è stata oggetto dello studio di due ricercatori neozelandesi (Corran McLachlan e Bob Eliot), che per primi nel 1993 approfondendo gli studi, giunsero alla conclusione di una diversa capacità digestiva una volta che il latte viene ingerito dall'uomo.

Durante la digestione la variante A1 sembrerebbe formare una sostanza denominata BCM-7 (beta-casomorfina 7), un oppioido naturale con un effetto potenzialmente negativo per la comparsa di alcune patologie. La BCM-7 non si formerebbe invece durante la digestione del latte A2 per questo ritenuto più digeribile perché indurrebbe nei consumatori una minor intolleranza al lattosio, nonché una minor incidenza di malattie cardiovascolari e di diabete di tipo 1.

A quanto detto, va premesso che in origine tutto il latte bovino pare fosse di tipo A2 e che solo a seguito di una mutazione sarebbe comparsa la forma A1 oggi peraltro maggiormente diffusa.

Nel 2007 la New Zealand Food Security Authority e l'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare), evidenziarono la necessità di approfondire il tema per aumentare il numero di dati disponibili ed affidabili al fine di giungere a conclusioni scientifiche certe. Commercialmente il latte A2 copre il 12% del mercato australiano ed è in crescita in Nuova Zelanda, Regno Unito, Stati Uniti e Cina. In U.S.A. il latte della A2 Milk Company, ha superato le vendite di latte biologico ed è tra i prodotti richiesti della prima infanzia. Le ricerche scientifiche – volte a dimostrare i benefici legati all'assunzione di latte A2 - sono ancora in corso e questo progetto mira ad offrire una panoramica completa della situazione attuale degli allevamenti marchigiani. Dati di letteratura suggeriscono che la razza Frisona contenga circa il 50% del gene A2 della  $\beta$ -a caseina (la Bruna, la Pezzata Rossa e la Jersey superano il 60 % di soggetti A2).

Per incrementare la frequenza allelica della beta-caseina A2 in una mandria, si può agire a livello genetico sostituendo, nel tempo, la popolazione bovina che produce A1 con quella che produce A2 (selezione genetica).

Aumentare la frequenza del gene della Beta-Caseina A2 è abbastanza semplice, poiché - a livello genetico - la produzione di Beta-Caseina è controllata da un solo gene, come ad esempio nel caso della k-caseina, per cui il genotipo di un animale può essere "A1A1", "A2A2" o "A1A2". Sono ereditate in maniera Mendeliana, quindi per aumentare l'incidenza nella popolazione dell'allele A2, occorre usare tori omozigoti A2A2, controllando con un test del DNA il genotipo delle figlie. Questo ci dà la possibilità di ottenere una mandria composta da vacche omozigote A2, facendo affidamento sulla selezione genetica.

## OBIETTIVI E SITUAZIONE OPERATIVA

### 1. Studio della stato genetico delle mandrie

Come previsto secondo l'approccio metodologico del progetto, è stato avviato lo screening genetico per il gene codificante la  $\beta$ -caseina di tutte le bovine appartenenti alle aziende zootecniche aderenti al progetto (escludendo solamente le vacche da riforma o a fine carriera).

I campioni di sangue sono stati prelevati dall'IZSUM e gli stessi sono stati identificati risalendo alla matricola specifica con cui ciascun animale è stato registrato presso la BDN (Banca Dati Nazionale). Da ciascun prelievo è stato estratto il DNA genomico, utilizzato per la determinazione del genotipo beta caseina tramite analisi di sequenza. E' stato poi amplificato tramite PCR l'esone 7 (che codifica per la beta caseina) e i prodotti di PCR sono stati analizzati in elettroforesi orizzontale su gel di agarosio. Gli amplificati purificati sono stati sottoposti a reazione di sequenza, utilizzando un BigDye terminator cycle sequencing kit. Dopo purificazione dei prodotti di sequenza i campioni sono stati analizzati su sequenziatore automatico. Le sequenze ottenute sono state poi analizzate e allineate con una sequenza di riferimento, ottenuta da banche dati (NCBI). La valutazione dei polimorfismi ottenuti (SNP), al fine di identificare il genotipo dei campioni analizzati, ha permesso la caratterizzazione genetica di 6 diverse varianti alleliche del gene per la beta-caseina (variante A1, A2, A3, B, F, I). Il metodo mostra un'elevata sensibilità e specificità, con costo limitato e rapidità di effettuazione.

Nella popolazione delle bovine da latte oggetto di studio, sono state identificate 5 varianti (A1, A2, B, F, I) e 13 genotipi (A1A1, A1A2, A1B, A1F, A1I, A2A2, A2B, A2F, A2I, BB, BF, BI, FI).

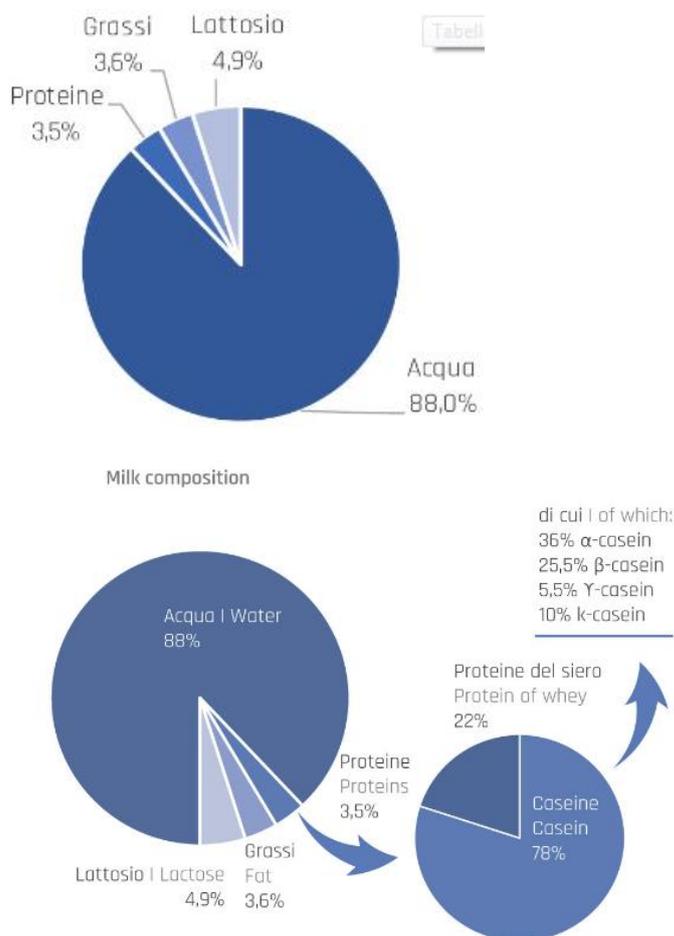


Figura 2. La composizione del latte.

Parametri	Frisona	Bruna	Reggiana	Modenese
q.tà latte (litri/gg)	34	22	18,4	17,9
proteina totale [g]	3,28	3,41	3,46	3,52
caseina (g)	2,52	2,65	2,68	2,78
$\kappa$ -caseina %	11,25	12,67	12,24	12,28

Figura 3. Le caratteristiche del latte: razze a confronto.

La caseina è costituita da micelle (aggregati proteici), a loro volta formate da sub-micelle legate tra loro. Contengono gruppi fosforici, carichi negativamente, che legano calcio e magnesio. Le frazioni di caseine nel latte sono 5: alfa-s1, alfa-s2, beta, gamma, e kappa. Ad eccezione della kappa-caseina, sono tutte idrofobiche e tendono ad aggregarsi in soluzione acquosa. La micella di caseina è molto stabile: le caseine beta e alfa, si

dispongono all'interno (perché fortemente idrofobiche), mentre le kappa-caseine con la parte idrofobica verso l'interno, stabilizzano la struttura.

## **2. Inseminazione controllata con tori omozigoti A2A2**

Per incrementare la frequenza allelica della beta-caseina A2 nelle stalle partner di progetto, i capi genotipizzati sono stati inseminati con seme bovino omozigote A2A2 – sessato o convenzionale (secondo lo schema di gestione della singola stalla e seguendo la selezione genetica a trasmissione mendeliana, poiché la produzione di Beta-Caseina è controllata da un solo gene).

I test del DNA del genotipo delle figlie, hanno confermato l'incremento della frequenza allelica dell'A2 nelle mandrie oggetto di studio. Per ulteriori dettagli vedi § Avanzamento Raggiunto.

## **3. Controlli periodici sulle frazioni delle caseine presenti nel latte di massa.**

Sono stati effettuati degli studi bibliografici al fine di definire il metodo più adatto per la determinazione della beta-caseina nei campioni di latte delle singole stalle partner di progetto e nel latte di massa. Dopo numerosi tentativi di messa a punto del metodo e di replicazione in laboratorio, è deciso di inviare i campioni ad un laboratorio esterno, in grado di determinare varianti genetiche (es.  $\alpha$ ,  $\beta$  e K caseine) mediante tecnica elettroforetica con punto isoelettrico.

## **4. Sopralluoghi bimensili presso gli allevamenti.**

Presso le aziende zootecniche facenti parte del partenariato e partecipanti al progetto sono stati eseguiti sopralluoghi periodici da parte del personale tecnico, finalizzati alla verifica dello stato di salute delle mandrie, con particolare riguardo agli aspetti relativi alla sanità dell'allevamento, alle tecniche di alimentazione, alle modalità di gestione del benessere animale.

### **- AVANZAMENTO RAGGIUNTO**

Il principale obiettivo del progetto è stato sin d'ora quello di inquadrare un modello di gestione della stalla, che sia poi ripetibile nel futuro, per il controllo di caratteri genetici in funzione delle esigenze delle singole aziende. Si è reso necessario prestare la massima attenzione ai piani di accoppiamento e al miglioramento continuo del prodotto finito (latte) e al benessere animale.

Un preciso piano di management della stalla si è reso necessario. L'igiene degli animali e la sanificazione degli ambienti hanno rappresentato due fattori cardine per il mantenimento dei requisiti di qualità del prodotto finito e per la conservazione di un elevato standard qualitativo. In questo quadro, si sono inseriti poi i requisiti

per l'ottenimento e il mantenimento di certificazioni sanitarie, necessarie per aprire nuove opportunità di mercato e per aumentare il valore della materia prima latte.

Cooperlat, come coordinatore di progetto, ha svolto la sua attività di coinvolgimento dei partner aderenti al progetto di filiera, al fine di cogliere le singole esigenze e di armonizzare le attività di ciascuno, per il raggiungimento degli obiettivi finali. Oltre all'attività di coordinamento, Cooperlat ha organizzato meeting periodici per lo scambio di informazioni relativo al progetto e per la crescita continua nel confronto diretto tra aziende e organizzazioni pubbliche. Sono stati organizzati meeting periodici per lo scambio dei dati e per la discussione proattiva su argomenti d'interesse, precedentemente concordati e strettamente correlati con le tematiche del progetto.

Sono state altresì svolte attività di divulgazione e sono stati organizzati due convegni annuali (ad Ancona, 1 Marzo 2019 e webinar del 19 Giugno 2020), per la condivisione dei dati ottenuti ed elaborati e per la divulgazione dei risultati di progetto.

Come previsto secondo l'approccio metodologico del progetto, è stato avviato lo screening genetico per il gene codificante la  $\beta$ -caseina di tutte le bovine appartenenti alle aziende zootecniche aderenti al progetto (escludendo solamente le vacche da riforma o a fine carriera).

I campioni di sangue sono stati prelevati periodicamente dall'IZSUM e gli stessi sono stati identificati risalendo alla matricola specifica con cui ciascun animale è stato registrato presso la BDN (Banca Dati Nazionale). Da ciascun prelievo è stato estratto il DNA genomico, utilizzato per la determinazione del genotipo beta caseina tramite analisi di sequenza. E' stato poi amplificato tramite PCR l'esone 7 (che codifica per la beta caseina) e i prodotti di PCR sono stati analizzati in elettroforesi orizzontale su gel di agarosio. Gli amplificati purificati sono stati sottoposti a reazione di sequenza, utilizzando un BigDye terminator cycle sequencing kit. Dopo purificazione dei prodotti di sequenza i campioni sono stati analizzati su sequenziatore automatico. Le sequenze ottenute sono state poi analizzate e allineate con una sequenza di riferimento, ottenuta da banche dati (NCBI). La valutazione dei polimorfismi ottenuti (SNP), al fine di identificare il genotipo dei campioni analizzati, ha permesso la caratterizzazione genetica di 6 diverse varianti alleliche del gene per la beta-caseina. Il metodo ha mostrato un'elevata sensibilità e specificità, con costo limitato e rapidità di effettuazione. Nella popolazione dello studio si identificavano 5 varianti (A1, A2, B, F, I) e 13 genotipi (A1A1, A1A2, A1B, A1F, A1I, A2A2, A2B, A2F, A2I, BB, BF, BI, FI).

Nel corso dei primi due anni di progetto, è stata effettuata l'inseminazione controllata dei capi con tori omozigoti A2A2, come previsto dal progetto e sono state verificate le relative percentuali incrementali della variante A2 in omozigosi.

I dati ottenuti sono stati pubblicati nell'articolo *"Evaluation of  $\beta$ -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central-Italy"*, sulla rivista ANIMALS. Inoltre, l'aggiornamento delle frequenze alleliche è stato presentato in un poster dal titolo *' $\beta$ -CASEIN GENE POLYMORPHISMS IN DAIRY COWS REARED IN CENTRAL ITALY'*, in occasione del European Biotechnology Congress 2020.

#### - Step successivi

Sino al termine del progetto STALLA 20.20 sono stati effettuati sopralluoghi periodici in stalla, per il monitoraggio e la caratterizzazione genetica dei capi delle stalle aderenti, al fine di concludere l'identificazione genotipica degli alleli e verificare i risultati delle inseminazioni effettuate nei primi anni di progetto. I dati sono stati costantemente elaborati e riassunti in tabelle esplicative, condivise con i partner e pubblicate su due diverse riviste scientifiche. Sopralluoghi mensili, nel corso dell'intero progetto, sono stati utilizzati anche per il controllo puntuale dello stato sanitario delle aziende, relativamente alle mastiti e alla *Paratubercolosi* bovina.

Sono stati, infine, effettuati specifici controlli sulle frazioni delle caseine presenti nel latte di massa delle diverse stalle, al fine di verificare la corrispondenza dei dati genotipici e la composizione della frazione caseinica (in seguito alle azioni svolte).

#### - Focus sui risultati parziali del progetto

Questo progetto dimostra come la selezione genetica può essere uno strumento per modificare le prestazioni delle diverse razze di bovine da latte, tra cui la frisona.

Si può incrementare la produzione di latte, si possono migliorare caratteri morfologici, salute e fertilità. A partire dal 2000, i programmi di allevamento hanno iniziato ad includere la salute e la fertilità, come caratteri di selezione genetica, al fine di sviluppare fenotipi con un'ideale ereditarietà (i caratteri della fertilità di solito hanno infatti una bassa ereditabilità: 0,1), correlati per lo più a specifici marcatori genetici (polimorfismi a singolo nucleotide, SNPs – facilmente misurabili e trasmissibili).

Interessanti risultati sono stati ottenuti su questo tema, contestualmente al progetto europeo 'Genotype plus Environment' (GplusE), che ha identificato nuovi genotipi basati sul latte e possibili predittori per caratteri tradizionali (solitamente difficili da misurare, selezionare e registrare: come il tasso di concepimento e la salute dell'utero). Sono state effettuate delle misurazioni di metaboliti presenti nel latte e dei glicani delle immunoglobuline gamma – IgG (mediante spettro a medio infrarosso – MIR), correlandoli a marcatori genomici della fertilità e di salute dell'animale, per poter effettuare nuove strategie di selezione.

Uno studio del Dublin University College descrive come alcuni marcatori per i glicani possano essere considerati indicatori di salute uterina per le bovine da latte. Altri marcatori per glicani possono essere identificati nel latte come predittivi di casi di ritenzione placentare.

Tamminga *et al.* hanno condotto dei trial per verificare la mobilitazione delle riserve corporee, come fattore chiave responsabile dell'aumentata suscettibilità alle malattie dei bovini da latte. Lo stato metabolico dell'animale – così come la composizione del latte e il mantenimento dello stato di salute – è influenzata dalla mobilitazione corporea, guidata da fattori genetici ed ormonali, dal fabbisogno energetico e dalla capacità di assunzione energetica delle bovine. Ad esempio, si parla di bilancio energetico delle bovine nelle 5-7 settimane dopo il parto e nel periodo della lattazione; questo stato caratteristico delle vacche da latte, comporta una ridotta fertilità, legata ad un ritardo nella ripresa della normale ciclicità ovarica, ad una scarsa salute dell'utero e ad una minore percentuale di gravidanze ad esito positivo dopo la prima.

Studi scientifici correlano la dieta, la composizione della razione e lo stress metabolico con la ridotta fertilità delle bovine e i meccanismi legati al bilancio energetico negativo (NEB). Sono in atto studi specifici sull'effetto - in termini di fertilità - dell'integrazione della razione con farina di soia, come principale fonte proteica. Inoltre, vengono prese in considerazione integrazioni di grassi (in base alla fonte, alla frequenza, alla composizione della dieta, alle caratteristiche metaboliche e corporee dell'animale) o di vitamine e minerali, per migliorare l'attività riproduttiva delle bovine da latte.

La valutazione dello stato di salute generale della mandria è un fattore fondamentale per poter garantire un monitoraggio costante della fertilità e del successo della strategia riproduttiva degli allevatori.

A tale proposito, i controlli periodici effettuati sino ad ora – unitamente a quelli futuri – servono per valutare puntualmente lo stato di salute delle mandrie, con particolare attenzione ad escludere la presenza di agenti patogeni, potenzialmente pericolosi anche per l'efficienza riproduttiva.

Oltre al monitoraggio continuo, si renderanno necessari adeguati piani di biosicurezza, protocolli vaccinali per la prevenzione; tutte attività per ridurre al minimo il rischio di insorgenza di malattie e mettere a punto programmi mirati per il mantenimento dello stato di salute della mandria.

L'approccio tradizionale per la gestione dell'attività riproduttiva delle bovine e l'impiego dell'inseminazione artificiale includono il monitoraggio del comportamento estrale e l'utilizzo di protocolli di inseminazione prestabiliti. Dati bibliografici riportano che nella razza frisona da latte ad elevata produzione le performance riproduttive di successo si basano sulla rilevazione del picco estrale e successiva inseminazione. Non è da sottovalutare l'abilità degli addetti all'inseminazione, al fine di effettuare il trattamento al momento opportuno e con la massima efficienza ed efficacia (ovviamente, tenendo conto della qualità dello sperma utilizzato/ comprovata fertilità del toro di origine). E' importante tenere presente che il cross-breeding non

è necessariamente coincidente con il miglioramento genetico; questo aspetto implica che è fondamentale tener conto dei dati di fertilità della mandria in relazione alla tipologia di seme utilizzato. In questo quadro risulta chiaro il ruolo chiave dei piani di accoppiamento periodico, disegnati *ad hoc* tenendo conto delle caratteristiche cogenti della mandria.

La selezione genetica (compresi i fenotipi migliorati da utilizzare nei programmi di accoppiamento), unitamente ad altri fattori (tra cui ad esempio il controllo delle malattie infettive, la gestione dell'aspetto riproduttivo, la sincronizzazione dell'ovulazione e dell'estro, etc.) è uno dei fattori chiave che possono influenzare la salute e le prestazioni riproduttive delle bovine da latte.

---

### CONCLUSIONE DELLE ATTIVITA'

In precedenza è stato illustrato l'esito della mappatura iniziale delle stalle della Regione Marche, le attività del progetto sono proseguite – come illustrato dal piano delle azioni di progetto - per la determinazione della frequenza allelica, della variabilità genetica e della distribuzione dei genotipi del *locus* d'interesse.

Sono stati raggiunti gli obiettivi operativi, basati su tre diverse strategie di intervento. Nel corso dello svolgimento del progetto, sono stati verificati periodicamente gli aspetti sanitari (con particolare attenzione alla Paratubercolosi bovina e alle mastiti) di ciascuna stalla partner di progetto. Attraverso la selezione di una progenie di manze e cacche produttrici – omozigoti A2/ A2 per il gene della beta-caseina – è stato effettuato un miglioramento della genetica degli animali produttivi, come previsto dai singoli piani di accoppiamento. Considerando che le caratteristiche nutrizionali del latte (intendendo anche le componenti caseiniche) sono strettamente correlate anche all'alimentazione degli animali, sono stati monitorati e migliorati gli aspetti nutrizionali. Tutti questi aspetti hanno avuto come *driver* finale lo sviluppo di una strategia di gestione della mandria, mirata al miglioramento del benessere animale e quindi della qualità e della quantità del latte prodotto.

---

Nonostante sul mercato siano disponibili diverse fonti di latte, il latte bovino rappresenta il più consumato a livello mondiale (Faye *et al.*, 2012); contiene nutrienti essenziali come proteine ad alto valore biologico, lipidi, carboidrati (principalmente lattosio), minerali (calcio, fosforo, zinco e magnesio) e vitamine (es. B2, B12, D e A - Jennes *et al.*, 1979 ; Muehlhoff *et al.*, 2013). Per quanto riguarda la frazione proteica del latte, questa è composta da proteine solubili, dette anche proteine del siero di latte, e da proteine insolubili, ovvero le caseine, che rappresentano circa l'80% delle proteine totali del latte bovino. Questi sono suddivisi in quattro gruppi,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$  e  $\kappa$ , codificati rispettivamente dai geni CSN1S1, CSN1S2, CSN2 e CSN3, tutti localizzati sul cromosoma 6 (Rijnkels *et al.*, 2002).

Nonostante l'elevato consumo di latte in tutto il mondo, alcune persone sperimentano disturbi digestivi in seguito all'assunzione di latte e latticini, a causa di malassorbimento di lattosio o difficoltà digestive dovute ad altri componenti lattiero-caseari come la  $\beta$ -caseina, che rappresenta circa il 36% del contenuto proteico del latte (Milano *et al.*, 2020). Nello specifico, alcuni studi hanno mostrato una correlazione tra la salute umana e alcune varianti di  $\beta$ -caseina (Thiruvengadam *et al.*, 2021; Kay *et al.*, 2021). Infatti, il gene *Bos taurus* CSN2 ospita molte sostituzioni nucleotidiche che portano alla formazione di 12 varianti proteiche (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2 e I), sette delle quali (A1, A2, A3, B, C, I ed E) sono stati identificati principalmente nelle razze bovine europee (Barroso *et al.*, 1999; Masella *et al.*, 2017; Hohmann *et al.*, 2021; Daniloski *et al.*, 2021 - Tabella 1).

---

**Tabella 1.** Differenza nella sequenza aminoacidica delle variant della beta-caseina (in grassetto: variazioni aminoacidiche rispetto alla variante ancestrale A2).

$\beta$ -casein	Amino Acid Position								
	36	37	67	72	88	93	106	122	138
A2 *	Glu (E)	Glu (E)	Pro (P)	Gln (Q)	Leu (L)	Met (M)	His (H)	Ser (S)	Pro (P)
A1 *			<b>His (H)</b>						
A3 *							<b>Gln (Q)</b>		
B *			<b>His (H)</b>					<b>Arg (R)</b>	
C *		<b>Lys (K)</b>	<b>His (H)</b>						
E *	<b>Lys (K)</b>								
I *						<b>Leu (L)</b>			
D									
F			<b>His (H)</b>						<b>Leu (L)</b>
G			<b>His (H)</b>					<b>Leu (L)</b>	
H1					<b>Ile (I)</b>				
H2				<b>Glu (E)</b>		<b>Leu (L)</b>			<b>Glu (E)</b>

Arg: arginina; Gln: glutammina; Glu: acido glutammico; His: istidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lys: lisina; Met: metionina; Pro: prolina; Ser: serina; \* Varianti alleliche rilevate nelle razze bovine europee.

---

Un totale di 1452 vacche Frisone, allevate in allevamenti del centro Italia e precedentemente genotipizzate – di cui 640 sono risultate omozigoti A2 e 812 portatrici di A2 (nelle diverse varianti: A1/A2, A2/B, A2/I) - sono state sottoposte a fecondazione artificiale con seme di tori selezionati A2/A2 (le aziende fornitrici di seme bovino alle cinque stalle aderenti al progetto sono: Co.S.A.P.A.M. Soc. Coop., Lodi, Italia; ABS Italia Srl, Cremona, Italia; INSEME Spa, Modena, Italia).

La stima delle frequenze alleliche e genotipiche della variante A2 delle madri è stata utilizzata per pianificare un programma di selezione basato su MAS (*Marked Assisted Selection*: ricerca di brevi tratti noti di DNA situati in prossimità del gene di interesse. La sequenza marker identifica il gene cercato ed è ereditata insieme con alta probabilità, e quindi rende possibile l'utilizzo del marker. La MAS è considerata particolarmente promettente per migliorare l'agro-zootecnia, facilitando l'individuazione di caratteri utili con minor costo e minor tempo) negli allevamenti partner, con l'obiettivo finale di produrre latte vaccino A2.

Da vacche inseminate rimaste incinte sono nate 534 manze. Tra queste, 238 provenienti da genitori omozigoti A2, sono stati analizzati per confermare il genotipo A2/A2, in quanto devono essere utilizzate per la produzione di un latte certificato A2. Le restanti 296 manze, nate da madri eterozigoti A2, sono state analizzate per definirne il genotipo e separare quelle omozigoti A2 negli allevamenti con il medesimo scopo.

I risultati dell'analisi effettuata su questa progenie - in termini di frequenze alleliche e genotipiche delle diverse varianti del gene CSN2 – mostrano che non vi sono deviazioni dell'equilibrio HW atteso nei siti polimorfici considerati. Nella popolazione di discendenti femmine – in seguito all'inseminazione artificiale di vacche A2 eterozigoti e omozigoti - l'analisi di sequenziamento dei prodotti della PCR del gene CSN2 ha evidenziato la presenza di quattro varianti di  $\beta$ -caseina (A1, A2, B e I) e 4 genotipi, (A2 /A2, A1/A2, A2/B, A2/I). Dopo l'applicazione del MAS sugli allevamenti partecipanti al progetto, le frequenze degli alleli A2 e I, entrambi caratterizzati da una prolina in posizione 67, sono aumentate rispettivamente dal 60,65% all'84,46% e dal 3,10% al 3,28% nella progenie rispetto alle madri.

Allo stesso tempo, le frequenze degli alleli sfavorevoli A1 e B sono diminuite rispettivamente dal 30,39% al 10,86% e dal 5,68% all'1,40%. Gli alleli A3 e C e i relativi genotipi, che erano presenti con basse frequenze nella popolazione delle madri, non sono stati ulteriormente trovati nella prole. Per quanto riguarda i genotipi, il risultato più interessante riguarda l'aumento di circa due volte della frequenza A2/A2 dal 36,96% al 68,91%. Un risultato altrettanto interessante, derivante dall'applicazione del MAS, è stata la consistente riduzione della frequenza degli animali A1/A2, dal 35,79% al 21,72%.

Le frequenze degli altri genotipi eterozigoti A2 trovati nella progenie, cioè A2/I e A2/B, variavano dal 7,55% al 2,81% e dal 3,83% al 6,55% (Tabella 2, Figura 4). È interessante notare che, poiché la variante I dovrebbe comportarsi allo stesso modo della variante A2, in termini di formazione di BMC-7, gli animali A2/I potrebbero

almeno essere utilizzati per la produzione di un latte più digeribile, anche se non potrebbero contribuire alla commercializzazione di un latte certificato A2.

In conclusione, la prima generazione delle madri genotipizzate ha prodotto un numero extra di 368 vacche A2/A2, oltre alle vacche omozigoti A2 in età riproduttiva ancora presenti negli allevamenti. Quindi, entrambi i gruppi di animali possono essere utilizzati per la riproduzione e per la relativa produzione di latte alimentare A2.

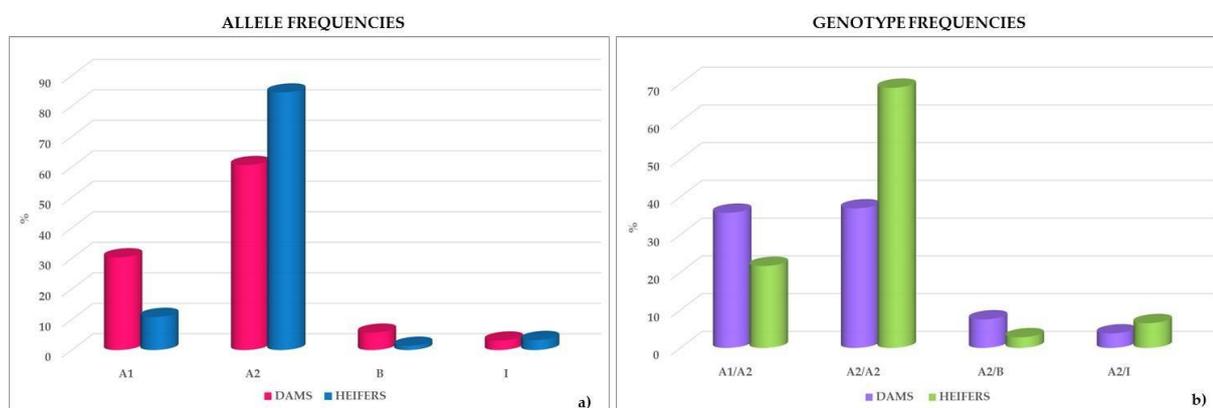
Questi dati sono molto incoraggianti perché confermano il previsto miglioramento genetico ottenuto negli allevamenti analizzati in questa indagine. L'utilizzo in futuro di sperma sessuato certificato A2/A2 potrebbe contribuire ad accelerare l'aumento del numero di femmine da destinare alla produzione di latte A2.

---

Infine, per valutare la relazione tra le azioni intraprese per la gestione della stalla e la qualità del prodotto finito – latte – nonché l'incremento della beta-caseina di tipo A2 sul latte di massa, sono state effettuate delle determinazioni ed identificazioni delle frazioni caseiniche

La determinazione delle varianti genetiche della  $\beta$  caseina sul latte è stata effettuata utilizzando come metodo l' M.I. elettroforetico con punto isoelettrico.

**Figura 4.** Grafici della variazione percentuale della frequenza allelica (a) e genotipica (b) dopo la MAS selection



**Tabella 2.** Frequenza allelica e genotipica (%) degli animali esaminati, prima e dopo la MAS selection.

Allele	Frequenza allelica (%)		Genotipi	Frequenza Genotipica (%)	
	Madri	Manze		Madri	Manze
A2	60.65	84.46	A2/A2	36.96	68.91
A1	30.39	10.86	A1/A2	35.79	21.72
B	5.68	1.40	A1/A1	9.88	/
I	3.10	3.28	A2/B	7.55	2.81
A3	0.15	/	A2/I	3.83	6.55
C	0.03	/	A1/B	3.07	/
			A1/I	2.03	/
			B/I	0.25	/
			B/B	0.18	/
			A2/A3	0.12	/
			A3/B	0.12	/
			A1/A3	0.06	/
			A1/C	0.06	/