



Unione Europea / Regione Marche
PROGRAMMA DI SVILUPPO RURALE 2014-2020
FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI



Effetto della MAS (*Marker Assisted Selection*) sulle frequenze delle varianti del gene della β -caseina nella progenie di bovine da latte allevate in Italia centrale

Arcangeli C.¹, Sebastiani C.¹, Torricelli M.¹, Ciullo M.¹, D'Avino N.¹, Cinti G.², Fisichella S.¹, Biagetti M.¹

1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche-Togo Rosati (IZSUM), Via Salvemini 1, 06126 Perugia, Italy;

2 R&D Cooperlat, Società Cooperativa Agricola, via Piandelmedico 74, 60035 Jesi (Ancona), Italy;

SUMMARY

This study aimed to analyze the genetic polymorphisms of β -casein in *Holstein-Friesian* heifers derived from already genotyped cows for selection of the A2 variant, considered a desirable trait for human health and for commercial purposes. Caseins represent about 80% of total protein content in cows' milk, about 30-35% of which is β -casein codified by *CSN2* gene located on chromosome 6. A1, A2 and B are the most common variants. A1 and B variants have a histidine at position 67 that allows an enzymatic cleavage releasing a bioactive peptide called " β -casomorphin 7" (BCM-7). On the other hand, the A2 variant contains a proline at position 67, so BCM-7 is not released. BCM-7 is known to confer to milk a minor digestibility for consumers and to be associated to various adverse health effects. Genetic selection of dairy cattle carrying the A2 variant may represent an important general goal for the entire food chain.

INTRODUZIONE

Il latte vaccino è un alimento molto importante nell'alimentazione umana, in particolare nei paesi occidentali. Circa l'80% del contenuto proteico del latte è costituito da caseine, alfa, kappa e beta-caseina, quest'ultima codificata dal gene *CSN2* localizzato sul cromosoma 6 (1). Esistono 12 varianti di β -caseina (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G), di cui solo sette (A1, A2, A3, B, C, I, E) sono state rilevate nelle razze bovine europee (1, 2; Tabella 1). Le varianti più comuni sono A1 e A2, mentre la meno comune è l'isoforma B (3). Alcune indagini scientifiche, se pur non confermate, hanno messo in luce una possibile correlazione tra il contenuto di β -caseina A1 ed alcune patologie umane. (1). Questo effetto è correlato al rilascio del peptide bioattivo " β -casomorfina 7" (BMC-7) in seguito al taglio proteolitico della β -caseina, da parte di enzimi digestivi, a livello di un residuo di istidina in posizione 67. Il consumo di latte contenente la variante A2 avrebbe invece effetti benefici (4). La variante A2 infatti presenta una prolina in posizione 67, a livello della quale non si ha il taglio enzimatico ed il conseguente rilascio di BMC-7 (1, 5, 6). La presenza di istidina in posizione 67 caratterizza anche le varianti B e C. Le varianti A3 ed I si comportano invece come la variante A2.

Il dibattito sui potenziali effetti dannosi della variante A1 rimane ancora aperto. Ciò che emerge dalla letteratura è che il latte contenente la variante A2 sia più digeribile rispetto al latte contenente la variante A1 a causa di un incremento della velocità del transito intestinale del latte A2 (5, 6). Al fine di produrre e commercializzare latte contenente esclusivamente la variante A2, è stata genotipizzata la progenie di vacche da latte, precedentemente selezionate per tale carattere (7).

MATERIALI E METODI

327 campioni di sangue in EDTA sono stati prelevati da vitelle di razza *Frisona* provenienti da stalle del centro Italia, le cui madri erano state precedentemente genotipizzate. Il DNA genomico è stato estratto mediante High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche® Life Science). Le reazioni di PCR degli esoni 6 e 7



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE
"TOGO ROSATI"



Unione Europea / Regione Marche
PROGRAMMA DI SVILUPPO RURALE 2014-2020
FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI



del gene *CSN2* sono state eseguite secondo quanto descritto in letteratura (7). I prodotti di PCR sono stati separati su gel d'agarosio al 2%, purificati con QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®) e sequenziati con BrilliantDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (NimaGen® BV) utilizzando un sequenziatore 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Le sequenze sono state allineate al gene della β -caseina bovina (X14711.1) con lo strumento ClustalW del software BioEdit v7.2.5 (8). I polimorfismi degli esoni 6 e 7 sono stati analizzati per discriminare le diverse varianti di β -caseina, calcolando poi le frequenze degli alleli e dei genotipi risultanti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'obiettivo principale del lavoro è stato quello di valutare la frequenza degli alleli del gene della β -caseina (*CSN2*) in bovine da latte di razza *Frisona*, allevate in Italia centrale. Particolare attenzione è stata rivolta alla variante A2 e alle varianti correlate, data la loro associazione con i benefici per la salute umana. La popolazione oggetto di studio è costituita da figlie di vacche già genotizzate per la selezione della variante A2 almeno in eterozigosi (7) e successivamente sottoposte ad inseminazione artificiale con seme proveniente da tori A2/A2. Di seguito sono riportati i risultati preliminari ottenuti dall'analisi della progenie delle vacche portatrici dell'allele A2 in cui è stata osservata una netta prevalenza di tale variante allelica (65%). Sono state inoltre riscontrate la variante A1 con una frequenza del 24% e le varianti I e B con frequenze dell'8% e del 3% rispettivamente (Figura 1). La frequenza allelica della variante A2 è quasi raddoppiata mentre la frequenza della variante A1 risulta dimezzata rispetto alla popolazione originaria di partenza (Figura 2). Per quanto riguarda i genotipi, abbiamo osservato una frequenza di animali A2/A2, A1/A2 e A1/A1 rispettivamente del 40%, 35% e 5% con una diminuzione di 1.5 volte per il genotipo A1/A2 e di 3 volte per A1/A1 rispetto alla popolazione originaria delle madri. Per concludere, sebbene la razza *Frisona* italiana non sia tra le razze caratterizzate dalla più alta frequenza del genotipo A2/A2 (5), essa ha mostrato una frequenza allelica sufficientemente alta da permettere un'efficace selezione genetica per questa caratteristica. La selezione di animali portatori di almeno un allele A2 ed il successivo incrocio con tori omozigoti A2 può permettere un rapido incremento della frequenza della variante A2 nelle generazioni successive.

La ricerca è stata finanziata da: Progetto Stalla 20.20—ID Progetto n. 21999—Misura 16.2-PSR Marche 2014-2020—Filiere Agro-Alimentare n. 497— Coordinator: Cooperlat Soc. Coop. Agr.



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE
"TOGO ROSATI"



Unione Europea / Regione Marche
PROGRAMMA DI SVILUPPO RURALE 2014-2020
FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI



BIBLIOGRAFIA

1. Massella E., Piva S., Giacometti F., Liuzzo G. et al. Evaluations of bovine casein polymorphism in two dairy farms located in northern. *Ital. J. Food Safety* 2017, 6, 6904
2. Barroso A., Dunner S., Cañón J. Technical note: Use of PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for detection of bovine β -casein variants A1, A2, A3, B. *J. Anim. Sci.* 1999, 77, 2629–2632
3. Farrel H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 1641–1674
4. Deth R., Andrew Clarke A., Jiayi N.J., Trivedi M. Clinical evaluation of glutathione concentrations after consumption of milk containing different subtypes of β -casein: Results from a randomized, cross-over clinical trial. *Nutr. J.* 2016, 15, 82–87
5. Canavesi, F. Selezionare per produrre latte A2. *Professione Allevatore* 2016, 16, 52–54.
6. European Food Safety Authority. Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. *EFSA Sci. Rep.* 2009, 231, 1–107.
7. Sebastiani C., Arcangeli C., Ciullo M., Torricelli M., et al. Frequencies Evaluation of β -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. *Animals* 2020 10: 252
8. Hall T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999, 41, 95–98



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE
"TOGO ROSATI"