

Relazione di progetto FINALE

Miglioramento della qualità nutrizionale e dell'immagine salutistica del latte per i contenuti in molecole funzionali ad azione prebiotica e protettiva

**ACRONIMO DEL PROGETTO:
MIQUALAT**

Monterotondo 28/01/2022

Indice

1. Progetto.....
2. Descrizione del progetto.....
3. Relazione finale del progetto.....
4. Obiettivi, benefici e criticità del progetto.....
5. Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto.....

CREA Zootecnia e Acquacoltura, Via Po' 14, 00198 Roma

1. Progetto

Dati generali

Titolo del progetto	MIQUALAT - Miglioramento della qualità nutrizionale e dell'immagine salustica del latte per i contenuti in molecole funzionali ad azione prebiotica e protettiva
Acronimo del progetto	MIQUALAT
Area strategica di intervento¹	Aumento sostenibile della produttività, della redditività e dell'efficienza delle risorse negli agroecosistemi
Linea di attività²	1.a Scelte varietali, di razza, di destinazione d'uso, miglioramento genetico mediante l'utilizzo di biotecnologie sostenibili
Settore produttivo³	a) Zootecnico;
Tipo di progetto	Bando
Riferimento del Bando/Affidamento diretto/Sportello	D.M. N. 27443 del 25/09/2018 - Selezione pubblica per progetti di ricerca in grado di sostenere, promuovere, accrescere e migliorare l'efficienza del settore latte e dei prodotti trasformati
Durata del progetto	30
Costo ammesso	238.187,13
Contributo concesso	235.805,26
Importo rendicontato	206.769,64

Soggetto proponente il progetto	Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA) - Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura	Natura giuridica Pubblico
Rappresentante legale	Buttazoni Luca c.f. BTTLCU57C20L424Y	

Coordinatore del progetto	Crisà Alessandra c.f. CRSLSN68E66H501N
----------------------------------	--

Numero di Unità Operative	2
----------------------------------	---

ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE

Unità Operativa n. 1 - Denominazione	Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA) - Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura	Natura giuridica Pubblico
Unità Operativa n. 2 - Denominazione	Università degli Studi della Tuscia - Dipartimento per la Innovazione nei sistemi biologici, agroalimentari e forestali – (DIBAF)	Natura giuridica Pubblico

2. Descrizione del progetto

Sintesi del progetto

I progressi nell'analisi della composizione del latte hanno portato all'identificazione e caratterizzazione di un gran numero di suoi componenti. L'interesse per la nutrizione e la salute umana hanno permesso di dimostrare che molti di questi componenti sono biologicamente attivi ed esercitano effetti benefici. Negli ultimi anni, la moltiplicazione di messaggi negativi relativamente all'eccessivo consumo di latte ha demonizzato l'intero settore e sollevato interrogativi sul valore nutrizionale dei prodotti caseari. Per fortuna, una serie di rilevanti studi scientifici ha dimostrato il contrario.

Obiettivo del presente progetto è di individuare animali che producano latte naturalmente arricchito in composti prebiotici bioattivi e principi protettivi. In particolare, si intende caratterizzare il latte di alcuni tipi genetici di specie bovina sia per la presenza di molecole funzionali con effetti benefici sulla salute umana e la capacità protettiva/antiossidante intrinseca, che per la minore presenza di uno zucchero con effetti potenzialmente negativi. La letteratura riporta molti studi sugli effetti dei composti in parola sulla salute umana, ma pochissimi sull'influenza del *pattern* genetico dell'animale sugli stessi composti. L'individuazione di varianti genomiche (SNP) rappresenta il primo passo per studi capaci di individuare polimorfismi e differenze di espressione genica in grado di influenzare i fenotipi oggetto di studio. L'identificazione di loci con effetti specifici sulle caratteristiche nutrizionali del latte consente una valutazione più precisa del valore genetico degli animali.

Nel presente progetto l'approccio genetico viene sviluppato attraverso una preliminare analisi di metadati integrati di genomica e trascrittomica, lo studio di geni candidati e l'applicazione di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS). Le molecole che vengono analizzate sono gli oligosaccaridi (3'-SL, 6'-SL, DSL), gli acidi sialici ((Neu5Ac e Neu5Gc) e due agenti antiossidanti (acido α -lipoico e glutazione). Gli oligosaccaridi sono zuccheri costituiti da 3 fino a 10 monosaccaridi legati in modo covalente attraverso legami glicosidici e sono sintetizzati nella ghiandola mammaria. Dal punto di vista metabolico gli oligosaccaridi transitano non digeriti attraverso il piccolo intestino e arrivano nel cieco e nel colon, dove vengono utilizzati dalla flora microbica svolgendo attività prebiotica. Gli oligosaccaridi possono anche agire come analoghi di recettori, inibendo l'attaccamento di microrganismi dannosi alla mucosa del colon e si comportano come immunomodulatori. Inoltre l'acido sialico degli oligosaccaridi sialilati del latte può essere assorbito ed utilizzato come precursore per la biosintesi dei gangliosidi cerebrali e delle sialo-glicoproteine. La concentrazione degli oligosaccaridi è maggiore nel colostro rispetto alla successiva lattazione e le molecole maggiormente rappresentate nel latte dei bovini sono 3'-SL e 6'-SL. In letteratura si trovano diversi studi che analizzano la composizione oligosaccaridica del colostro e del latte nei bovini, mentre esiste un solo lavoro che valuta la variabilità genetica degli animali ai fini della biosintesi di oligosaccaridi. Questo progetto vuole valutare la concentrazione di queste molecole bioattive in alcune razze bovine al fine di studiarne le differenze. Inoltre è prevista un'indagine sia a livello del genoma che del trascrittoma per individuare loci genici, varianti alleliche e geni differenzialmente espressi tra tipi genetici e momenti della lattazione. I risultati ottenuti permetteranno di ampliare le conoscenze relative ad un argomento molto interessante ma ancora poco studiato dal punto di vista della genetica dell'animale, e forniranno indicazioni che potranno essere sfruttate ai fini del miglioramento genetico per caratteristiche "naturalmente" salutari del latte.

Gli acidi sialici (Neu5Ac e Neu5Gc) hanno un ruolo fondamentale nelle interazioni cellula-cellula e microambiente cellulare, nella stabilizzazione di molecole e membrane tramite carica negativa e idrofilia, ed inoltre hanno funzioni recettoriali. Il genere umano si differenzia dagli altri mammiferi perché nel corso dell'evoluzione ha perso la capacità di sintetizzare Neu5Gc, a causa di una delezione inattivante del gene CMAH che codifica una idrossilasi che converte il Neu5Ac in Neu5Gc. Tuttavia, nelle cellule di tessuti umani sono normalmente presenti molecole di Neu5Gc certamente di provenienza esogena, da fonti alimentari quali carne e latte. La presenza di anticorpi anti Neu5Gc è un esempio di reazione immunitaria verso una molecola estranea che funziona come "xeno-autoantigene". L'interazione tra Neu5Gc e anticorpo anti Neu5Gc sembra indurre uno stato di infiammazione cronica, denominata "xenosialite" che produce effetti avversi sulla salute umana. Quindi, gli acidi sialici hanno un ruolo funzionale positivo nel caso del Neu5Ac ma negativamente infiammatorio nella variante Neu5Gc. Nel latte e nei prodotti lattiero caseari gli acidi sialici sono normalmente presenti come glicococoniugati (glicoproteine, glicolipidi e lipopolisaccaridi) e raramente sono in forma libera. Durante la digestione, gli acidi sialici legati alle membrane cellulari vengono resi liberi e facilmente assorbibili, quindi la quasi totalità del Neu5Gc presente può essere assorbito a livello intestinale. Anche se la componente di acido sialico presente nel latte è in massima parte costituita dall'acido Neu5Ac, è comunque importante quantificarne la concentrazione nel latte, sia allo stato legato che libero, della forma Neu5Gc. Lo studio del contenuto di Neu5Gc nel latte di diverse razze bovine ed una possibile associazione con la variabilità genotipica delle stesse al locus implicato potrebbe rappresentare un primo step per la produzione di latte con limitato contenuto di Neu5Gc ed quindi con un aumentato valore salutistico.

Il latte contiene una vasta gamma di molecole antiossidanti, alcune di origine alimentare legate alla dieta ingerita, principalmente se a base di foraggio fresco, e altre di origine endogena dovute alla capacità dell'animale di produrre queste molecole nel fegato e trasferirle sia nella carne che nel latte. Pochi studi riportano il contenuto di antiossidanti endogeni e tioli in matrici animali come latte e siero di latte. In particolare, il glutatione (GSH) appartiene alla classe dei tioli a basso peso molecolare, molecole altamente reattive, massicciamente coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi redox cellulare. Questi peptidi bioattivi a basso peso molecolare insieme alla vasta gamma di peptidi del latte sono stati identificati come potenziali ingredienti di alimenti funzionali che promuovono la salute e interverrebbero nelle malattie croniche legate all'alimentazione, ovvero l'obesità, malattie cardiovascolari, diabete ecc. Tra i gruppi tiolici da tenere in considerazione oltre al glutatione vi è l'acido alfa lipoico, molecola essenziale per il funzionamento di molti enzimi. L'acido lipoico presenta molteplici funzioni: svolge attività antiossidante, è un modulatore di trasduzione del segnale in importanti *pathways* (insulina

CREA Zootecnia e Acquacoltura, Via Po' 14, 00198 Roma

e fattore nucleare κB (NF κ B)) ed è riduttore dello stress ossidativo. Studi riguardanti la sua funzionalità rivelano la sua capacità di inibire lo sviluppo di aterosclerosi e il progressivo sviluppo delle placche. L'acido lipoico è una sostanza presente in natura, si trova comunemente nei vegetali e nella carne, e di recente se ne studia la presenza nel latte, dove è associato alle membrane dei globuli di grasso e la sua concentrazione è sufficiente per giocare un ruolo significativo nell'ossidazione di gruppi solfidrilici attivati. Queste determinazioni permetteranno di avere un quadro chiaro sulla capacità del latte di resistere all'ossidazione e di contrastare la formazione di radicali liberi. Inoltre, i due composti, glutatione e acido lipoico, sono strettamente legati alla genetica dell'animale e rappresentano le sostanze antiossidanti più attive in natura con valenza nutraceutica per l'uomo in particolare a livello intestinale.

L'intero progetto si basa sull'utilizzo di diverse razze bovine da mettere a confronto relativamente alla determinazione delle molecole bioattive analizzate nel latte. In particolare, il disegno sperimentale prevede l'utilizzo della mandria di bovini da latte basata sull'incrocio a rotazione delle razze Frisona (FI) e Pezzata Rossa (PRI) presente nella sede di Monterotondo del Centro di Ricerca Zootecnia e Acquacoltura del CREA. Tale mandria è stata costituita nell'ambito del progetto "REDDBOV", finanziato dal MIPAAF con DM 19735/7303/12 al fine ultimo di studiare il fenomeno dell'eterosi. Nell'attuale progetto vengono considerati 25 animali per ogni gruppo (Frisone in purezza, Pezzate Rosse in purezza, Incroci F1). Sono anche utilizzati come "outgroup" 25 animali della Podolica, razza bovina allevata al pascolo dalle grandi capacità adattative che unisce ad elevate rusticità e frugalità, la spiccata attitudine materna che si esprime attraverso la facilità di parto e la capacità di provvedere alla cura, allattamento e difesa del vitello.

Sono previsti 2 campionamenti di latte ai giorni 60 e 120 di lattazione di ciascuna vacca per lo svolgimento delle analisi previste.

Le attività del progetto si articolano in 5 WP di seguito specificati: WP1: Coordinamento, WP2: Analisi bioinformatiche e statistiche, WP3: Analisi genetiche e statistiche, WP4: Analisi dei fenotipi, WP5: Divulgazione dei risultati.

3. RELAZIONE FINALE DI PROGETTO

Relazione tecnico-scientifica del coordinatore

Data inizio progetto 16-04-2019, data fine progetto 16/10/2021. CUP: C54I19000370006

Nel corso dei due anni e mezzo del progetto sono state svolte tutte le attività di ricerca programmate e sono stati raggiunti gli obiettivi specifici previsti. Sia le risorse umane che finanziarie sono state impiegate in modo ottimale al conseguimento degli obiettivi stabiliti.

Nel periodo di riferimento si è proceduto alla indizione dei 4 bandi per assegni di ricerca previsti:

1. Tematica: studio degli effetti genetici sulle caratteristiche nutraceutiche del latte di diverse razze bovine. La procedura è stata conclusa il 07/02/2020
2. Tematica: quantificazione di molecole traccia nel latte di diverse razze bovine. La procedura è stata conclusa il 07/02/2020
3. Tematica: analisi Bioinformatiche di metadati e di dati genetici (genotipizzazione e sequenziamento) per la valutazione della qualità nutrizionale e salutistica del latte. La procedura è stata conclusa il 28/02/2020.
4. Tematica: sulla seguente tematica "Quantificazione di oligosaccaridi specifici nel latte proveniente da differenti razze bovine". La procedura è stata conclusa il 31/03/2020.

Una piccola parte delle analisi bioinformatiche oggetto del WP2 è stata argomento della tesi di laurea di Emanuele Tufarini nell'ambito del corso di laurea in biotecnologie (classe L-2) presso il dipartimento DIBAF dell'Università degli Studi della Tuscia, anno accademico 2018/19.

Titolo della tesi: "Molecole funzionali ad azione antiossidante e prebiotica nel latte bovino: analisi bioinformatica di banche dati pubbliche"



Una piccola parte delle analisi oggetto del WP4 è stata argomento della tesi di laurea di Matilde Giombolini nell'ambito del corso di laurea in biotecnologie (classe L-2) presso il dipartimento DIBAF dell'Università degli Studi della Tuscia, anno accademico 2019/20.

Titolo della tesi: "La sostenibilità dell'allevamento di vacche da latte: esempio della razza Podolica"

Nel corso dei due anni e mezzo di progetto sono intercorsi con il Ministero i seguenti scambi di documenti, comunicazioni e richieste:

- a) Invio del CUP di progetto (02/07/2019)
- b) Invio della Relazione scientifica e Rendicontazione economica del 1° anno di attività (10/06/2020)
- c) Invio della comunicazione di modifiche minori rese necessarie relativamente ad alcune quantità e tipologie di materiale di consumo e ad alcune tempistiche di progetto (30/06/2020)
- d) Invio della richiesta di proroga di 6 mesi del progetto (29/12/2020)
- e) Accettazione della proroga di progetto al 16/10/2021 da parte del Ministero (15/01/2021)
- f) Invio della richiesta di variazioni all'interno di alcune voci di costo del progetto (09/03/2021)
- g) Accettazione delle richieste di variazioni da parte del Ministero (19/03/2021)
- h) Invio di una richiesta di variazione non specificata correttamente nell'invio del 09/03/2021 (presidi di sicurezza) ed accettata tramite comunicazione telefonica.

Alle attività di progetto hanno preso parte alcuni gruppi di lavoro del CREA-ZA (sede di Monterotondo e Bella) e il gruppo di lavoro del Dipartimento per la Innovazione nei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF) dell'Università degli studi della Tuscia.

Nel corso dei 2 anni e mezzo del progetto si sono dovute affrontare una serie di difficoltà operative (vedere sezione 5) che sono state superate ed è stato quindi possibile raggiungere tutti gli obiettivi programmati ed i risultati previsti.

Il progetto ha previsto una divisione della attività in 5 pacchetti di lavoro presentati nello schema seguente (Fig.1):



Fig. 1 Schema di progetto

Si riportano di seguito l'elenco dei WPs e delle attività di ricerca come riportate nel progetto:

WP1: Coordinamento

WP2: Analisi bioinformatiche e statistiche

- 2.1 Analisi dei metadati presenti nelle banche dati
- 2.2 Analisi dei risultati degli esperimenti di trascrittomico

WP3: Analisi genetiche e statistiche

- 3.1 Genotipizzazione (singoli SNPs) o sequenziamento
- 3.2 Associazione tra singoli polimorfismi e fenotipi rilevati nel latte
- 3.3 Espressione genica

WP4: Analisi dei fenotipi

- 4.1 Disegno sperimentale e campionamento
- 4.2 Quantificazione degli oligosaccaridi nel latte (3'-SL, 6'SL, DSL)
- 4.3 Quantificazione degli acidi sialici nel latte
- 4.4 Quantificazione dell'acido lipoico e glutatione nel latte

WP5: Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati

Le analisi bioinformatiche e statistiche previste nel WP2 e WP3 e successive elaborazioni sono state svolte in stretta collaborazione tra il gruppo di lavoro di genetica del CREA ed il DIBAF. È importante sottolineare come alcuni dei risultati ottenuti nell'attività 2.1 siano stati utilizzati nelle attività 2.2, 3.1, 3.2 e come i risultati dell'attività 3.3 abbiano costituito l'input per le analisi svolte in 2.2. Inoltre, i risultati delle analisi sui fenotipi (4.2, 4.3, 4.4) siano stati utilizzati per le analisi svolte in 2.2, 3.2, 3.3).

Nei seguenti paragrafi verranno sinteticamente descritte le attività svolte nei singoli WPs ed i risultati ottenuti. Poiché sarebbe riduttivo condensare i molteplici risultati ottenuti dal progetto in 10 pagine, si allegano alla presente relazione i documenti .pdf relativi ai risultati presentati durante il convegno finale di progetto svoltosi il 13/10/2021. Alcune di queste presentazioni sono state divise in due parti per dare continuità alla tematica; nella prima parte sono state descritte le proprietà delle molecole analizzate ed i risultati delle analisi sul latte, nella seconda parte sono stati descritti i risultati delle analisi genetiche.

Alla presente relazione si allegano altresì due documenti relativi all'ANALISI SWOT ed al GANTT di progetto

WP1: COORDINAMENTO

- Il coordinatore ha sempre assicurato la comunicazione sia verso il Ministero che verso i partner ed ha monitorato lo stato di avanzamento dei lavori sia dal punto di vista scientifico che amministrativo
- Tramite *e-mail* sono stati trasmessi documenti amministrativi e sono state fornite indicazioni sulle date di campionamento mensili pianificate ed organizzate dal coordinatore. Il coordinatore ha continuato ad occuparsi delle registrazioni dei dati riproduttivi della mandria e questo ha permesso una gestione più diretta e semplificata delle fasi organizzative.
- Tramite la creazione di cartelle di lavoro in *Google Drive* sono stati condivisi i documenti di progetto, la bibliografia, i risultati delle analisi.
- In data 20/09/2019 è stato organizzato il **kick-off meeting** durante il quale sono state presentate le attività da parte dei vari gruppi di lavoro ed alcuni dati preliminari relativamente ad alcune analisi svolte sui campionamenti effettuati fino ad allora. Sono state inoltre definite e condivise alcune priorità di azione sulle future attività.

- Non è stato possibile organizzare la riunione in presenza di metà progetto poiché purtroppo tale periodo è coinciso con le difficoltà incontrate da tutto il sistema paese per l'emergenza Covid-19 e con il blocco degli spostamenti e la sospensione di riunioni e meeting. E' stata organizzata una **riunione skype nel mese di maggio 2020** per verificare le attività svolte dai vari gruppi nell'ambito dei WPs di lavoro.
- Non è stato possibile organizzare incontri scientifici in presenza nel corso del progetto dato il perdurare dello stato di emergenza ed alle modalità di lavoro agile.
- È stata data ampia visibilità al progetto mediante il sito istituzionale ed agenzie di stampa.
- È stato definito il logo di progetto (Fig.2).
- E' stato organizzato il **convegno di fine progetto** tenutosi presso il CREA -ZA sede di Monterotondo in data 13/10/2021



Fig. 2 Logo di progetto

WP2: ANALISI BIOINFORMATICHE e STATISTICHE

2.1: Analisi dei metadati presenti nelle banche dati (vedere allegato 1, pag 1-18)

L'attività del WP2 si è concentrata sulla creazione di programmi bioinformatici per accedere, in modo facile e intuitivo, a diverse banche dati e ottenere le informazioni necessarie per lo studio delle molecole funzionali presenti nel latte. L'obiettivo finale è di identificare, per ogni composto, eventuali geni noti o candidati implicati nella biosintesi di composti prebiotici e protettivi.

Sono stati creati programmi, scritti nel linguaggio di programmazione *Python* (*open-source*), per accedere i) alle informazioni bibliografiche contenute nel database *PubMed* e ii) ai dati metabolomici contenuti nel database *KEGG*. Per rendere l'uso di questi programmi più facile anche a utenti non esperti, si è deciso di utilizzare *Google Colaboratory* (*Google Colab*), un ambiente messo a disposizione gratuitamente a fini di ricerca da *Google* e basato su *Jupyter Notebook*. In particolare, in *Google Colab* è possibile creare un *notebook*, all'interno del quale è presente il programma insieme a delle istruzioni. Il programma può essere eseguito in modo interattivo dall'utente direttamente online, non utilizzando quindi le risorse del proprio *computer*. Dalla creazione di *Jupyter Notebook* nel 2015, il numero di citazioni e l'uso dei *notebooks* nelle pubblicazioni scientifiche è aumentato.

Per quanto riguarda l'accesso alle informazioni bibliografiche contenute nel database *PubMed* è possibile ricercare parole chiave (*keyword*) all'interno e/o nel titolo dell'articolo. Gli articoli corrispondenti ai criteri di ricerca vengono elencati e le informazioni necessarie per l'identificazione fornite. È possibile inoltre visualizzare a schermo gli articoli desiderati. Con questo programma è possibile identificare gli articoli collegati alle molecole oggetto di studio e identificare composti, enzimi o geni associati.

Per quanto riguarda l'accesso ai dati metabolomici contenuti nel database *KEGG* è possibile ricercare parole chiave all'interno dei diversi database di *KEGG* (es: *pathway*, "*<org>*", *compound*, *enzyme*, *genes*, etc.) per ritrovare i codici *KEGG* d'interesse. Per ogni codice è possibile recuperare le informazioni relative allo stesso e le relazioni con le altre entry del database *KEGG* (i.e. *pathway*, componenti, geni, etc.). È stata inoltre inclusa una sezione apposita per l'analisi delle *pathway* presenti in *KEGG*. Per ogni tipo di ricerca è possibile produrre diversi tipi di file di *output*, come ad esempio immagini, sequenza amminoacidica o nucleotidica, lista di geni o enzimi, etc. In modo specifico per le *pathway* è possibile produrre immagini utilizzando il pacchetto di *R* *KEGGgraph*.

Il programma sviluppato è stato utilizzato per identificare i geni direttamente associati

Utilizzando i due strumenti creati, sono state eseguite ricerche specifiche per identificare geni associabili e/o relazionati alle *pathway* relative alle molecole funzionali, nella specie di interesse.

Le informazioni sono state quindi incluse in un *graph database*, costruito usando il software *Neo4j*.

Le relazioni tra i geni inclusi nella *pathway* sono state rappresentate in forma grafica, così risulta più facile identificare i geni più strettamente collegati al gene di interesse.

Il database è stato implementato con il notebook per l'importazione delle informazioni relative ai geni, utilizzando il database "Ensembl", in particolare attraverso l'uso di "BioMart".

La facilità d'uso dei *notebook* è stata particolarmente curata, grazie a strutture predefinite che consentono un accesso alle informazioni del database semplice e veloce.

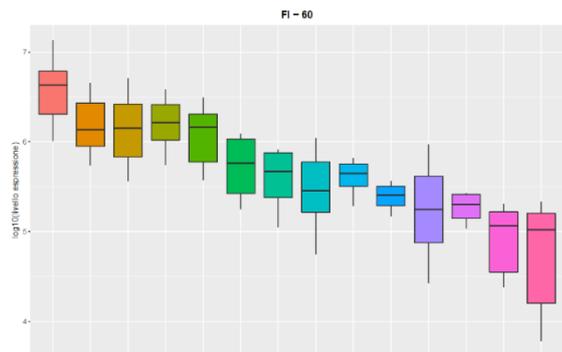
Nel database sono contenute quindi informazioni riguardanti le pubblicazioni (e tutte le informazioni relative, quali la tecnica utilizzata, le razze bovine coinvolte, etc.), geni (o in generale *feature* genomiche), varianti e informazioni biologiche (quali *pathway* o composti associati a un determinato gene). In questo modo, anche attraverso l'uso di parole chiave (*tag*), è possibile identificare connessioni tra composti di interesse e informazioni biologiche.

2.2: Analisi dei risultati degli esperimenti di trascrittomico (vedere allegato 2)

Questa attività ha riguardato l'analisi dei dati di sequenziamento dell'RNA ottenuti in 3.3.

I dati di sequenziamento sono stati ottenuti dalla ditta IGA di Udine alla fine del mese di luglio 2021 in seguito ai ritardi che si sono accumulati dovuti a cause non dipendenti dai gruppi di lavoro e giustificati nella sezione 5. Si è comunque riusciti ad analizzare i dati entro la fine del progetto (16 ottobre 2021). Si deve considerare che i risultati delle analisi di un sequenziamento

NGS possono essere molteplici considerando sia i software e metodologie che si possono utilizzare, che le condizioni sperimentali/fenotipi a confronto. Di seguito vengono riportate le analisi ed i risultati raggiunti; alcuni "output" delle analisi sui dati RNAseq hanno costituito l'"input" per la validazione dei geni in qPCR presentati nell'attività 3.3.



I 60 campioni scelti in 3.3 sono stati sequenziati ad alta profondità con una media di 42 milioni di paired/reads a campione. Sono stati effettuati i controlli di qualità sulle reads (software Trimmomatic) che sono state quindi allineate alla sequenza di riferimento di bovino (ARS-UCD v1.2) (software STAR). L'analisi del livello di espressione dei geni la matrice con il numero di reads per trascritto è stata ottenuta usando il software StringTie e la matrice delle conte è stata normalizzata utilizzando il pacchetto di R Deseq2. I geni più espressi identificati nelle diverse razze e nei due momenti di lattazione sono in linea con i risultati riportati in bibliografia e sono relativi ad esempio alle caseine, proteine del siero, acidi grassi. Si riporta un esempio dei geni maggiormente espressi (termine tecnico: upregulated) nella razza Frisona a 60 giorni (Fig. 3)

Fig. 3 Geni più espressi a 60 giorni nella Frisona

I gruppi di campioni (vedere tabella 2, WP3, attività 3.3) sono stati quindi analizzati per identificare i geni differenzialmente espressi (DEGs) mediante il software DeSeq2 e sono stati effettuati diversi confronti a coppie per identificare i geni associati alla condizione di contenuto di oligosaccaridi "alto" o "basso". Poiché gli oligosaccaridi analizzati nel progetto contengono molecole di acido sialico vengono definiti come sialiloligosaccaridi (SOS).

Nelle analisi sono stati utilizzati test statistici e correzioni per test multipli per verificare se le differenze trovate in termini di espressione genica tra i gruppi utilizzati fossero variazioni biologiche effettive o dovute al caso (valori di False Discovery Rate). Le analisi sono state effettuate sia considerando il dataset completo di 27607 geni (possibilità di identificare possibili nuovi geni associati alla condizione) che una lista di 134 geni candidati associati al metabolismo dei SOS.

Tra i vari confronti effettuati, considerando le razze ed i momenti di lattazione, 2 test hanno fornito risultati incoraggianti. Nel primo test (test6) sono stati confrontati campioni di latte di Pezzata Rossa "alti" e "bassi" a 60 giorni, nel secondo (test 11) sono stati confrontati campioni di latte di Meticcina a 60 giorni con oligosaccaridi "alti" con campioni a 120 giorni con oligosaccaridi "bassi"; entrambe le analisi hanno mostrato che alcuni dei DEG identificati o a livello della lista di geni totale o dei geni candidati sono collegati al metabolismo dei SOS, in particolare alla sintesi e trasporto del lattosio (es. *UGP2*, *LALBA*, *B4GALT1*, *CMPK1*, *SLC2A9*), alla sintesi dell'acido sialico (es. *CMAS*, *GNE*), al trasferimento degli acidi sialici su oligosaccaridi (es. *ST3GAL4*, *ST3GAL5*, *ST3GAL6*, *ST6GAL1*).

Nelle analisi effettuate considerando il dataset completo di 27607 geni sono stati identificati 295 DEG nel primo test e 794 DEG nel secondo test di cui 268 e 439 upregolati rispettivamente, nella condizione di oligosaccaridi "alti". Con le liste dei DEG sono state effettuate ulteriori analisi funzionali per identificare i processi biologici in cui tali geni sono principalmente coinvolti. A tal fine è stato utilizzato il tool bioinformatico DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) che per le analisi di "arricchimento" utilizza fino a 40 categorie di annotazione, tra cui anche i termini di Gene Ontology (GO) e le pathways (KEGG). Le analisi funzionali permettono di raggruppare geni che sono collegati tra di loro funzionalmente e che possono contribuire a creare network biologici. E' possibile modificare i parametri di analisi ed i molteplici risultati vengono presentati come tabelle da cui si evince anche il loro significato statistico. Le singole analisi di GO e KEGG sui DEG del test 6 hanno mostrato alcuni risultati di arricchimento statisticamente significativo. L'analisi più completa con altre categorie di annotazione (Functional Annotation Chart tool) ha identificato 157 termini biologici associati con i DEG. Nella figura 4 sono riportati solo i termini più rilevanti (con il numero dei geni in ciascuno di essi) con un FDR < 0,05. Alcuni di questi termini corrispondono a categorie relative allo spazio extracellulare ed a composti glicosilati. Le stesse analisi effettuate sui DEG del test 11 hanno mostrato risultati differenti in quanto le categorie funzionali più rappresentate erano relative ad interazioni cellulari e risposta immunitaria. Per motivi di spazio non è possibile riportare grafici e tabelle relativi a tutte le analisi effettuate.

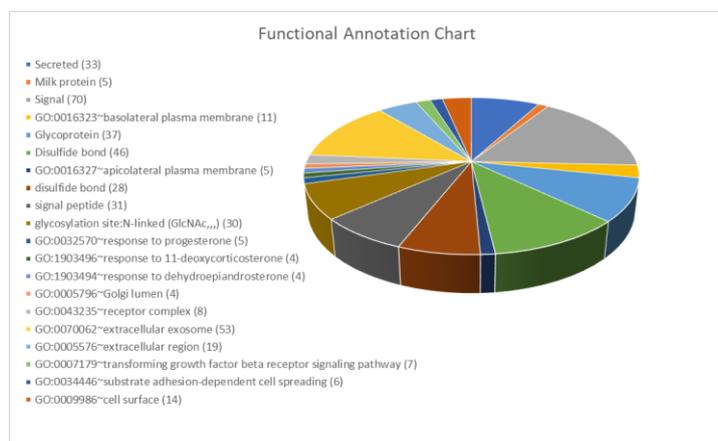


Fig. 4 Functional Annotation Chart del Test 6

WP3: ANALISI GENETICHE e STATISTICHE

Per tutte le attività previste in questo WP è stata necessaria l'estrazione del DNA e dell'RNA dalle cellule somatiche del latte campionato come da disegno sperimentale (vedere 4.1)

- La prima parte delle procedure per l'estrazione del DNA e dell'RNA è uguale e prevede l'utilizzazione di tamponi e centrifugazioni al fine di ottenere il pellet di cellule somatiche. Il pellet ottenuto è stato congelato a -20° per la successiva estrazione del DNA ed è stato risospeso in un reagente appropriato e congelato a -80°C per la successiva estrazione dell'RNA. Il DNA è stato estratto previa utilizzazione del kit Wizard(R) Genomic DNA Purification (Promega) mentre l'RNA totale è stato estratto utilizzando il TripleXtractor direct RNA kit Grisp (Bio-Cell) seguendo le raccomandazioni dei produttori. Le quantità e qualità dei campioni di DNA e RNA estratti e purificati sono state determinate mediante dosaggio spettrofotometrico (NanoPhotometer™ Pearl, Implen GmbH, Monaco, Germania) e fluorimetrico (Quantifluor, promega); per l'RNA è stata effettuata un'analisi in microfluidica per la valutazione del RIN (RNA integrity number) (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). I campioni di DNA sono stati conservati a -20°C quelli di RNA a -80 °C.
- Le analisi genetiche svolte in questo WP sono state svolte seguendo tre approcci: a) sono stati studiati geni candidati specifici associati alle molecole funzionali di interesse; b) è stato analizzato l'intero genoma mediante genotipizzazione con SNPs array:
 - a) L'attività 2.1 ha fornito liste di geni candidati (associati ai diversi fenotipi studiati nel progetto) tra i quali ne sono stati scelti alcuni per analisi più specifiche. In particolare, si è scelto di analizzare il cDNA piuttosto che il DNA per un'ottimizzazione sia temporale che economica. Lo studio del cDNA, ottenuto dall'mRNA, permette infatti di sequenziare l'intera regione codificante comprensiva di tutti gli esoni mentre l'analisi sul DNA avrebbe comportato la necessità di amplificare più regioni geniche. Inoltre, poiché si parte da mRNA si lavora su trascritti espressi nella condizione esaminata;
 - b) Si è scelta questa strategia perché alcuni animali erano stati in precedenza genotipizzati in altri progetti (tra cui REDDBOV) con altri SNPs array e quindi si volevano utilizzare dati disponibili ed aumentare le numerosità al fine di rendere i risultati più robusti.

3.1 Genotipizzazione (singoli SNPs) o sequenziamento

a) L'attività di ricerca si è focalizzata sullo studio dei seguenti geni candidati per la biosintesi di molecole funzionali presenti nel latte: beta-1,4-galattosiltransferasi 1 (*B4GALT1*) e alfa lattalbumina (*LALBA*) per il lattosio, citidina monofosfato-N-acetilneuraminato idrossilasi (*CMAH*) per gli acidi sialici acido N-acetilneuraminico (Neu5Ac) e acido N-glicolil neuraminico (Neu5Gc), beta-galattoside alfa-2,3-sialiltransferasi 4 (*ST3GAL4*), beta-galattoside alfa-2,3-sialiltransferasi 5 (*ST3GAL5*), beta-galattoside alfa-2,3-sialiltransferasi 6 (*ST3GAL6*) per il 3'-sialillattosio (3'-SL), beta-galattoside alfa-2,6-sialiltransferasi 1 (*ST6GAL1*) per il 6'-sialillattosio (6'-SL), alfa-N-acetil-neuraminide alfa-2,8-sialiltransferasi 2 (*ST8SIA2*), alfa-N-acetil-neuraminide alfa-2,8-sialiltransferasi 3 (*ST8SIA3*), alfa-N-acetil-neuraminide alfa-2,8-sialiltransferasi 5 (*ST8SIA5*) per il disialillattosio (DSL), acido lipoico sintetasi (*LIAS*) per l'acido lipoico.

- È stata effettuata, per ciascun gene studiato, una ricerca in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) e in Ensembl (https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index), per valutare e comparare i trascritti di ciascun gene al fine di poter lavorare con delle sequenze di riferimento. I primers per le amplificazioni su cDNA sono stati disegnati utilizzando il software Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). La sequenza codificante completa di ciascun gene è stata ottenuta unendo quella di uno o più ampliconi, a seconda della lunghezza del cDNA di interesse.
- Sono stati selezionati 10 animali per ciascuna delle 4 razze considerando il campionamento a 120 giorni ed è stato estratto l'RNA dai campioni conservati a -80°C. La sintesi del cDNA a partire dall'RNA totale è stata effettuata utilizzando il Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) seguendo le raccomandazioni del produttore. Sul cDNA così ottenuto sono state effettuate delle amplificazioni preliminari su 3 campioni per definire le condizioni ottimali di reazione, per validare i primers e per identificare correttamente l'amplicone atteso mediante sequenziamento. Successivamente le amplificazioni sono state effettuate su tutti i campioni selezionati per identificare eventuali SNPs. Gli ampliconi ottenuti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio per verificarne la dimensione e successivamente purificati usando il Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) o il DANAGENE GEL/PCR KIT (Bio-Cell srl Ltd) e sequenziati su entrambi i filamenti di DNA presso un servizio di consulenza esterno (Microsynth, Carlo Erba). L'elaborazione, l'analisi e l'allineamento degli output del sequenziamento, per cercare polimorfismi nei geni candidati, sono stati effettuati mediante l'utilizzo dei software Chromas (Technelysium Pty Ltd, Australia), MEGA X (Kumar et al., 2018) e BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- Poiché in alcuni casi le amplificazioni hanno mostrato bande di bassa intensità si è proceduto con il clonaggio mediante l'utilizzazione del kit pGEM® -T Easy Vector System II. L'estrazione del DNA plasmidico dai cloni positivi è stata effettuata mediante utilizzazione del kit Pure Yield Plasmid Miniprep. Il DNA ottenuto è stato sequenziato per verificare la specificità dei trascritti.
- In totale, per i 10 geni studiati sono stati disegnati primers per 30 ampliconi. In alcuni casi è stata ottenuta l'intera sequenza codificante, in altri casi una sequenza parziale. Per il gene *ST3GAL4* è stato identificato un trascritto più corto (780 bp) mancante dell'esone 7 la cui sequenza è stata depositata in GenBank con l'identificativo MZ 522781. Per il gene *ST6GAL1* è stato identificato un trascritto più corto (943 bp) mancante dell'esone 3 la cui sequenza è stata depositata in GenBank con l'identificativo MZ 522780. Per il gene *LALBA* è stato identificato un trascritto più lungo (1246 bp) in cui è presente l'introne 1. Sono stati identificati SNPs presenti in banca dati: per *B4GALT1* rs110112208 (regione 3'UTR), per *CMAH* rs210697833 (regione 3'UTR), per *ST6GAL1* rs440366763 (regione 3'UTR), per *ST3GAL4* rs42184639 (mutazione sinonima nel 3° esone), rs208302929 (regione 3'UTR), rs209522477 (regione

3°UTR). Sono state calcolate le frequenze alleliche che presentano delle piccole variazioni tra le razze anche considerando il basso numero di animali analizzati (vedere allegato 3, pag. 1-14).

b) Il DNA di 61 animali (9 FI, 5 M, 14 PR, 32 POD) è stato genotipizzato da una ditta esterna (Neogene) mediante utilizzazione dello SNP array GeneSeek Genomic Profiler Bovine 150K Dairy Chip. Sui dati grezzi sono stati effettuati i controlli di qualità (call rate, MAF) ed estratti i 37253 SNPs in comune tra i diversi array. In tutto, per le successive analisi sono stati utilizzati i genotipi di 113 animali di cui 26 FI, 27 M, 30 PR e 30 POD.

L'analisi di PCA e Admixture ha mostrato come le quattro razze siano distanti geneticamente tra di loro (vedere allegato 1 pag. 19-23)

3.2 Associazione tra singoli polimorfismi e fenotipi rilevati nel latte

a) E' stata utilizzata una procedura statistica GLM (software Statistica 12), per mettere in associazione i genotipi per i vari SNPs nei geni candidati con le quantità di SOS e di acidi sialici presenti nel latte. Nel modello come effetti fissi sono stati considerati: razza, lattazione, stagione; come covariate sono state considerate: produzione latte, % grasso, %proteine, lattosio, log₁₀ SCC (somatic cell count). E' stata effettuata una correzione a posteriori con il Test di Tukey per confermare la significatività statistica delle analisi.

Risultati interessanti sono stati messi in evidenza per il genotipo GG dello SNP rs210697833 del gene CMAH per una maggiore quantità di acido sialico Neu5Ac e 3' SL, e per i genotipi GG dello SNP rs 42184639, CC dello SNP rs208302929 e TT dello SNP rs209522477 nel gene ST3GAL4 con una maggiore quantità di 3'-SL.

FENOTIPO	B4GALT1 rs110112208				CMAH rs210697833				ST6GAL1 rs440366763				ST3GAL4 rs 42184639				ST3GAL4 rsrs208302929				ST3GAL4 rs209522477										
	GG	GA	AA		AA	AG	GG		CC	CG	GG	TT	CC	CT	TT		CC	CT	TT												
Neu5Gc									1,2 ^b	0,3	2,1 ^A	0,2					1,5 ^{bc}	0,2	1,9 ^A	0,2	1,4 ^{bc}	0,3	1,8 ^a	0,2	1,25 ^b	0,5	1,84 ^a				
Neu5Ac					36,3 ^{bc}	8,2	21,6 ^{bc}	16	51,6 ^a	11																					
3'-SL	63,8 ^b	3,7	59,6 ^c	4	71,5 ^A	5,7	61,5 ^a	4,1	52,5 ^b	7,9	80,9 ^{ab}	5,5					69,6 ^A	3,7	60,3 ^B	5,7	75,8 ^A	4	65,8 ^B	4,3	53,2 ^B	6,4	57,8 ^b	4,0	55,9 ^b	8,6	81,2 ^a
6'-SLN	3,5 ^a	1,3	4,4 ^{bc}	1,4	5,3 ^b	2																									

Tab.1 Risultati dell'associazione tra SNPs nei geni candidati e molecole funzionali

b) Per quanto riguarda le associazioni "genome wide" con i vari fenotipi rilevati nel progetto, sono state effettuate le analisi descritte nell'allegato 1, pag. 23-29. Brevemente, oltre all'approccio GWAS sull'intero genoma è stato adottato un approccio che prevedeva l'utilizzazione di liste di geni candidati ottenute utilizzando il Database MIQUALAT (2.1). Sono stati eseguiti i controlli di qualità sui genotipi e i fenotipi prima di ogni analisi e sono state effettuate correzioni per campioni multipli (false discovery rate, FDR). E' stata eseguita anche un'analisi funzionale sui risultati ottenuti che hanno mostrato come i geni identificati siano collegati con la biologia e la funzionalità delle molecole studiate. Questi segnali genetici sono molto utili al fine di identificare varianti che potranno essere adottate nei programmi di selezione assistita da marcatori (MAS). Inoltre, sarà possibile effettuare l'upgrade dei marcatori utilizzabili per le analisi, mediante imputazione dei risultati di genotipizzazione a 150K.

I risultati delle varie analisi di associazione sono stati presentati nel corso del convegno finale. Per ogni tematica sono stati prima presentati i risultati ottenuti per i fenotipi e poi, per dare continuità al discorso, i risultati delle analisi genetiche. Si indirizza quindi ai vari documenti:

- Oligosaccaridi Allegato 4, pag. 11-17
- Acidi sialici Allegato 5, pag. 13-19
- Antiossidanti Allegato 6, pag. 14-18
- Acidi grassi Allegato 7, pag. 17-26

3.3 Espressione genica

Una volta ottenuti i risultati dei fenotipi riportati nel WP4 è stata effettuata una scelta di 60 campioni per il sequenziamento dell'RNA totale tenendo in considerazione il budget a disposizione e la massimizzazione dei confronti possibili, oltre che al fatto di avere a disposizione almeno 3 repliche biologiche per condizione. Inoltre, nell'ambito di ciascun gruppo sono stati scelti campioni con concentrazione "alta" o "bassa" di SOS. Nella tabella 2 viene riportato il numero totale di campioni sequenziati per razza e DIM (A) ed il numero di campioni scelti considerando il livello di SOS "alti" o "bassi" (B)

A			B		
Razza	DIM		Razza	DIM	
	60	120		60	120
FI	6	10	FI	3+3	3+3
M	6	6	M	3+3	3+3
POD	6	9	POD	3+3	3+4
PR	7	10	PR	4+3	3+4

Tab 2. Campioni per RNA-seq

I campioni sono stati estratti e controllati come descritto in 3.1. E' stata preparata un'aliquota congrua da spedire in ghiaccio secco alla ditta prescelta per il sequenziamento (Neogene). L'attività di sequenziamento richiede mediamente 8-10 settimane di lavorazione ed i dati di sequenziamento sono stati resi disponibili 2 mesi dopo la spedizione e cioè alla fine di luglio 2021. I dati

grezzi sono stati quindi analizzati come descritto in 2.2.

Alcuni dei geni risultati interessanti dall'analisi sul trascrittoma effettuata in 2.2 sono stati validati mediante analisi di "reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)"

La realizzazione di questo esperimento prevede una serie di step: a) disegno degli oligonucleotidi necessari per la reazione di amplificazione (PCR) sia per i geni targets che di riferimento (Reference Genes, RG); b) analisi delle concentrazioni ottimali dei primer e dell'efficienza di amplificazione; c) individuazione dei RGs più stabili nel corso della lattazione e del numero necessario da utilizzare negli esperimenti; d) quantificazione dei valori di espressione genica mediante tecnologia SYBR; e) analisi dell'espressione differenziale dei geni mediante il software qBASE plus basato sul metodo implementato della $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Per gli esperimenti di qPCR è stato utilizzato il sistema StepOnePlus Real-Time PCR System. Come RGs sono stati utilizzati i geni ATP synthase β polipeptide (ATP5B) e Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (SDH) precedentemente testati e risultati come i più stabili in analoghi esperimenti su lattazioni in bovino ed ovino

L'mRNA è stato retrotrascritto a cDNA mediante il kit ExcelRT Reverse Transcription (SMOBIO) seguendo le istruzioni della ditta scelta. Per le reazioni di qPCR è stato utilizzato il kit Excel-Taq FAST qPCR SybrGreen (ROX) (SMOBIO). L'efficienza di amplificazione per ogni gene è stata calcolata mediante curve standard a 5 punti (diluizione 1:5 per ogni punto).

I geni target analizzati sono stati *B4GALT1/LALBA* (test 1) e *ST3GAL5/ST6GAL1* (test 2) risultati con espressioni differenti rispetto alla concentrazione di oligosaccaridi negli esperimenti di RNAseq (vedi 2.2). Nella tabella 3 sono riportate le specifiche dei primer utilizzati e le condizioni per la qPCR.

Gene	Sequenza dei primers	Sequenza di riferimento	Regione genica / Posizione	Primer, [nM]	T.a.	Efficienza %
<i>B4GALT1</i>	FW-5'CTGTGTCTCGCCAAATGCT3' RW-5'AGGTGAGTGAGTTCAAACCATCAG3'	HQ700335.1	Ex5fw/1011-1030 Ex6rw/1134-1157	200/200	61	97,7
<i>LALB</i>	FW-5'GATGACATTGTGTGTTGCCAAGA3' RW-5'AGTGCCACTGATCCAGCTTCTC3'	NM_001285635.1	Ex3fw/330-351 Ex4rw/408-429	300/300	61	94
<i>ST3GAL5</i>	FW-5'CCTGAACCAGTTTGATGTCG3' RW-5'GGTGCACCTTCTGGATAAGTC3'	KF055858.2	E4fw/655-673 E5rw/745-765	300/300	60	100
<i>ST6GAL1</i>	FW-5'GAGCTGTGGGACATCATTCAAG3' RW-5'CACACAGTGACATCATAATGGCAAT3'	HQ709167.1	E5fw/1065-1086 E6rw/1140-1164	100/300	61	93,2
<i>ATP5B</i>	FW-5'TTTGGACTCCACGTCTCGCATC3' RW-5'TCCTGGAGGGATTGTAGTCCTG3'	NM_175796.2	Ex8fw/1219-1240 Ex9rw/1304-1326	300/300	61	100
<i>SDHA</i>	FW-5'ACGATTACTCCAAGCCCATCCAG3' RW-5'AACGTAGGAGAGCGTGTGCTTC3'	NM_174178.2	Ex14fw/1825-1847 Ex14rw/1883-1904	200/100	61	100

Tab. 3 Primers e condizioni sperimentali qPCR

I valori di C_t delle amplificazioni dei geni target nei vari campioni (7 per il test 1 e 6 per il test 2) sono stati normalizzati relativamente ai valori dei due RGs (Reference Genes), dell'efficienza di amplificazione e di un calibratore, per ottenere dei valori di espressione relativa (software qBASE^{plus}, Biogazelle) che sono riportati nella figura 5.

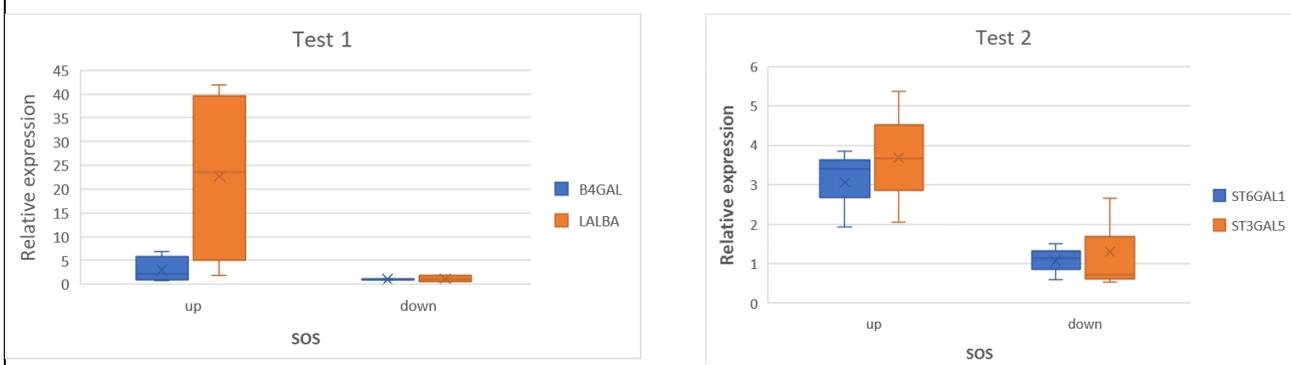
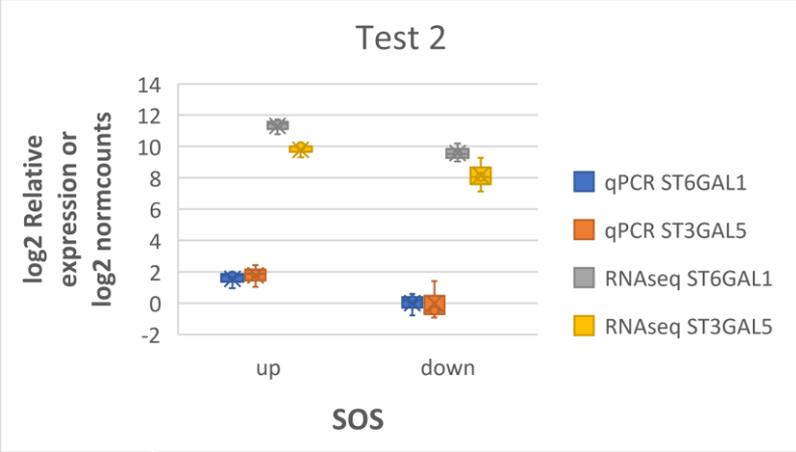


Fig. 5 Valori di espressione relativa dei geni *B4GALT1/LALBA* e *ST3GAL5/ST6GAL1* nei campioni con oligosaccaridi (SOS) alti (up) e bassi (down)

I valori di espressione relativa dei geni nei campioni in cui è maggiore la concentrazione dei SOS sono più elevati di quelli in cui la concentrazione dei SOS è minore.

Nella figura 6 (A e B) vengono riportati in parallelo i valori (\log_2) di espressione relativa e del numero delle conte normalizzate dell'RNAseq per il test 1 e per il test 2. I risultati delle analisi mostrano come i due livelli di espressione seguano la concentrazione dei SOS e l'analisi statistica ANOVA, corretta per Tukey, ha mostrato come l'associazione sia statisticamente significativa per *LALBA* e *ST6GAL1* ($p < 0,05$). L'analisi di correlazione di Pearson ha mostrato in generale valori di $r = 0,6$ con $p < 0,001$.



B



Fig. 6 Confronto tra i risultati dell'analisi qPCR e RNAseq

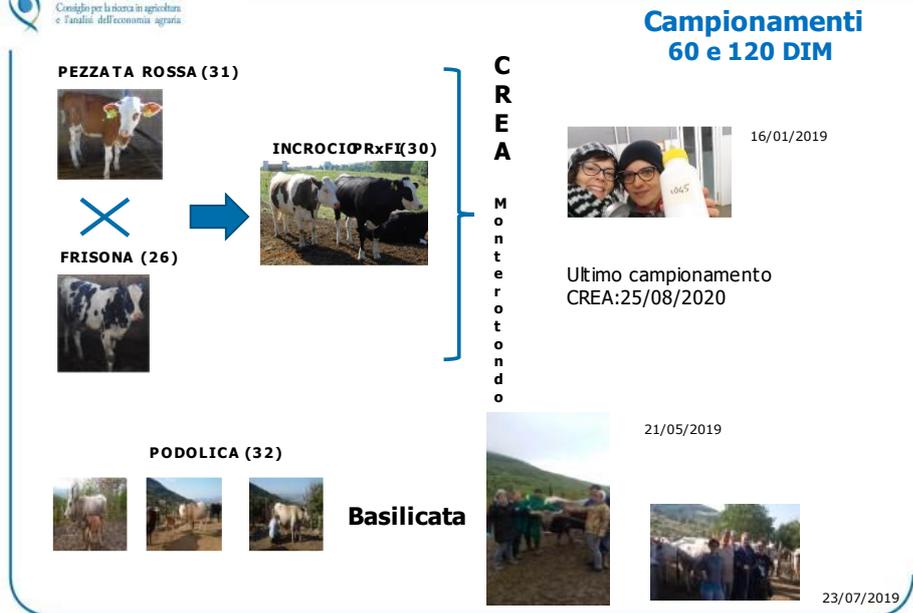
WP4: ANALISI dei FENOTIPI

4.1: Disegno sperimentale e campionamenti

Il disegno sperimentale ha previsto l'utilizzo della mandria di bovini da latte basata sull'incrocio a rotazione delle razze Frisona e Pezzata Rossa presente al CREA Zootecnia e Acquacoltura sede di Monterotondo. Tale mandria è stata costituita nell'ambito del progetto "REDDBOV", finanziato dal MIPAAF, DM 19735/7303/12 al fine ultimo di sfruttare il fenomeno dell'eterosi e verificare la possibilità di migliorare i parametri produttivi, riproduttivi, della salute e longevità degli animali. Oltre ai confronti tra i tre gruppi genetici sono stati utilizzati come "outgroup" animali della Podolica, razza bovina allevata al pascolo, dalle grandi capacità adattative che unisce ad una grande rusticità e frugalità, la spiccata attitudine materna che si esprime attraverso la facilità di parto e la capacità di provvedere alla cura ed all'allattamento e difesa del vitello.



Disegno sperimentale



I campionamenti di latte nella mandria sperimentale di incrocio sono stati effettuati nel corso della mungitura mattutina. Per ogni animale è stato prelevato 1 litro di latte che è stato immediatamente portato in laboratorio e suddiviso in aliquote di quantità sufficiente per la determinazione di acidi sialici, oligosaccaridi, tioli, glutatione e acido lipoico, acidi grassi, pH. Le provette sono state conservate a -20°C o -80°C fino alla determinazione analitica. Su due campioni di circa 50 ml ciascuno, sottoposti a pastorizzazione a 63°C per 30 minuti e 90°C per 15 minuti, è stata determinata la malondialdeide, con il test TBARS, ed i tioli totali, al fine di verificare la resistenza all'ossidazione dovuta al riscaldamento. 8 aliquote da 50 ml di latte ciascuna sono state utilizzate per la successiva estrazione di DNA ed RNA come specificato nel WP3.

Un campione da 50 ml è stato

aggiunto con il conservante *Bronopol* ed inviato al Laboratorio Standard Latte (LSL) dell'AIA situato a Maccarese per le analisi standard per la qualità del latte (% di grasso e proteine, lattosio, conta delle cellule somatiche (SCC), urea).

I campionamenti sono stati effettuati a 60 e 120 giorni dal parto. Nel corso del primo anno di attività è stato possibile campionare una buona parte degli animali previsti, l'ultimo campionamento è stato effettuato il 25 agosto 2020 e pertanto le numerosità dei tre gruppi genetici al termine della sperimentazione rispettano quanto previsto dal progetto (25 soggetti FI, 25 PRI, e 25 vacche incrociate F1 (PRxFI o M)). Tutti gli animali sono stati alimentati con la stessa dieta.

Per quanto riguarda la razza Podolica (POD) i campionamenti sono stati effettuati nel mese di maggio 2019 (60 giorni). I prelievi, date le difficoltà di reperire un elevato numero di animali nella stessa fase di lattazione (soprattutto in un sistema di allevamento estensivo come quello podolico in cui la data di parto è scarsamente programmabile), sono stati effettuati in 2 aziende contigue (Monti Li Foy - nel comune di Picerno) per un totale di 32 bovine podoliche (primipare e pluripare). Nella prima azienda, con patrimonio animale di circa 100 capi, sono stati effettuati i prelievi su 25 bovine, e, nella seconda, con una consistenza pari a circa 40 capi, sono stati effettuati i prelievi su 7 bovine.

Le 2 aziende oggetto dei campionamenti sono da considerarsi significative del sistema di allevamento podolico. In entrambe le aziende, infatti, si pratica l'allevamento allo strato brado senza ricorso, tranne in casi sporadici, all'integrazione alimentare, con alimentazione basata sull'utilizzo delle risorse pascolive (pascoli polifiti ed arbusti tipici della macchia mediterranea). A scopo di controllo degli effetti ambientali sono stati raccolti, contestualmente al prelievo del latte, campioni dell'erba rappresentativi dell'ingerito dagli animali al pascolo. La mungitura, in entrambe le aziende, è manuale, mattutina, ed effettuata in presenza dei vitelli. Il latte della mungitura del mattino viene trasformato, senza alcuna refrigerazione, per la produzione del Caciocavallo Podolico.

I campionamenti di latte, a 120 gg di lattazione, sono stati effettuati sulle stesse bovine oggetto del primo prelievo nel mese di luglio 2019. Sono state campionate 25 bovine di una sola delle due aziende. Nell'altra, dato il sistema di allevamento e il mancato ricorso all'integrazione alimentare, gli animali a 120 gg non venivano più munti e il latte era tutto destinato ai vitelli.

Una volta effettuati i campionamenti, il latte è stato trasportato nei laboratori della sede del CREA-ZA di Bella (PZ) ed è stato trattato con le stesse modalità descritte per la sede di Monterotondo. La fase preparatoria per l'estrazione del DNA ed RNA è stata effettuata a Bella ed i campioni sono stati trasportati a Monterotondo conservati in ghiaccio secco.

Di seguito viene riportata la tabella con i risultati delle analisi effettuate sulle diete degli animali allevati a Monterotondo ed a Picerno.

Composizione chimica	Unifeed	Pascolo	
		primaverile	estivo
Sostanza secca (DM)	59,43	44,53	76,53
Proteine (% of DM)	18,1	14,4	9,5
Fibre (% of DM)	19,5	25,8	32,8
Estratto etero (% of DM)	3,6	2,6	1,8
Nitrogen free extractive (% of DM)	52,64	50,5	48,4
Ceneri (% of DM)	6,16	6,7	7,5

NDF ¹	26,4	57,8	61,9
ADF ¹	17,1	30,7	38,4
ADL ¹	2,3	7,4	9,2

¹NDF: Neutral Detergent Fibre; ADF: Acid Detergent Fibre; ADL: Acid Detergent Lignin

Tab 4. Analisi delle diete utilizzate negli allevamenti di Monterotondo (Unifeed) e di Picerno (Pascolo primaverile ed estivo).
Composizione dell'unifeed: Fieno medica Il taglio, Fieno polifita, Silosorgo, Orzo, Mais, Triticale, Soia

I risultati relativi all'analisi dei parametri del latte sono riportati nell'allegato 9. Brevemente, la differenza nella quantità di latte prodotto è stata valutata solo nelle tre razze della mandria d'incrocio, perché per la Podolica non è possibile misurare la quantità di latte prodotto in una mungitura, visto che viene effettuata manualmente. La quantità di latte prodotto è risultata significativamente maggiore a 60 giorni rispetto 120 ($p < 0,001$), il contenuto di proteine e lattosio è significativamente più alto a 120 giorni rispetto 60 giorni ($p < 0,001$), ed entrambi sono significativamente più alti nella razza Podolica rispetto alle altre razze ($p < 0,001$). Il contenuto di cellule somatiche non ha mostrato variazioni significative tra le razze e tra i due giorni di campionamento. Il contenuto di urea è significativamente più basso nella Podolica ($p < 0,001$) rispetto alle altre razze, e la Pezzata Rossa a 120 giorni presenta un contenuto più basso rispetto alla Frisona ($p < 0,01$). La valutazione del contenuto di proteine e di urea ci aiuta a capire se la vacca sta ricevendo una razione equilibrata oppure è in carenza di energia e di proteine. Dai valori ottenuti per la Podolica si può evincere che questa razza ha una dieta meno energetica e più ricca di proteine, e ciò si osserva soprattutto nel secondo punto di campionamento che cade proprio in piena estate quando i pascoli sono poveri di erba fresca ma ricchi di fieno secco.

4.2: Quantificazione degli oligosaccaridi nel latte (3'SL, 6'SL, DSL, 6'LSN).

Le determinazioni analitiche per la quantificazione dei SOS su tutti i campioni di latte della razza Podolica e dei tre gruppi genetici campionati a Monterotondo sono state effettuate presso la sede di Bella, che ha le attrezzature necessarie.

I campioni prelevati a Monterotondo sono stati conferiti a Bella mediante spedizioni in ghiaccio. Oltre alle molecole indicate al momento della scrittura del progetto, è stato possibile determinare un ulteriore oligosaccaride (6'LSN) senza richiesta di modifiche al piano finanziario. Purtroppo, a causa del furto dei tubi in rame di adduzione dei gas per il laboratorio e delle procedure tecnico/amministrative necessarie per risolvere il problema (giustificazione nella sezione 5 e documenti presentati al ministero), le analisi hanno subito un forte rallentamento.

I risultati delle analisi sono riportati in dettaglio nell'allegato 4, pag. 1-10. Brevemente, è stata messa in evidenza l'effetto della razza sulla concentrazione dei SOS. In particolare, all'interno delle razze di incrocio sono state messe in evidenza differenze significative per il 3'SL e 6'LSN, mentre la razza Podolica ha presentato valori significativamente più alti rispetto alle altre 3 razze. La concentrazione dei SOS si è mostrata sempre più alta a 60 giorni rispetto a 120 giorni in tutte le razze.

I risultati di queste analisi sono stati fondamentali per la scelta dei campioni da utilizzare nelle analisi del trascrittoma (RNA-seq) che quindi hanno subito di conseguenza un naturale slittamento nel tempo (vedere WP3, attività 3.3).

4.3: Quantificazione degli acidi sialici nel latte.

La determinazione degli acidi sialici in una matrice complessa come il latte presenta molte difficoltà analitiche in quanto questi composti sono per la maggior parte glicconiugati, cioè legati sia ad oligosaccaridi che a glicoproteine. La metodica analitica ha previsto quindi dei passaggi di idrolisi per liberare gli acidi sialici dalle molecole complesse.

I risultati delle analisi sono riportati in dettaglio nell'allegato 5, pag. 1-12

Brevemente, il contenuto del Neu5Ac ha riportato differenze significative nei 4 tipi genetici con il maggior contenuto nella razza Frisona ed il minor contenuto nella razza Podolica. Andamento diverso invece si è trovato nella molecola Neu5Gc dove solo la razza Podolica è risultata significativamente diversa rispetto agli altri tipi genetici, probabilmente legato alla rusticità della razza e al sistema di allevamento che causa meno stress agli animali. Per quanto riguarda l'effetto dei periodi di lattazione i dati hanno mostrato una significativa maggior quantità a 120 giorni di lattazione sia per il Neu5Ac che Neu5Gc.

4.4: Quantificazione dell'acido lipoico e glutazione nel latte.

Questa attività ha previsto non solo l'analisi dell'acido lipoico e glutazione ma anche la determinazione dei tioli totali e degli acidi grassi. E' stato anche valutato l'effetto protettivo degli antiossidanti sul trattamento termico del latte.

- I risultati relativi al profilo degli **acidi grassi** sono riportati in dettaglio nell'allegato 7, pag 1-16. Brevemente, il latte di Podolica contiene una quantità di acidi grassi monoinsaturi (MUFA), acidi grassi poliinsaturi (PUFA), acidi grassi ramificati (branched) e acidi grassi dispari (ODD) significativamente differente dagli altri gruppi genetici; inoltre contiene una quantità significativamente maggiore di acido grasso linoleico coniugato (CLA) e presenta un rapporto omega 6/omega 3 significativamente più basso rispetto agli altri gruppi genetici. Inoltre la Podolica presenta una quantità significativamente più alta anche di acido docosapentaenoico (DPA) e di acido eicosapentaenoico (EPA). Dal profilo degli acidi grassi ottenuto per il latte di Podolica si evince che questa razza presenta tutti gli acidi grassi ritenuti salutari per umano, e vogliamo sottolineare come la loro presenza sia legata alla dieta di una vacca in estensivo, anche se i risultati di GWAS (allegato 7, pag. 17-26) hanno evidenziato una leggera influenza del genoma.
- I risultati relativi alle molecole antiossidanti sono riportati in dettaglio nell'allegato 6, pag. 1-13.
 - Il contenuto di **glutazione** nel latte è stato determinato mediante analisi HPLC, utilizzando una Colonna C18 fase inversa secondo la metodica utilizzata da Niero et al. (2015). Il contenuto di glutazione non varia in modo significativo nei diversi gruppi genetici (a 60 gg di lattazione è risultato più alto nel latte di Podolica rispetto a

quello degli altri tipi genetici) ed, in media, è più alto nel latte a 60 gg e c'è la tendenza a diminuire nei campioni di latte a 120 gg di lattazione.

- La concentrazione dell'**acido lipoico** è stata determinata secondo la metodica descritta da Saha et al., 2018 con alcune modifiche. L'acido lipoico ha mostrato valori significativamente più bassi nel latte di Frisona rispetto al latte di Podolica con valori intermedi per Pezzata Rossa e meticcias probabilmente a causa di un aumento del livello di stress in una razza altamente specializzata come la Frisona, mentre nessuna differenza è stata riportata tra i due periodi di lattazione. Solo nel latte di podolica il contenuto di acido lipoico è aumentato a 120 giorni rispetto a 60 giorni di lattazione.
- Il contenuto di **tioli totali** si è mostrato più alto nel latte di Pezzata Rossa e Podolica rispetto a quello di Frisona e meticcias ed ha mostrato la tendenza ad aumentare a 120 giorni di lattazione indipendentemente dalle razze considerate
- Sul latte delle razze dell'incrocio sottoposto a due **trattamenti termici** è stato determinato il contenuto di malondialdeide (MDA) come indice di ossidazione lipidica. Il contenuto di MDA è aumentato nel latte trattato termicamente rispetto al latte crudo mentre non c'è differenza significativa tra il trattamento a bassa e ad alta temperatura confermando l'effetto ossidante con entrambi i tipi di trattamento termico, senza differenze statisticamente significative tra gruppi genetici. Inoltre, la correlazione tra tioli totali e MDA ha mostrato come il contenuto di MDA era significativamente più alto nel latte con basso contenuto di tioli e che quindi il latte con un livello di tioli più alto era meno soggetto all'ossidazione dei lipidi.

WP5: PIANO di SFRUTTAMENTO dei RISULTATI, RICADUTE e DIVULGAZIONE dei RISULTATI

Nell'ambito di questo WP è stata data ampia visibilità al progetto sia tramite la divulgazione della partecipazione ad eventi che dei risultati delle ricerche sul sito istituzionale dell'Ente e del centro di ricerca, sul canale facebook dell'Ente, e su riviste online sia generiche che di settore

Nel progetto era stata prevista la partecipazione ad alcuni congressi nazionali ed internazionali molti dei quali si sono svolti con modalità online causa le restrizioni per la pandemia COVID-19.

I risultati delle attività di divulgazione sono riportate in dettaglio nell'**allegato 10**

- I risultati preliminari del progetto MIQUALAT sono stati utilizzati per una presentazione orale dal titolo "The MIQUALAT project: nutraceutical properties of cow milk, preliminary results" al 71° Congresso dell'*European Association of Animal Science* (EAAP) che si sarebbe dovuto tenere dal 31 al 4 Settembre 2020 a Porto (Portogallo). Purtroppo, a causa dell'emergenza Covid-19 il Congresso è stato svolto in una modalità virtuale dal 1 al 4 Dicembre 2020
- La presentazione dei risultati di MIQUALAT ad un congresso internazionale è stato oggetto di un comunicato stampa da parte dell'ente CREA, e la notizia è diventata parte di una rassegna stampa.
- Un documento in cui si riassumono i risultati ottenuti è stato pubblicato anche sulla rivista online Ruminantia.
- Sono state richieste interviste telefoniche sui risultati del progetto che poi sono uscite su articoli stampati o pubblicati online
- Le attività del progetto sono state oggetto di un video pubblicato su youtube per l'iniziativa CREA-BREAK innovazione per 2020 <https://youtu.be/a1CYET3ARrk>
- Nell'arco del 2021 i risultati del progetto sono stati presentati ad 8 congressi (nazionali ed internazionali) due dei quali si sono svolti in presenza
- Nell'ambito dell'iniziativa "Notte europea dei ricercatori", promossa da Frascati Scienza, le tematiche del progetto sono state presentate il 25 settembre in 1 ora e mezza di diretta sul canale online dedicato <https://www.youtube.com/watch?v=sF5otNOi758> e la notizia è stata riportata sulla rivista online Ruminantia (<https://www.ruminantia.it/evento-ruminantia/webinar-crea-la-ricerca-in-zootecnia-e-la-filiera-del-latte/>) e sul sito dell'Università della Tuscia (<http://www.unitus.it/it/dipartimento/dibaf/avvisi/articolo/questionario-progetto-miqualat>)
- E' stato organizzato il convegno finale di progetto nella sede del CREA – ZA a Monterotondo in data 13 ottobre 2021. In tale sede erano presenti, oltre al direttore Luca Buttazzoni ed ai colleghi di Monterotondo, anche i colleghi della sede di Bella e dell'Università della Tuscia. Hanno accettato l'invito i direttori delle Associazioni Nazionali delle razze bovine studiate nel progetto ed in particolare dell'ANAFIBJ, ANAPRI, ANABIC. Era presente la Prof. Francesca Maria Sarti dell'Università degli studi di Perugia, designata dal coordinatore come esperto esterno per la valutazione del progetto. Poiché a causa delle disposizioni Covid non è stato possibile estendere l'invito in presenza ad altri ricercatori, l'evento è stato condiviso sulla piattaforma Team. In tal modo circa 25 persone hanno potuto seguire l'evento online. La locandina è stata condivisa anche sul sito dell'Università della Tuscia ([https://www.unitus.it/public/platforms/12/cke_contents/11752/Webinar_PROGETTO%20MIQUALAT_13ottobre2021_web%20\(002\).pdf](https://www.unitus.it/public/platforms/12/cke_contents/11752/Webinar_PROGETTO%20MIQUALAT_13ottobre2021_web%20(002).pdf)). Nel corso della giornata si sono succedute 11 presentazioni e la conclusione del direttore, **allegato 11**. I presenti si sono quindi salutati con un rinfresco organizzato presso la sala mensa. I contenuti del convegno sono stati riportati in un articolo pubblicato nella rivista online Ruminantia, **allegato12**.
- Per quanto riguarda le pubblicazioni relative al progetto si fa riferimento all'**allegato10**

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Osservazioni alla relazione tecnico-scientifica

La relazione tecnico-scientifica descrive in maniera precisa ed esaustiva lo scopo del progetto, la sua articolazione ed il lavoro svolto per ogni WP e da ogni U.O.

I risultati ottenuti sono molti e difficilmente riassumibili nello spazio dedicato nella presente scheda come si evince anche dalla copiosità degli allegati che sono stati necessari per supportare la relazione.

Molto originale ed importante la parte divulgativa messa in atto, come più volte sottolineato, in un momento veramente difficile.

Pertanto ritengo che la relazione presentata sia veramente ben fatta e completa

4. Obiettivi, benefici e criticità del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO				
Descrizione degli obiettivi del progetto				
Obiettivi generali	Obiettivi specifici	Linee di attività in WP	Risultati attesi	Risultati raggiunti
a. Individuare animali che producano latte naturalmente arricchito in composti prebiotici bioattivi e principi protettivi	1. Valutazione di geni e/o polimorfismi (SNPs) da analizzare in relazione alla biosintesi di molecole presenti nel latte mediante analisi di metadati	<ul style="list-style-type: none"> • WP2 	1) Elenco di geni noti o candidati e/o SNPs implicati nella biosintesi di composti prebiotici e protettivi	Raggiunto
	2. Valutazione della variabilità genetica tra le razze bovine sia a livello genomico che trascrittomico e analisi di associazione tra differenze genetiche nelle diverse razze bovine ed i fenotipi funzionali scelti (oligosaccaridi, acido sialico, antiossidanti)	<ul style="list-style-type: none"> • WP3 	1) Identificazione di polimorfismi ed aplotipi nelle differenti razze bovine 2) Valori di espressione genica durante la lattazione e nelle differenti razze 3) Effetti delle varianti alleliche sui fenotipi analizzati	Raggiunto Raggiunto Raggiunto

CREA Zootecnia e Acquacoltura, Via Po' 14, 00198 Roma

	3. Quantificazione di oligosaccaridi specifici (3'-SL, 6'SL, DSL), acido sialico (Neu5Gc ed Neu5Ac) ed antiossidanti (acido lipoico, glutazione) nel latte proveniente da differenti razze bovine	3 WP4	1) Caratterizzazione dei campioni di latte nelle diverse razze e punti di lattazione e relazione tra fenotipi quali/quantitativi analizzati nel latte e razze bovine analizzate	Raggiunto
--	---	-------	---	-----------

NOTE

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Osservazioni al raggiungimento degli obiettivi del progetto

Da quanto riportato nello schema gli obiettivi generali e specifici nonché i risultati attesi e realizzati che il progetto si era prefisso sono stati ampiamente raggiunti come si evince anche dalla estrema completezza della relazione finale e dalla grande quantità e qualità del materiale allegato. C'è da sottolineare che il progetto ha gettato le basi per nuove idee progettuali da poter sviluppare in futuro.

5. Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto

Numero WP	Unità operative Coinvolte	Ostacolo	Azioni correttive
WP3	U.O. 1	Purtroppo, le misure di prevenzione della pandemia da Covid-19 hanno fortemente ostacolato il lavoro in presenza nei laboratori. Le attività di laboratorio previste per le analisi genetiche hanno quindi subito alcuni ritardi.	L'attività dei laboratori è stata organizzata con turnazioni del personale e rispetto delle misure di distanziamento. La proroga di progetto ha permesso di terminare le attività programmate in 3.1 e 3.2
WP2 – WP3	U.O.1	Il ritardo delle analisi dei SOS per il furto subito ai tubi di rame nella sede di Bella si è riflettuto sulla scelta dei campioni da utilizzare per le analisi in 3.3 e 2.2.	Sono state attivate le procedure necessarie per ripristinare le linee dei gas di laboratorio di Bella. La proroga di progetto ha permesso di terminare le attività programmate in 3.3 e 2.2
WP4	U.O.1	Furto delle linee dei gas del laboratorio della Sede di Bella del CREA ZA	Si è trattato di un evento imprevedibile e nessun'altra sede aveva a disposizione le strumentazioni adatte al tipo analisi dove poter svolgere le stesse. Si è quindi insistito con l'assicurazione per velocizzare l'indennizzo e poter quindi ripristinare l'impianto ed avviare le attività di analisi.
WP4	U.O.1	I divieti agli spostamenti imposti dall'emergenza Covid-19 hanno impedito il confronto tra due diverse metodiche di analisi sugli acidi sialici da effettuarsi con	Si è tamponato questo ostacolo mediante un confronto a "distanza" con condivisione di video in tempo reale

CREA Zootecnia e Acquacoltura, Via Po' 14, 00198 Roma

		strumenti diversi presenti nelle sedi di Monterotondo e Bella.	
WP1 – WP2 - WP3 – WP4	U.O.1 – U.O.2	A causa della pandemia di Covid-19 e dell'attività lavorativa in Smart Working non è stato possibile organizzare incontri scientifici tra i partners e la riunione intermedia di progetto	Il coordinatore ha assicurato la comunicazione tra i partecipanti tramite emails, chiamate telefoniche, scambio di documenti in cartelle condivise. E' stata organizzata una skype call in cui sono stati presentati i risultati ottenuti fino al termine del primo anno di attività.
WP1 – WP2 - WP3 – WP4	U.O.1 – U.O.2	Nel progetto era stata prevista la partecipazione a molti congressi sia nazionali che internazionali. I divieti agli spostamenti imposti dall'emergenza Covid-19 hanno impedito lo svolgimento di molti di questi in presenza	Il congresso extraeuropeo PAG è stato cancellato e molti congressi sono stati trasformati da modalità "in presenza" a modalità "online". I risultati delle attività di ricerca sono stati presentati ad 8 congressi quasi tutti in modalità "online" tranne 2

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Osservazioni alle azioni correttive messe in atto

C'è da porre una forte attenzione sul fatto che il progetto ha incontrato notevoli difficoltà poiché svolto nel periodo più scuro della pandemia. Si è avuta difficoltà nell'accesso ai laboratori, impedimenti e ritardi nella consegna del materiale per le analisi; è iniziato lo smart-working, non erano possibili spostamenti e quindi difficoltà nell'incontro con i partner progettuali nonché, cosa fondamentale, la diffusione dei risultati a convegni e congressi nazionali ed internazionali.

Nonostante ciò per ogni ostacolo emerso è stata messa a punto dal Coordinatore una manovra correttiva che in modo brillante ha consentito di superare tutti gli impedimenti ricorrendo in maniera efficace anche alle nuove tecnologie di comunicazione che la pandemia ha imposto. Infatti, come da schema sopra riportato, ad ogni WP e per ogni U.O. sono stati enunciati in maniera chiara, esaustiva e dettagliata i problemi insorti e le relative correzioni.

Pertanto, posso concludere, dicendo che le azioni correttive sono state assolutamente idonee per poter superare i non facili ostacoli intercorsi.

Timbro dell'Ente proponente il progetto

Firma leggibile del Coordinatore del progetto



[Handwritten signature in blue ink]
cip -

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Valutazione complessiva del progetto

Il progetto si inserisce in una problematica molto attuale che vede nella diffusione mediatica il *"potere malefico"* dei prodotti di origine animale.

Per quanto riguarda il latte, come ben accennato nella relazione finale, si assiste ad un calo del consumo pro/capite e i consumatori italiani, quindi, sembrano sempre più orientarsi verso regimi alimentari che tendono a limitare nella propria dieta, per motivi etici o di salute, prodotti di origine animale e a preferire bevande vegetali o ad alta digeribilità. Le scelte d'acquisto sono quindi dettate da una particolare attenzione al salutismo e al benessere. Per invertire questa tendenza è molto importante conoscere da vicino il latte e i suoi derivati, saperne l'origine, il tipo di lavorazione, le caratteristiche salutistiche e le qualità organolettiche (<https://www.campagnamica.it/attualita/latte-filiera-crescita/>).

Il focus importante del presente progetto è quello di studiare gli aspetti funzionali della produzione di latte individuando animali che producano latte naturalmente arricchito con composti prebiotici bioattivi e protettivi in grado di produrre benefici per la salute del consumatore finale.

Molti sono gli aspetti che colpiscono sia dal punto di vista scientifico che in generale:

- A) In primis, la scelta degli animali da genotipizzare in base al fenotipo che rappresenta un nuovo approccio bottom-up rispetto agli studi tradizionali di genomica e che ha un grosso risvolto nel miglioramento genetico rivolto tradizionalmente all'applicazione degli strumenti messi a disposizione dalla genetica per aumentare la redditività dell'allevatore.
- B) L'utilizzo di fenotipi innovativi poiché lo studio si è concentrato su tutte quelle molecole benefiche per la salute e il benessere dell'uomo quali: oligosaccaridi sialilati, acidi sialici, molecole antiossidanti (tioli totali, glutatione, ecc.), acidi grassi idonei anche per analizzare la salute della mammella.
- C) La scelta di condurre lo studio su razze italiane (Frisona, Pezzata Rossa, loro meticci e Podolica) per indirizzare la scelta degli allevatori su queste con il duplice scopo di mantenere la biodiversità e contenere l'inbreeding incrociando però sempre razze italiane.
- D) Studio approfondito della componente genetica tramite 3 approcci: GWAS, analisi di geni candidati, analisi del trascrittoma completo mediante RNA-seq.

Da quanto emerso dal convegno finale e da tutta la diffusione effettuata attraverso i più disparati mezzi mediatici e non è emersa:

- la notevole capacità di interazione del Coordinatore tra le diverse unità operative che hanno collaborato in maniera proficua e fruttuosa mettendo a disposizione anche know-how già acquisiti, mostrando quindi la volontà di economizzare le risorse ministeriali;

CREA Zootecnia e Acquacoltura, Via Po' 14, 00198 Roma

- le molecole studiate possono rappresentare nuovi fenotipi da includere nei piani di miglioramento genetico e selezione per le vacche da latte specializzate, ma anche per la valorizzazione delle razze autoctone (Podolica);
- il coinvolgimento delle Associazioni di razza ANAFIBJ, ANABIC e ANAPRI;
- la messa in campo di metodologie di analisi che hanno consentito l'approccio fenotipo/genotipo che rappresenta oggi il futuro degli studi di miglioramento genetico;
- lo spazio per ulteriori ricerche per approfondire lo studio intrapreso e creare un prodotto da poter testare sui consumatori;
- l'originalità nella presentazione dei risultati e la presenza di gadget finali strumento molto importante ai fini della comunicazione.

Voglio infine sottolineare un aspetto che, al di là del merito scientifico del Coordinatore e delle Unità operative, rappresenta una conquista nel campo sociale delle cosiddette scienze dure, cioè la presenza di un coordinatore donna in grado di portare a termine l'impresa insieme alla sua inseparabile collega, in un momento storico così difficile.

Pertanto, considero il progetto fortemente innovativo sotto tutti i punti di vista e soprattutto utile come punto di partenza per studi futuri.

Perugia, 27 gennaio 2022

Firma leggibile dell'Esperto (qualora designato)

Franca Maria Sella

¹te

Inserire una delle 6 aree prioritarie previste dal capitolo 2 del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:

- Area 1 - Aumento sostenibile della produttività, della redditività e dell'efficienza delle risorse negli agro ecosistemi**
- Area 2 - Cambiamento climatico, biodiversità, funzionalità suoli e altri servizi ecologici e sociali dell'agricoltura**
- Area 3 - Coordinamento e integrazione dei processi di filiera e potenziamento del ruolo dell'agricoltura**
- Area 4 - Qualità, tipicità e sicurezza degli alimenti e stili di vita sani**
- Area 5 - Utilizzo sostenibile delle risorse biologiche a fini energetici ed industriali**
- Area 6 - Sviluppo e riorganizzazione del sistema della conoscenza per il settore agricolo, alimentare e forestale**
- Area 7 - Pesca e acquacoltura**

² Inserire una delle seguenti linee di attività (previste dal Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale 2014-2020). La linea di attività da inserire dovrà corrispondere all'area strategica di intervento indicata nel precedente campo, ovvero per la:

Area 1 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Scelte varietali, di razza, di destinazione d'uso, miglioramento genetico mediante l'utilizzo di biotecnologie sostenibili;
- b. Uso sostenibile dei nutrienti, dei prodotti fitosanitari e dei prodotti zooprofilattici, utilizzazione di microrganismi, insetti utili e molecole bioattive per la difesa delle piante;
- c. Ottimizzazione dei processi produttivi (tecnica colturale, alimentazione, benessere animale, pratiche di prevenzione, risparmio energetico, ecc.), anche mediante l'utilizzo di sistemi di supporto alle decisioni (telerilevamento, agricoltura e zootecnia di precisione, meccanizzazione integrale, robotica e altri sistemi automatici intelligenti, applicazione di principi e strumenti di intelligenza artificiale ecc.) e biotecnologie sostenibili;
- d. Soluzioni tecnologiche per il miglioramento degli impianti e delle strutture aziendali;
- e. Gestione efficiente della risorsa idrica e della qualità delle acque;
- f. Conservazione, conservabilità e condizionamento delle produzioni (riduzione degli sprechi, conservanti naturali ecc.);
- g. Strumenti e sistemi funzionali alla gestione aziendale (pianificazione, costi di produzione, diversificazione ecc.) e alla sua caratterizzazione (impronta ecologica).

Area 2 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Strategie per la mitigazione e per lo studio dell'adattamento al cambiamento climatico;
- b. Valorizzazione delle varietà e razze locali e salvaguardia delle risorse genetiche;
- c. Tutela del fattore "suolo": conservazione, qualità, fertilità e salvaguardia della biodiversità microbica;
- d. Valorizzazione di alcuni servizi ecologici forniti dal settore primario: manutenzione e ripristini ambientali, verde urbano, agricoltore/selvicoltore custode, bonifica dei terreni inquinati ecc.;
- e. Valorizzazione del ruolo sociale dell'agricoltura: "agricoltura sociale", relazioni urbano – rurale, accettabilità sociale dell'attività agricola.

Area 3 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Soluzioni organizzative, economiche e sociali alle difficoltà strutturali di integrazione orizzontale e verticale nei distretti e nelle filiere;
- b. Soluzioni tecnologiche per il miglioramento dei processi di filiera;
- c. Sviluppo di sistemi distributivi, commerciali, promozionali e di marketing.

Area 4 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Produzione di alimenti di qualità per tutti (food security);
- b. Miglioramento, tutela e tracciabilità della qualità e della distintività e adeguamento dei relativi standard di certificazione;
- c. Tecniche sostenibili per la trasformazione, conservazione e confezionamento dei prodotti agroalimentari;
- d. Valorizzazione della relazione tra alimentazione e salute e della valenza nutraceutica dei prodotti agroalimentari.

Area 5 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Sviluppo e razionalizzazione delle filiere di biomasse e di biocarburanti con adeguati requisiti di sostenibilità ambientale ed economica;
- b. Sviluppo di bioraffinerie per la produzione di materiali industriali e mezzi tecnici a partire da residui e scarti agricoli nell'ottica dell'adeguata remunerazione del settore agricolo.

Area 6 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Nuovi strumenti di governance per il coordinamento e l'efficienza del sistema della conoscenza: analisi dei fabbisogni, pianificazione, monitoraggio, valutazione ecc.;
- b. Promozione del trasferimento dell'innovazione mediante servizi di supporto, formazione e consulenza alle imprese agricole, alimentari e forestali;
- c. Sviluppo di nuove modalità.

³ Inserire uno degli 13 settori produttivi previsti dall'Allegato A del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:

- a) Zootecnico;
- b) Orticolo;
- c) Cerealicolo;
- d) Viticolo;
- e) Frutticolo;
- f) Olivicolo;

- g)** Biologico;
- h)** Floricolo;
- i)** Forestale;
- j)** Innovazione sociale;
- k)** Piante officinali;
- l)** Risicolo;
- m)** Pesca e acquacoltura.