

Ogni razza può essere considerata una ‘preziosa risorsa naturale’.
Lauvergne, 1980

3. CONSERVAZIONE DI VARIABILITÀ GENETICA E CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E GENETICA

Le produzioni di proteine animali si stanno orientando a livello globale verso un sempre più evidente restringimento della base genetica concentrandosi su un numero molto limitato di linee sintetiche accuratamente selezionate per elevate performance produttive. Le razze tradizionali legate al territorio, del quale rappresentano una manifestazione sociale, culturale e produttiva basata sull’adattamento a particolari condizioni e ambienti, spesso poveri e marginali, sono costantemente a rischio di estinzione in quanto considerate non performanti nel mercato globale nonostante il loro indiscusso valore genetico e socio-culturale.

Le risorse genetiche animali vanno accuratamente protette per ridurre la perdita di materiale genetico potenzialmente utile allo sviluppo futuro di nuovi obiettivi produttivi e per evitare la perdita di risorse genetiche prima di un loro approfondito studio valutativo.

Il raggiungimento di obiettivi produttivi elevati con animali dalle performance molto lontane dal normotipo della specie di appartenenza portano inevitabilmente alla riduzione della variabilità genetica e alla perdita irre recuperabile di geni e delle loro combinazioni. Inoltre, occorre sottolineare l’importanza del monitoraggio dell’andamento delle frequenze geniche durante i piani di conservazione per prevenire la riduzione e scomparsa di geni particolari. La massima variabilità genetica in ogni specie animale domestica o selvatica porta con sé una plasticità evolutiva che permette un miglior adattamento all’ambiente; inoltre, da un punto di vista produttivo, particolari frequenze geniche e le loro combinazioni rappresentano una potenziale risorsa per lo sviluppo di nuovi

genotipi che possono risultare più adatti ad ambienti e sistemi di allevamento alternativi, coerenti con le moderne esigenze del consumatore.

La tutela della biodiversità in campo avicolo è argomento di discussione già a partire dai primi anni Sessanta durante la ‘Seconda Conferenza Europea sull’Avicoltura’ svolta a Bologna. Negli stessi anni e anche in quelli a seguire, questa tematica di grande interesse scientifico e culturale è ripetutamente affrontata anche da Istituzioni mondiali, come la FAO.

A partire dal dopoguerra, ibridi commerciali altamente economici e competitivi dal punto di vista del marketing si diffondono nel comparto avicolo, la combinazione delle alte performance produttive economicamente vantaggiose e il costante aumento della richiesta mondiale di proteine animali favorisce la sostituzione delle razze locali con gli ibridi commerciali che assumono una diffusione globale. La rivalutazione delle razze locali e piani mirati alla loro salvaguardia diventano estremamente importanti e urgenti per non perdere un patrimonio genetico altrimenti minacciato di estinzione.

La razza Milanino è il risultato della felice combinazione genetica dei tratti positivi delle razze Valdarnese bianca e Orpington bianca finalizzata a creare individui dalle performance migliorate rispetto alla media delle razze locali grazie al principio dell’eterosi, pur mantenendo una elevata adattabilità all’allevamento rurale *low input*.

La finalità della tutela genetica di questa razza avicola, come nel caso di altre popolazioni zootecniche, può essere suddivisa in tre differenti obiettivi: a) la conservazione di materiale genetico di riserva; b) il mantenimento di una elevata variabilità genetica nella specie avicola domestica per disporre di elevata plasticità utile a risolvere problematiche future; c) il mantenimento di un patrimonio genetico caratterizzato da elevata capacità di adattamento in grado di fornire prodotti in ambienti marginali/*low input* in netta antitesi con il sistema altamente industrializzato delle produzioni avicole moderne.

La valutazione dell’unicità delle differenti razze, un parametro di primaria importanza nella definizione delle priorità di conservazione, generalmente si sviluppa attraverso diversi approcci:

1. Approccio storiografico (trattato nel Capitolo 1).
2. Approccio morfometrico: mirato alla valutazione di regioni e proporzioni legate alla produzione con l’obiettivo di individuare i tratti morfologici prevalenti e la loro distribuzione all’interno della razza.
3. Approccio molecolare: mirato allo studio delle frequenze di alleli (varianti dello stesso gene) o di mutazioni puntiformi del DNA (*Single Nucleotide Poli-*

morphisms, SNPs) a livello del genoma, alla valutazione con marcatori molecolari microsatelliti della variabilità genetica entro razza e dell'indice di consanguineità. Le analisi genetiche sono uno strumento di importanza fondamentale anche nella gestione dei nuclei di allevamento; in particolare, esse permettono la differenziazione e strutturazione delle famiglie per limitare l'aumento di omozigosi e favorire così il mantenimento della variabilità genetica.

3.1 Approccio morfometrico

La classificazione del fenotipo rappresenta un passaggio fondamentale nell'individuazione dei soggetti vicini alla descrizione storica della razza e quindi nella determinazione dei tratti tipici che vanno a definire lo standard di razza, corrispondente ai soggetti morfologicamente ideali che saranno preferiti per l'inclusione in piani di selezione e nei libri genealogici.

Lo studio della morfometria dei capi Milanino è stato applicato costantemente nelle generazioni successive allo scopo di identificare il fenotipo tipico della razza e di ottimizzare le sue caratteristiche produttive.

La caratterizzazione morfologica si è svolta seguendo le Linee Guida FAO n. 11 *“Phenotypic Characterization of Animal Genetic Resources”* disponibili online dal 2012 (www.fao.org/3/i2686e/i2686e00.pdf).

La caratterizzazione fenotipica di tutti i soggetti in riproduzione prevedeva la valutazione di caratteri sia qualitativi sia quantitativi come descritto in Tabella 3.1.

Caratteri qualitativi	Caratteri quantitativi
Colore della livrea	Peso vivo (g)
Colore dei tarsi	Lunghezza corporea (cm)
Colore dell'orecchione	Lunghezza del tarso-metatarso (cm)
Colore dell'occhio	Diametro del tarso-metatarso (cm)
Tipo di cresta	Circonferenza del tarso-metatarso (cm)
Numero di punte della cresta semplice	Circonferenza toracica (cm)
	Apertura alare (cm)
	Lunghezza sperone (cm; solo nei maschi)

Tabella 3.1 – Elenco dei caratteri qualitativi e quantitativi registrati in capi riproduttori per la caratterizzazione fenotipica della razza Milanino

Il fenotipo dei soggetti adulti è caratterizzato da livrea bianca, tarsi bianco rosati, occhio di colore arancio, cresta semplice rossa ben sviluppata sia nel maschio sia nella femmina, che spesso la presenta ripiegata su un lato, orecchione di colore prevalente bianco o bianco-rosato. Il numero prevalente di punte della

cresta è 5: quasi la metà dei soggetti presenta questa caratteristica. La Tabella 3.2 riporta la media, il minimo e il massimo dei valori quantitativi misurati suddivisi per sesso. In accordo con le indicazioni storiche, la razza Milanino è di tipo pesante con una netta differenza fra i due sessi, il peso medio è circa 3,3 kg nei maschi e 2,5 kg nelle femmine. Anche le misure morfologiche relative alla dimensione corporea evidenziano il diverso sviluppo somatico dei due sessi, in particolare le femmine presentano una minore dimensione del corpo e dell'apertura alare, e tarsi più esili dei maschi.

Parametro	Maschi			Femmine		
	media	min	max	media	min	max
Peso vivo (g)	3276,52	2532,00	4116,00	2488,64	1190,00	3493,00
Lunghezza corporea (cm)	48,17	41,00	68,00	41,34	34,00	61,00
Circonferenza corporea (cm)	38,32	33,00	43,50	35,56	30,00	43,00
Lunghezza tarso (cm)	9,91	8,00	12,00	8,11	6,50	11,00
Diametro tarso (cm)	1,51	1,00	2,13	1,11	0,70	1,70
Circonferenza tarso (cm)	5,89	3,50	7,00	4,61	2,50	6,00
Lunghezza sperone (cm)	1,37	0,50	2,20	-	-	-
Apertura alare (cm)	47,48	36,00	60,00	40,24	30,00	51,00

Tabella 3.2 – Valori medi, minimi e massimi di caratteri quantitativi misurati in polli riproduttori di razza Milanino (maschi $n = 33$; femmine $n = 140$)

3.2 Approccio molecolare

Nei differenti studi genetici che hanno visto come protagonista la razza Milanino le tecniche impiegate sono state molteplici, genetico con marcatori microsatelliti e genomico con SNPs e *Copy Number Variants (CNVs)*, tutte finalizzate a comprendere la struttura genetica della razza e il make up genetico dei soggetti ad essa appartenenti.

3.2.1 Analisi genetica con marcatori microsatelliti

Le analisi del DNA coi marcatori microsatelliti hanno permesso di ottenere risultati significativi nella valutazione della struttura genetica della razza e della sua variabilità. Il primo studio di analisi genetica si è svolto nel 2012 con 31 marcatori microsatelliti (Coval 2015), corrispondenti al panel FAO specifico per la specie *Gallus gallus* (FAO, 2011). I range in paia di basi (bp) all'interno dei quali sono stati identificati gli alleli della popolazione sono riportati in Tabella 3.2 e risultano simili a quelli individuati da vari ricercatori in altre razze italiane. Nel Milanino, sono stati individuati complessivamente 88 alleli. Il numero medio di alleli ai loci microsatelliti per popolazione (NMA), l'eterozigosi attesa

(H_E) ed osservata (H_O), per locus e il valore medio, e il *Polymorphism Information Content* (PIC) anch'esso per locus e il valore medio, sono presentati in Tabella 3.3.

L'eterozigosi attesa H_E è una misura molto usata per valutare la variabilità genetica di una popolazione. H_E è massima quando le frequenze degli alleli sono bilanciate e in generale aumenta all'aumentare del numero di alleli. Essa definisce la frequenza media degli individui eterozigoti per locus all'interno di una popolazione, rappresenta quindi il numero osservato di individui eterozigoti diviso il totale degli individui analizzati e è indicativa della variabilità della popolazione stessa. H_E è la frazione di genotipi eterozigoti attesa in base all'equilibrio di *Hardy-Weinberg*. Se si analizzano più loci, l'eterozigosi osservata media è la media delle eterozigosi osservate per ciascun locus. Eventuali deviazioni dall'equilibrio di *Hardy-Weinberg* sono frequentemente definite come un eccesso o un difetto di omozigoti (o di eterozigoti) rispetto all'atteso. In questi casi si fa ricorso ad un solo indice numerico detto indice di fissazione (F). Nel caso di eccesso di omozigoti (come nel caso di accoppiamenti in alta consanguineità), F può essere inteso come quella frazione di eterozigoti sostituita da omozigoti nell'incrocio non casuale. Il valore di H_O presenta un range da 0,045 (MCW0103) a 0,772 (MCW0222) con una media di 0,495; il valore medio di H_E è 0,539 con un range di valori compreso tra il 0,070 (MCW0330) e 0,677 (ADL0278) (Tabella 3.3). I valori medi di H_E e H_O misurati nella razza Milanino sono simili a quelli ottenuti in altre razze italiane, come Mericanel della Brianza (H_E 0,41; H_O 0,42), Ancona (H_E 0,47; H_O 0,35) e Livornese Bianca (H_E 0,49; H_O 0,45), mentre risultano leggermente inferiori a quelli ottenuti nelle razze piemontesi Bianca di Saluzzo (H_E 0,66; H_O 0,60) e Bionda Piemontese (H_E 0,59; H_O 0,66) (Sartore et al., 2014).

Il PIC è un parametro che rappresenta il diverso grado di polimorfismo che caratterizza ogni microsatellite ed è una reale misura dell'efficienza di questi marcatori in quella popolazione. Tale parametro è la misura del polimorfismo del marcatore in funzione del numero di alleli e delle loro frequenze. Infatti, il valore espresso dal PIC cresce all'aumentare del numero degli alleli, purchè le frequenze siano bilanciate. Valori di PIC maggiori di 0,5 vengono generalmente considerati indici di buona efficacia del marcatore genetico (Botstein et al. 1980). Nella razza Milanino il 39,2% dei marcatori presenta un valore di $PIC > 0,5$. I valori di PIC medio calcolati nella razza sono molto vicini al valore di 0,5 (0,43), sottolineando quindi un certo livello di variabilità peraltro tipico delle piccole popolazioni.

La consanguineità molecolare (*inbreeding*; F) relativa degli individui (I) rispetto alla popolazione (S) a cui appartengono è valutata mediante il calcolo dell'indice F_{is} . Questo parametro risulta quindi molto importante per valutare l'effetto della gestione degli accoppiamenti operati. L'indice Fis calcolato sulla base delle frequenze alleliche è risultato pari a 0,084, in accordo con i valori riportati da altri Autori in altre razze locali italiane di pollo. Poiché il valore di Fis va da un minimo di -1 (eccesso di eterozigoti) a un massimo di 1 (difetto di eterozigoti), il valore calcolato prossimo allo zero permette di affermare che la consanguineità molecolare nella popolazione Milanino è molto bassa.

Locus	N. alleli	Range (bp)	H_E	H_O	PIC
ADL0112	2	124-128	0,502	0,590	0,37
ADL0268	3	107-113	0,596	0,454	0,507
ADL0278	5	109-119	0,677	0,727	0,606
LEI0094	3	285-287	0,521	0,318	0,400
LEI0166	2	255-261	0,494	0,454	0,366
LEI0192	3	254-306	0,527	0,59	0,404
LEI0234	3	214-286	0,527	0,181	0,404
MCW0014	3	171-185	0,618	0,636	0,522
MCW0016	4	143-151	0,544	0,636	0,448
MCW0020	3	179-185	0,607	0,411	0,505
MCW0034	4	222-242	0,573	0,454	0,465
MCW0037	2	152-154	0,507	0,545	0,372
MCW0067	5	173-181	0,649	0,761	0,567
MCW0069	4	157-173	0,590	0,727	0,489
MCW0078	5	133-141	0,791	0,545	0,737
MCW0080	1	276-278	0	0	0
MCW0081	3	110-132	0,591	0,578	0,491
MCW0098	2	253-255	0,459	0,500	0,348
MCW0103	3	266-270	0,320	0,045	0,289
MCW0104	3	190-224	0,567	0,454	0,459
MCW0111	3	97-101	0,621	0,590	0,524
MCW0165	2	114-116	0,304	0,090	0,253
MCW0183	3	293-309	0,642	0	0,551
MCW0206	3	225-233	0,624	0,636	0,540
MCW0216	3	141-145	0,443	0,545	0,393
MCW0222	3	222-226	0,647	0,772	0,560
MCW0248	3	215-223	0,626	0,636	0,543
MCW0295	3	90-96	0,533	0,727	0,407
MCW0330	2	266-274	0,070	0,727	0,372
N. totale alleli	88		0,539	0,495	0,432

Tabella 3.3 – Numero di alleli individuato per ciascun locus analizzato e range in bp osservato, valori dell'eterozigosi attesa (H_E) ed osservata (H_O) e PIC per locus e media rilevata nella razza Milanino

L'assetto genetico della razza, le sue caratteristiche genomiche, i suoi tratti morfologici sono il risultato di accurati piani di selezione che dal 2009 prendono in considerazione non solo la morfologia e le performance degli animali allevati ma anche il loro make-up genetico. Nel 2020, tutta la popolazione oggetto di selezione è stata sottoposta ad un'analisi genetica con marcatori microsatelliti allo scopo di identificare linee familiari e piani di accoppiamento mirati. Questo studio ha identificato 5 differenti linee familiari con tipizzazione delle femmine strettamente imparentate (parentela molecolare media 0,75) e identificate in modo da massimizzare il rapporto maschi e femmine per assicurare la massima variabilità genetica. L'analisi molecolare identifica anche i maschi meno parenti e quelli con maggiore eterozigosi. La caratterizzazione genetica permette di valutare l'omozigosi reale (tratti di DNA identico) dei soggetti impiegati in allevamento e non quella stimata in base alla genealogia (pedigree). Le cinque famiglie sono definite dall'analisi molecolare nel dendrogramma riportato in Figura 3.1: la famiglia A è quella che maggiormente si distanzia

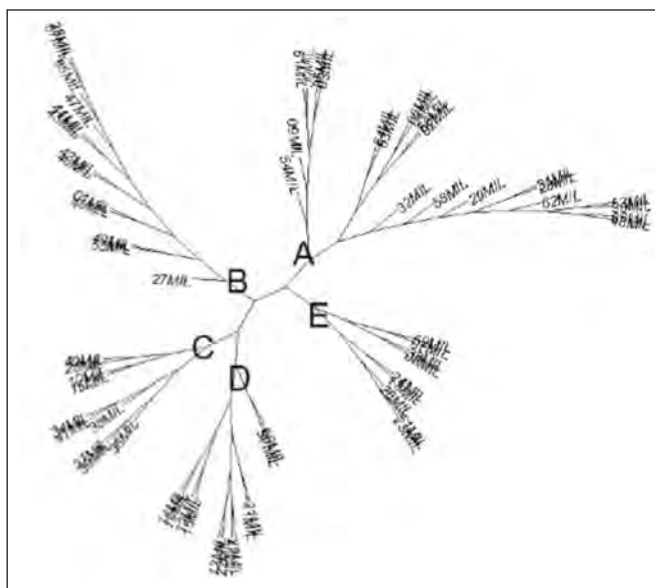


Figura 3.1 - Dendrogramma rappresentante le cinque linee familiari calcolate sulla base della parentela molecolare (Soglia, 2020)

dalle altre mentre le famiglie C e D sono le più vicine utilizzando la distanza media tra gli individui di ciascuna famiglia. Questo secondo studio genetico ha permesso di valutare una H_O del 51,3% con un range da 18,2 a 81,8% e una parentela molecolare media di 0,59. Il 98% dei marcatori utilizzati è risultato polimorfo nella popolazione analizzata, costituita da 41 femmine e 25 maschi. Il maggior numero di loci polimorfi è stato individuato nelle famiglie A, B ed E, mentre la famiglia D presenta il tasso di omozigosi più elevato e la famiglia B quello più basso. Tutte le famiglie risultano essere caratterizzate da un eccesso di eterozigosi. Grazie a questa seconda analisi genetica si sono potute creare le cinque famiglie di riproduttori che trasmetteranno alle generazioni future tutti i tratti tipici della razza Milanino non solo da un punto di vista fenotipico ma anche genotipico.

La selezione assistita da marcatori permette risultati oggettivi ed efficaci nei piani di selezione; questo lungo e dispendioso processo di selezione ha portato alla fissazione di tratti morfologici e produttivi in una razza avicola voluta dall'uomo che ha cercato con risultati eccellenti di ottenere elevate caratteristiche produttive, principalmente per la produzione di carne, ma senza trascurare l'ovodeposizione e la capacità di adattamento tipiche delle razze locali.

3.2.2 Analisi genomica con SNPs e CNVs

I marcatori microsatteliti sono stati lungamente utilizzati per eseguire analisi filogenetiche e studi sulla variabilità genetica nelle razze di polli. La disponibilità di SNPs ha reso possibile aumentare enormemente i punti di analisi distribuiti uniformemente sul genoma permettendo di studiare in maniera ancora più definita la struttura genetica di una popolazione. In aggiunta, questi sistemi consentono di identificare e mappare le CNVs sul genoma. Le CNVs coinvolgono vaste regioni genomiche e, di conseguenza, influenzano la struttura genica e possono determinare cambiamenti di espressione e di regolazione genica. Le conoscenze acquisite sulla struttura genetica delle razze avicole analizzate attraverso SNPs e CNVs possono essere utilizzata per preservare la variabilità genetica e le caratteristiche fenotipiche peculiari di ciascuna popolazione.

Lo studio genomico di diverse razze italiane, inclusa la Milanino come unica razza di sintesi, ha evidenziato come la nostra razza sia caratterizzata da elevati livelli di eterozigosi calcolata sulle mutazioni puntiformi degli SNPs. Il valore di H_O è risultato 25,8%, mentre quello di H_E 23,7%. Il coefficiente di fissazione F_{IS} è una rappresentazione della struttura genetica della popolazione e della divisione in sottopopolazioni; F_{IS} è condizionato dall'eccesso di omozigosi e

come già riportato, valori positivi indicano un difetto di eterozigosi e valori negativi un eccesso. Il valore di $-0,055$ rappresenta uno dei risultati dell'attento lavoro di conservazione della variabilità genetica nella razza. Questa analisi ha permesso anche di individuare la vicinanza con altre razze di pollo, in particolare con le razze piemontesi Bianca di Saluzzo e Bionda Piemontese, e una chiara lontananza genetica dalla razza Siciliana (Strillacci et al., 2017). I risultati pubblicati evidenziano una elevata capacità di raggruppamento (similitudine genetica) dei soggetti appartenenti alla razza Milanino che si separa in misura differente anche da tutte le altre razze. La distanza genetica della razza Milanino deriva dalle strategie di selezione basata sull'eterozigosi e la sintesi di tratti positivi per la produzione e l'adattamento che hanno portato nel 1920 alla creazione della razza. L'analisi dei CNVs conferma l'assetto genetico unico della razza e le differenze che la separano dalle altre razze italiane oggetto di studio (Figura 3.2). Gli Autori concludono quindi che la razza Milanino, come le altre razze italiane studiate, è caratterizzata da elevata variabilità genetica e che i CNVs sono stati in grado di separare le differenti razze in base alla loro storia evolutiva e di selezione (Strillacci et al., 2017). In conclusione, gli studi genomici hanno dimostrato l'esistenza di una variabilità genetica e genomica nella razza Milanino tale da consentire, e anzi auspicare, il suo allevamento e conservazione.

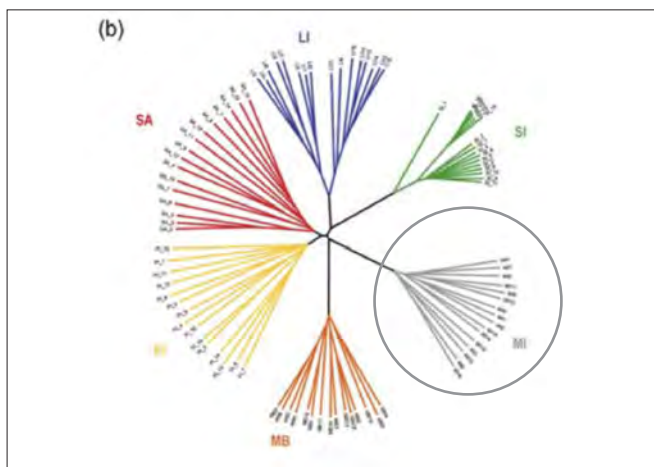


Figura 3.2 - Dendrogramma Neighbour-Joining in base alle distanze di condivisione genetica di sei razze avicole italiane: LI = Livornese, MB = Mericanel della Brianza, MI = Milanino, PI = Bionda Piemontese, SA = Bianca di Saluzzo and SI = Siciliana (Strillacci et al., 2017)

Le caratteristiche morfologiche e genetiche del Milanino ne fanno un esempio oggettivo di conservazione della biodiversità in campo avicolo, conservazione finalizzata alla tutela di un potenziale genetico da impiegare in allevamenti *free range* e estensivi, adatti anche alle aree marginali, e in filiere di economia circolare per ricostruire il rapporto tra uomo, produzioni zootecniche e terra.

Bibliografia

- Ceccobelli S, Di Lorenzo P, Lancioni H, Ibáñez LM, Tejedor MT, Castellini C, ..., Lasagna E (2015) *Genetic diversity and phylogeographic structure of sixteen Mediterranean chicken breeds assessed with microsatellites and mitochondrial DNA*. *Livestock Science*, 175, 27-36.
- Coval (2015), *Rapporto di Ricerca Progetto n. 1723, Conservazione e valorizzazione di razze avicole lombarde*. Regione Lombardia.
- FAO (2012) *Phenotypic characterization of animal genetic resources*. FAO Animal Production and Health Guidelines. No 11. Rome.
- FAO (2011) *Molecular genetic characterization of animal genetic resources*. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 9. Rome.
- Sartore S, Sacchi P, Soglia D, Maione S, Schiavone A, De Marco M, Ceccobelli S, Lasagna E, Rasero R (2016) *Genetic variability of two Italian indigenous chicken breeds inferred from microsatellite marker analysis*. *British Poultry Science*, 57(4), 435-443.
- Soglia D (2020) *Report analisi genetiche con marcatori molecolari microsatellite: valutazione variabilità Milanino, analisi linee familiari, piano di accoppiamento*. Laboratorio di Genetica Molecolare Animale, Università degli studi di Torino.
- Strillacci MG, Cozzi MC, Gorla E, Mosca F, Schiavini F, Román-Ponce SI, Ruiz Lopez FJ, Schiavone A, Marzoni M, Cerolini S, Bagnato A (2017) *Genomic and genetic variability of six chicken populations using single nucleotide polymorphism and copy number variants as markers*. *Animal*, 11(5), 737-745.
- Wilkinson S, Wiener P, Teverson D, Haley CS, Hocking PM (2012) *Characterization of the genetic diversity, structure and admixture of British chicken breeds*. *Animal Genetics*, 43(5), 552-563.
- Zanetti E, De Marchi M, Abbadi M, Cassandro M (2011) *Variation of genetic diversity over time in local Italian chicken breeds undergoing in situ conservation*. *Poultry Science*, 90(10), 2195-2201.
- Zanetti E, De Marchi M, Dalvit C, Cassandro M (2010) *Genetic characterization of local Italian breeds of chickens undergoing in situ conservation*. *Poultry Science*, 89(3), 420-427.