

IL CONTROLLO GENETICO DELLA PARENTELA NEL CANE CON ANALISI DEL DNA

Michele Polli, Loredana Holzer, Stefano Marelli, Luigi Guidobono Cavalchini

Università degli Studi di Milano - Istituto di Zootecnica - Facoltà di Medicina Veterinaria

Via Celoria 10 - 20133 MILANO

Tel. 02/50318048

michele.polli@unimi.it

luigi.guidobonocavalchini@unimi.it

Introduzione

Tutte le cellule di ogni individuo contengono un identico DNA in cui sono scritte le informazioni che consentono la vita di un cane o di un essere vivente in genere.

Nel cane il DNA è organizzato in 78 cromosomi localizzati all'interno del nucleo cellulare, da dove presiede alle innumerevoli attività. Le cellule di un organismo animale superiore sono all'incirca 1000 miliardi, all'interno di ognuna di esse è presente il medesimo DNA genomico, con una lunghezza approssimativa pari a 2 metri. Nel DNA genomico sono contenuti circa 30.000 geni che presiedono al codice della vita di ciascun individuo. Come esempio possiamo dire che i 4 nucleotidi del DNA trascritti costituiscono 200 volumi di 1000 pagine ciascuno, anche se ultimamente in seguito ai risultati ottenuti con il mappaggio dei genomi dell'uomo e di altre specie animali, sembrerebbe che il numero effettivo dei geni codificanti per determinate proteine non sia così elevato. Il concetto di gene è radicalmente mutato negli ultimi anni. Infatti, secondo le più recenti ricerche i geni effettivi degli animali superiori non sarebbero tanto numerosi quanto si riteneva fino a poco tempo fa. Probabilmente l'insieme degli effetti fenotipici che costituiscono la variabilità genetica di un individuo, è dovuto all'effetto combinatorio di un più limitato numero di geni, tra loro interagenti.

Acquisire tutte le informazioni strutturali e funzionali dei genomi umano e animale è senz'altro una delle più ambiziose mete scientifiche degli ultimi anni. Mappare un genoma significa localizzare tutti i geni sui cromosomi prima di determinarne la funzione. L'applicazione principale sarà nelle diverse specie animali, quella di sviluppare dei test diagnostici per le principali malattie ereditarie o per identificare i geni responsabili per determinati fenotipi.

Negli ultimi anni gli studi genetici riguardanti il cane si sono moltiplicati: attualmente sono 46 i laboratori internazionali costantemente impegnati nel "Progetto di Mappaggio del Genoma Canino" e sono sempre più numerose le applicazioni derivanti da questi studi.

Il progetto di mappaggio del genoma canino si basa soprattutto sull'utilizzo dei microsatelliti (sequenze ripetute di due-tre o quattro nucleotidi) per la saturazione della mappa e l'identificazione di marcatori da correlare con i geni. Nel cane è per ora possibile ottenere una mappa a bassa risoluzione, basata sui marcatori genetici come i microsatelliti che ci consentono comunque uno studio di *linkage*, ossia di correlazione tra i marcatori genetici ed i geni che sono coinvolti in determinate espressioni fenotipiche. Purtroppo i finanziamenti delle ricerche riguardanti il cane sono sempre molto limitati e questo prolunga i tempi per l'ottenimento di risultati. Bisogna però tener presente che, l'acquisizione di conoscenze sul genoma del cane, permette uno studio comparato di quello umano e che pertanto in modo reciproco si possono ottenere importanti informazioni, che in studi indirizzati ad una sola specie animale sarebbero impossibili da ottenere.

Principali applicazioni delle tecniche del DNA all'allevamento del cane di razza

In medicina veterinaria i possibili campi di applicazione della biologia molecolare sono vari e numerosi e un posto di rilievo spetta indiscutibilmente a quello dell'allevamento e della selezione del cane di razza, non limitandosi al controllo genetico della parentela e all'identificazione di genealogie errate, ma permettendo differenti possibilità di utilizzo.

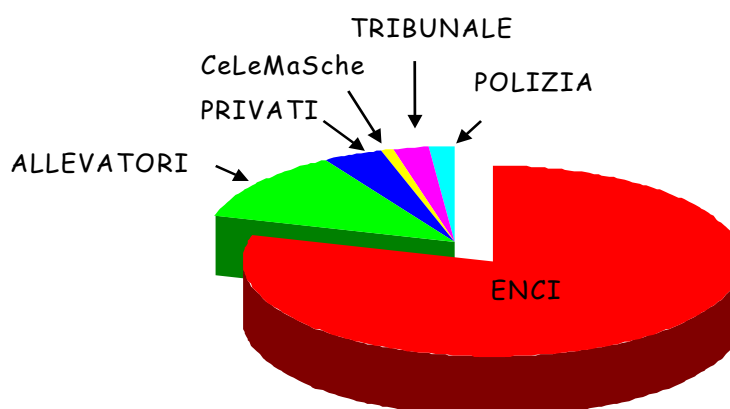
A tal proposito un particolare rilievo va dato, allo studio della variabilità genetica e consanguineità, all'eredità patologica, all'identificazione delle varianti alleliche responsabili per determinati fenotipi (morfo-funzionali) che possono interessare la selezione di una determinata razza canina.

Le tecniche di biologia molecolare e le recenti scoperte legate al mappaggio dei genomi aprono nuovi orizzonti in tutto l'ambito zootecnico, basti, in tal senso, pensare alla possibilità di allestire dei test diagnostici, basati sullo studio del DNA, che consentano in modo sicuro il riconoscimento di soggetti portatori di un determinato difetto genetico e quindi la messa in opera di piani selettivi mirati che permettano in tempi brevi la completa eradicazione del difetto dall'allevamento, oppure più semplicemente all'identificazione di soggetti portatori di determinati colori del mantello o di altre caratteristiche morfologiche presenti allo stato eterozigote e pertanto nascosti. I marcatori hanno già permesso studi di filogenesi su razze canine che sono state selezionate in ecosistemi assai diversi, con differenti attitudini e con un'ampia variabilità morfologica, quando questi studi, saranno estesi a un maggior numero di individui della popolazione ci permetteranno di meglio comprendere le reali distanze genetiche tra le varie razze. In quest'articolo ci soffermeremo sul controllo genetico della parentela e sui risultati ottenuti dal nostro laboratorio, rimandando a prossime pubblicazioni le altre applicazioni.

Il controllo genetico della parentela

Il libro o registro genealogico rappresenta uno strumento fondamentale per la selezione e l'allevamento del cane di razza, ma troppo spesso si sente parlare di denunce non corrispondenti alla realtà. L'identificazione dei riproduttori, mediante l'analisi del loro DNA, permette di controllare in modo inconfutabile la provenienza delle cucciolate, valorizzando così i pedigree dei cani di razza. E', infatti, fuor di dubbio che tutti gli studi selettivi ed i piani di controllo rivolti all'impiego di riproduttori scelti e all'eliminazione delle malattie genetiche sono sicuramente destinati a fallire se non esiste la certezza assoluta dell'identificazione dei riproduttori stessi.

Fig 1: Controllo genetico della parentela presso l'Istituto di Zootecnica dal 1996 al 2003: L'attività maggiore è stata svolta per l'ENCI e in modo più limitato per gli allevatori e privati, per le Centrali di Lettura delle Malattie Scheletriche, per i Tribunali e per la Polizia di Stato.



A tal proposito, da alcuni anni, presso l'Istituto di Zootecnica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano vengono effettuate su richiesta dell'ENCI le diagnosi di parentela (fig.1- 2) nell'ambito di un controllo sperimentale per l'iscrizione al libro genealogico. Tale controllo è stato riservato, fino ad ora, a quelle cucciolate per le quali è stato riscontrato un vizio di forma all'atto della registrazione al libro genealogico. Altre richieste sono state inoltrate da allevatori e privati, al fine di verificare la parentela di particolari soggetti in selezione; infine alcune richieste, relative a controversie tra allevatori, sono pervenute dalla Polizia di Stato e da alcuni tribunali.

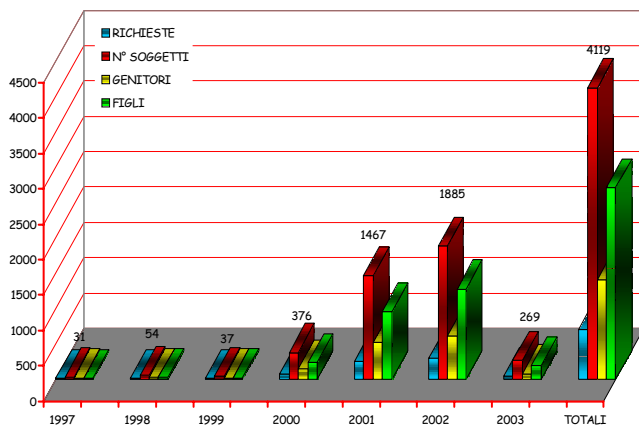
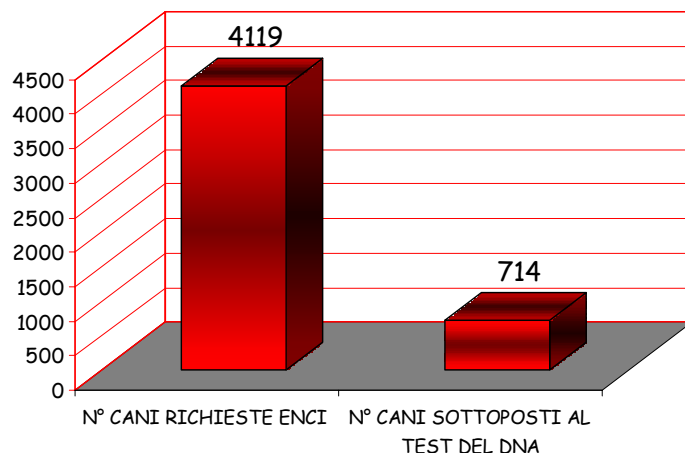


Fig 2: Diagnosi di parentela su richiesta dell'E.N.C.I. dal 1997 al 2003. Generalmente le diagnosi sono state richieste per vizi di forma all'atto della registrazione delle cucciolate. Sono stati richiesti 705 controlli di gruppi familiari per un totale di 4119. 2003 dati parziali

Risultati: solo 714 soggetti dei 4119 richiesti dalla Centrale del Libro Genealogico dell'ENCI, si sono sottoposti ai controlli per poter così ottenere l'iscrizione. Di questi il 7,5 % dei cuccioli esaminati non corrisponde al padre dichiarato dall'allevatore (fig. 3) con una progressiva diminuzione di questa percentuale negli anni. Per quanto riguarda i test richiesti direttamente dagli

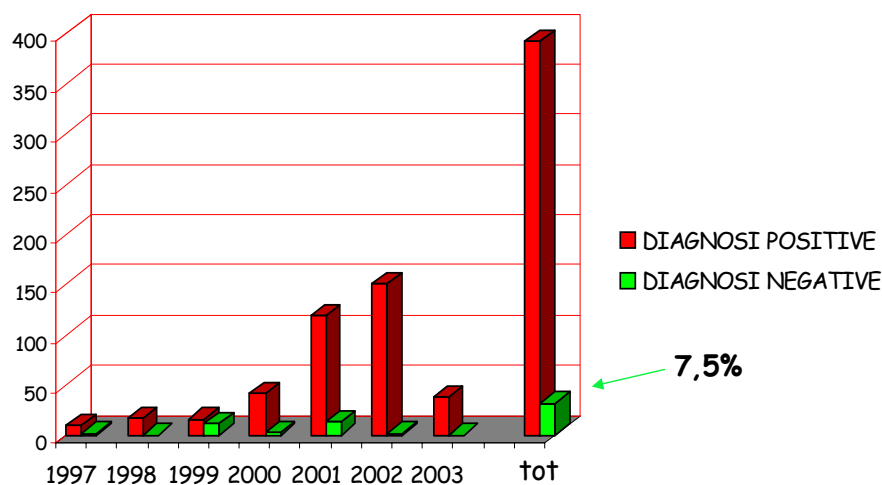
Fig. 3: L'Enci dal 1997 fino a metà del 2003 ha richiesto l'analisi di 4119 cani. Si sono sottoposti a controllo solo 714 soggetti



allevatori, in particolari situazioni in cui l'allevatore non era certo dell'identità dello stallone, si è visto che il 53,8% dei cuccioli non corrisponde al presunto padre .

Bisogna comunque specificare che la percentuale di errore osservata non può essere considerata rappresentativa di un vero e proprio controllo statistico, in quanto si basa su diagnosi di parentela effettuate su commissione dell'ENCI o di privati, in casi che a monte presentano delle irregolarità. Ma questi risultati, rappresentano sicuramente una chiara indicazione e indicano l'importanza dell'applicazione di tale controllo per le iscrizioni delle cucciolate al libro genealogico e quindi per la selezione, la salute ed il benessere del cane di razza.

Fig. 4: Diagnosi di parentela su richiesta dell'Ente Nazionale della Cinofilia Italiana dal 1997 al 2003: la percentuale delle diagnosi negative è in media il 7,5 %. 2003 dati parziali



Conclusioni

Grazie a queste moderne tecniche molecolari, anche gli allevatori di cani hanno preso coscienza che esiste un metodo sicuro per poter riconoscere paternità e maternità errate. La percentuale di diagnosi negative si è decisamente ridotta negli anni con un quadro analogo a quello che è avvenuto in altre specie animali dove da più tempo si applicano queste tecnologie.

Con l'applicazione delle *norme tecniche del Libro Genealogico* la percentuale di soggetti da sottoporre ad analisi aumenterà considerevolmente e ciò porterà ad una migliore valorizzazione dei cani iscritti, la cui veridicità genealogica non ammetterà incertezze.

Per poter offrire all'utente un servizio più rapido e completo, nell'ambito Dell'Istituto di Zootecnica della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Milano, si è dato il via ad uno Spinoff, la *VETOGENE*, società collegata all'Università che offre agli allevatori di cani e alle Associazioni di Razza i suoi servizi di consulenza sulla genetica, sull'etologia del cane e sulle analisi del DNA.

Prossimamente ci occuperemo in queste pagine delle altre applicazioni di queste tecniche: eredità patologica, filogenesi, identificazione di caratteri morfologici e comportamentali.

Stiamo assistendo all'aprirsi di nuovi orizzonti di cui attualmente riusciamo a vedere una sola parte, ma auspichiamo che anche nel cane questi studi possano aumentare. Il limite principale al mappaggio del genoma canino è rappresentato soprattutto dagli scarsi finanziamenti. Infatti per il cane non esistono finanziamenti analoghi a quelli per l'uomo o altri animali, dove si è ottenuta una mappa ad alta risoluzione delle basi nucleotidiche che si susseguono nel genoma.

Bibliografia:

- Granucci F., Ricciardi-Castagnoli P. : I chip a DNA. Le Scienze quaderni 106
- Scherer S.W., Tsui L.: L'era del genoma. Articoli Roche 2001
- Filippini F., Valle G. Terzi M.: Bioinformatica e biologia molecolare. Articoli Roche 2001
- Watson J.D Hopkins., Roberts J.W., Argentsinger, Steiz, Weiner A.M. Biologia Molecolare del gene. Zanichelli 1989.
- Cribru E.P. La citogenetica del cane e le sue indicazioni. Summa 1997
- Poli G. Biotecnologia Ed.Grasso 1986
- Dog Map Genome Project (<http://mendel.berkeley.edu/>)
- M. Polli, S. Marelli, M. Zanotti, L.Guidobono Cavalchini (2000) Polymorphism of microsatellite loci and parentage identification in some Italian dog breeds XXVII International Conference on Animal Genetics (ISAG) Atti ISAG Minneapolis, USA 22- 27 Luglio 2000.

- Polli M, Marelli S, Mognaschi M, Zanotti Marta, Guidobono Cavalchini L (1999) Analisi preliminare delle relazioni filogenetiche di alcune razze canine italiane mediante microsatelliti. Atti del XXXIV Simposio di Zootecnia. Strumenti innovativi per la ricerca avanzata nelle produzioni animali. Milano 1-12-1999. Pag. 265-272
- Polli M, Marelli S, Mognaschi C, Zanotti M, e Guidobono Cavalchini L (1998) Determinazione genetica della parentela nel cane mediante microsatelliti. Atti 2° Congresso Nazionale Biotecnologie. Parma 1-3 luglio,; 142.
- Polli M, Del Bo L e Marelli S.P (1998) Analisi del DNA ed applicazioni in cinotecnica (1a parte). I Nostri Cani vol 1 24-27.
- Polli M. Marelli S.P Mognaschi M.C e Guidobono Cavalchini L (1998). Analisi del DNA ed applicazioni in cinotecnica (2a parte). I Nostri Cani vol 5 20-23.