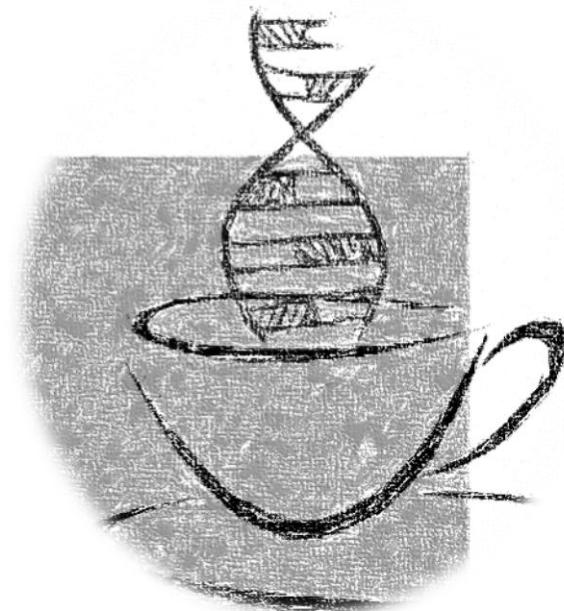


Un approccio integrato di genomica, modelling e metabolomica per il miglioramento genetico animale

Dr. Andrea Fulgione
andrea.fulgione@unina.it
Department of Agricultural Sciences
University of Naples Federico II





- 2011: Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari - Facoltà di Agraria - UNINA
- 2015: Dottorato di ricerca in Scienze Biotecnologiche - Scuola di Dottorato in Biotecnologie - UNINA
- 2015 - 2016: Borsista di ricerca - Dipartimento di Agraria - UNINA
- 2016 - 2017: Assegnista di ricerca - Dipartimento di Agraria - UNINA
- 2018 - 2019: Assegnista di ricerca - Dipartimento di Scienze e Tecnologie - Università degli Studi del Sannio
- 2019 - 2023: Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico - Dipartimento di Ispezione degli Alimenti - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

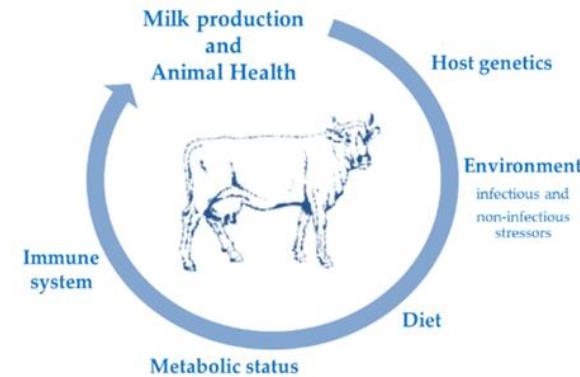
2023 - oggi: RTDA

SSD Zootecnia generale e miglioramento genetico (AGRI-09/A)

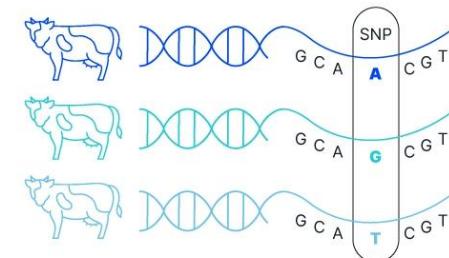
Docente del corso a scelta "Laboratorio di Immunogenetica e Sicurezza dei Prodotti di origine Animale" al CdL in SAFA



Miglioramento Genetico degli animali in produzione zootecnica volto ad aumentare l'efficienza e le qualità delle produzioni nel quadro di una zootecnia sostenibile



Tematiche di ricerca



- **MGA (1).** Selezione genetica per resistenza a malattie come brucellosi, tubercolosi, etc...
- **MGA (2).** Selezione genetica per caratteri qual-quantitativi dei prodotti di origine animale

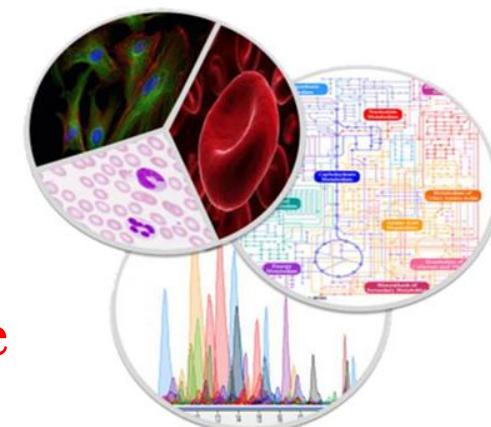


Selezione genetica per resistenza a malattie

Modelling. Insieme di metodi teorici e computazionali per rappresentare e/o simulare il comportamento delle strutture molecolari. Include Analisi di Dinamica Molecolare (MDS)

Metabolomica. Disciplina che studia l'insieme dei metaboliti, ovvero le piccole molecole che partecipano ai processi metabolici di un sistema biologico, come una cellula, un tessuto o un organismo

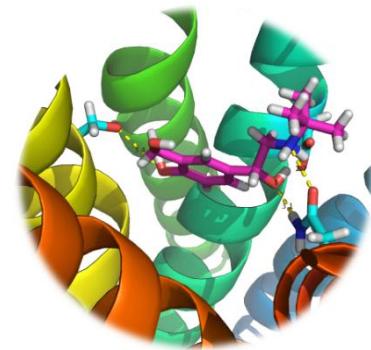
L'approccio combinato di genomica e modelling consente l'interpretazione funzionale delle variazioni genetiche, integrata dai dati metabolomici che completano la caratterizzazione dei processi biologici



LZerD Web Server

Modelling (MDS)

1. Identificazione della struttura tridimensionale determinata sperimentalmente, recuperata dal Protein Data Bank (database PDB)
2. Sistema riscaldato e pressurizzato fino alle condizioni desiderate
3. Avvio della simulazione fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico
4. Analisi dei risultati



Come si verifica se il sistema ha effettivamente raggiunto l'equilibrio termodinamico?



Parametri MDS

Parametri cinetici

- **Root Mean Square Deviation (RMSD).** Variazione delle posizioni degli atomi di una molecola rispetto ad una conformazione di riferimento
- **Root Mean Square Fluctuations (RMSF).** Movimento (fluttuazione) medio di uno specifico residuo aminoacidico
- **Radius of Gyration (RoG).** Compattezza della struttura

Parametri energetici

- **Energia cinetica.** Energia prodotta dal movimento della molecola
- **Eneriga potenziale.** Energia associata alla struttura della molecola
- **Legami a idrogeno (H-bond).** Numero di legami a idrogeno presenti nella molecola

Presentazione

MGA

MGA (1)

MGA (2)

Tracciabilità

Prospettive



IL-10 and IL-10 Receptor

Ambiente MDS

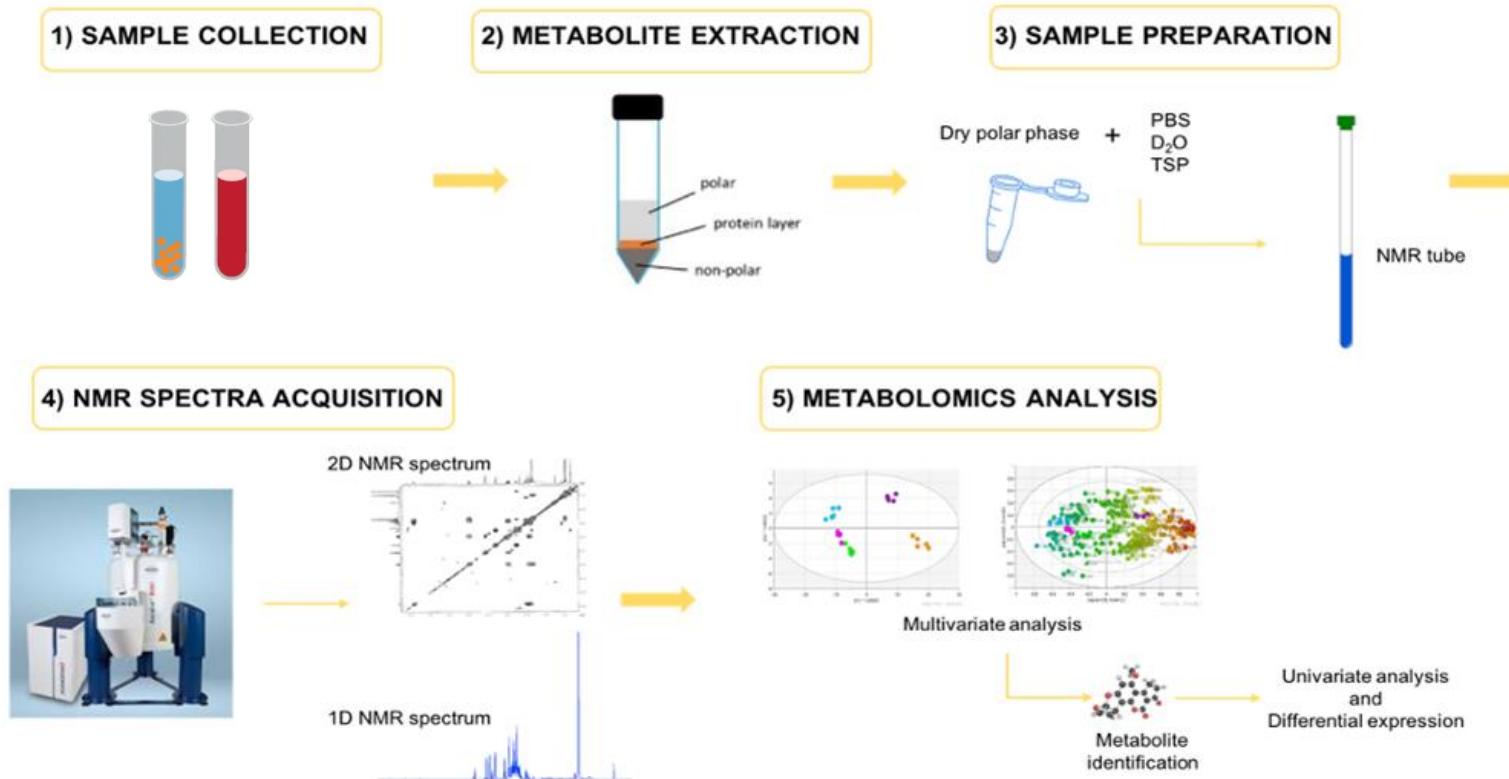
- Temperatura: 37C°
- Fluido: Acqua e ioni
- Pressione: 1 atm
- pH: 7.1
- Tempo: 10 ns
- Misurazioni: 2 fs



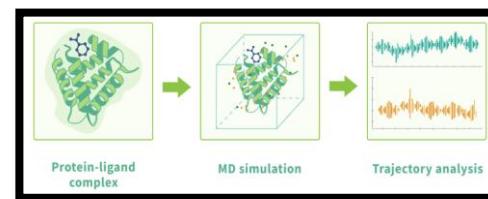
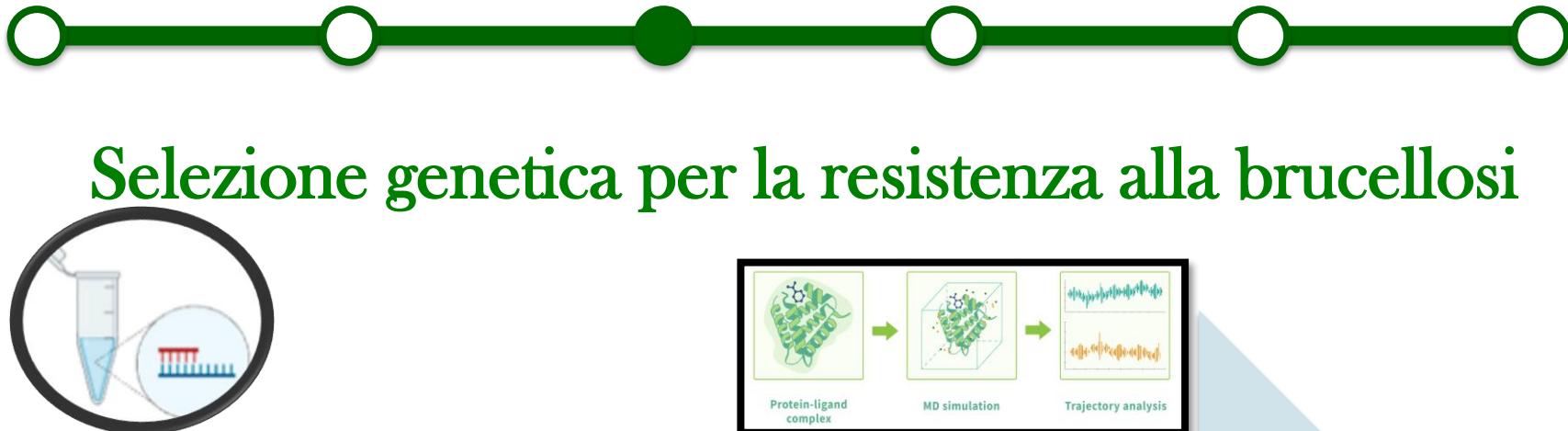
Parametri cinetici

Parametri energetici

Metabolomica



Rappresentazione schematica delle varie operazioni necessarie per eseguire l'analisi metabolomica

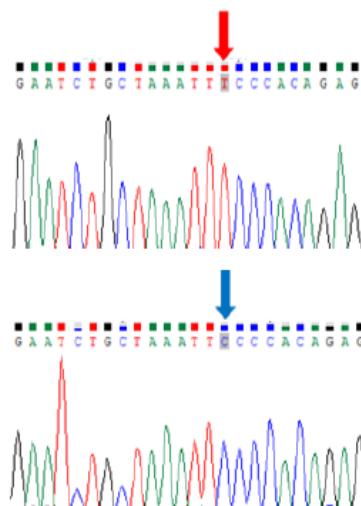


Campionamento
ed estrazione
DNA

Amplificazione e
sequenziamento

Analisi *in silico*

Genotipizzazione
e studio di
associazione



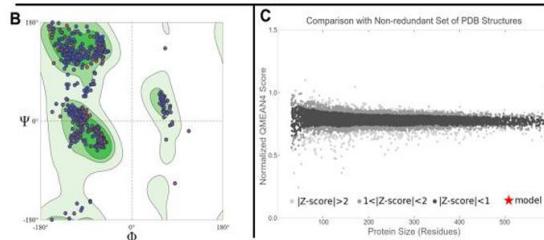
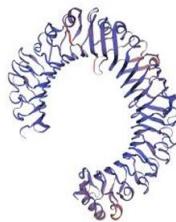
A

Fig. S1. bTLR4 homology modelling. Reconstruction of bTLR4 by using A) Swiss Model tool based on the crystallographic structure of the Human TLR4 (PDB id: 4g8a); B) Ramachandran plot and C) the Normalized QMEAN Score of the bTLR4 against a non-redundant set of PDB's structures.

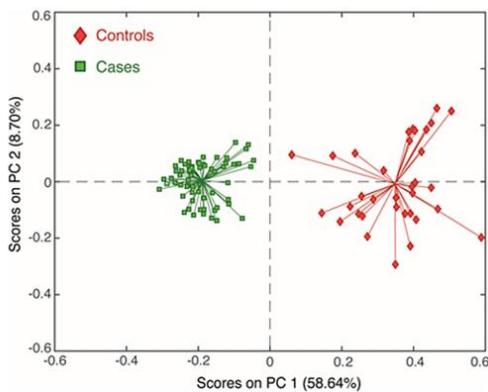


Fig. 6. PCA. PC1 vs. PC2 scores plot derived from the PCA model. Keys: controls group (red, diamonds); infected with *Brucella* group or cases (green, squares). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3Association of the TLR4 polymorphic sites with *B. abortus* infection.

Genes (protein substitution)	Status	Number of individuals in each genotype			Total	HWE (P)	Allelic frequency		OR (CI) ^a	P-value
		AA	AC	CC			Co ^b	Ra ^c		
TLR4 (K224N)	Cases	30	46	22	98	0.29 (0.58)	0.54	0.46	AA vs CC 0.41 (0.17–0.97)	0.041
	Controls	43	40	13		0.56 (0.45)	0.66	0.35		
			CG	GG						
TLR4 (R301T)	Cases	55	34	9	98	1.18 (0.27)	0.73	0.27	GGvs CC 0.36 (0.15–0.83)	0.033
	Controls	44	32	20		8.01 (0.004)	0.63	0.37		

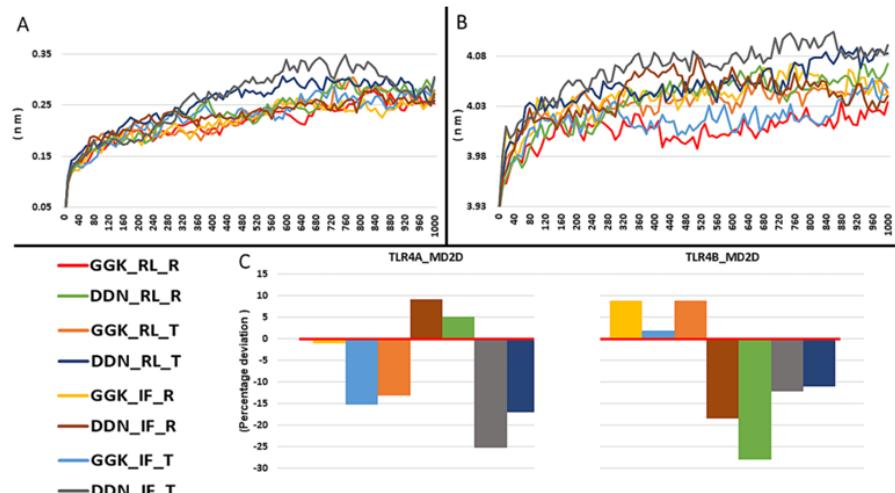
^a CI (confidence intervals).^b Common alleles (TLR4 (c.672 A > C); A; TLR4 (c.902C > G); C).^c Rare alleles (TLR4 (c.672 A > C); C; TLR4 (c.902C > G); G).

Fig. 3. TLR4 polymorphisms effects. Effect of SNPs on TLR4 protein activity. RMSD (A) and RoG (B) analyses of the bTLR4/bTLR4-MD2 reference complex (red) and the mutagenized ones during 1 ns simulation. (C) Represents the average number, reported as percentage difference from the reference complex, of H-bonds between the bTLR4 (chains A or B) and the MD2 during 1 ns of simulation. The reference complex was GGK_RL_R. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



TLR2 e resistenza alla brucellosi

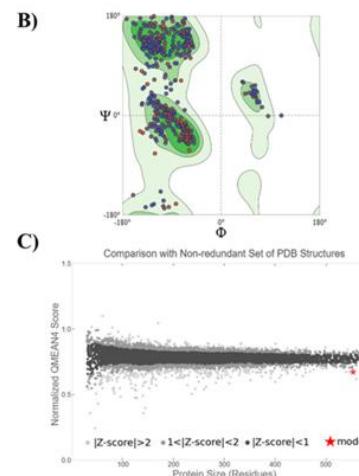
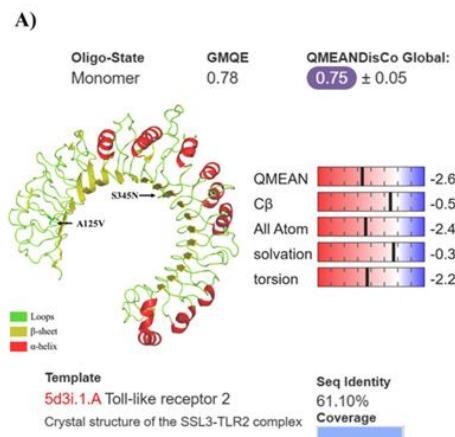


Fig. 2 *Bubalus bubalis* TLR2 (bTLR2) structure. (A) Reconstruction of bTLR2 by Swiss Model tool. It shows the predicted 3D structure of bTLR2, generated by homology modelling using the human TLR2 crystallographic structure (PDB: 5d3i.1.A). (B) Ramachandran plot of bTLR2 model. (C) Normalized QMEAN Score of bTLR2 with a non-redundant set of PDB structures.

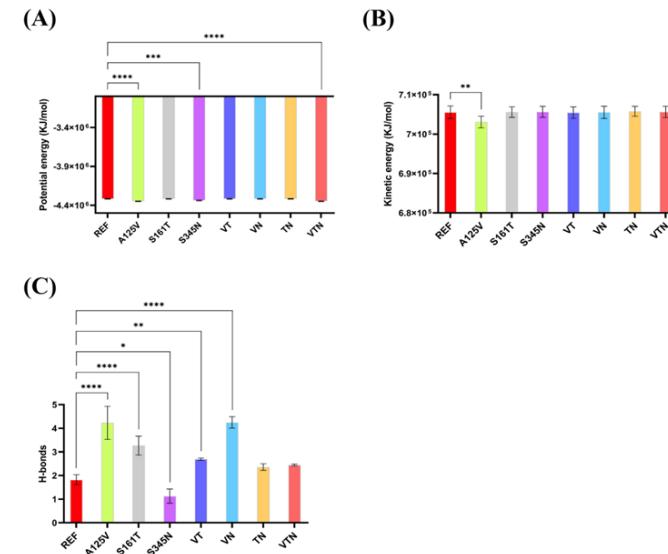


Fig. 4 MDS analysis. Effects of polymorphisms on bTLR2 protein activity evaluated by (A) potential energy, (B) kinetic energy and (C) number of hydrogen bonds of the bTLR2/bTLR1 reference (REF) and mutagenized complexes during 1 ns of simulation.

Table 4 Association of the TLR2 polymorphic sites with *B. abortus* infection

Genes (SNPs)	aa substitution	Status	Number of individuals in each genotype			Total	HWE (p-value)	Total number of alleles	OR (CI) ^a	P-value
			CC	CT	TT					
<i>TLR2</i> (c.374C>T)	A125V	Cases	59	36	3	98	0.80 (0.36)	154	42	0.61 (0.39–0.97) 0.037
		Controls	49	35	12	96	1.98 (0.15)	133	59	
<i>TLR2</i> (c.1034G>A)	S345N	Cases	19	55	24	98	1.54 (0.21)	93	103	1.33 (0.90–1.98) 0.154
		Controls	31	43	22	96	0.89 (0.34)	105	87	

^a CI (confidence intervals)



Progetti

- PON01_00486. Sequenziamento del GENOma BUfalino per il miglioramento quali-quantitativo delle produzioni agro-alimentari (GENOBU). Finanziato dal Ministero dell'Università e della Ricerca
- Ricerca Corrente 2024 (IZS ME 09/24 RC). Approccio informatico (*in silico* trials) nello studio della Tubercolosi nei Ruminanti: valutazione dell'effetto degli SNPs sull'attività del TLR2 e loro ruolo nella suscettibilità all'infezione da *Mycobacterium bovis* e ricerca dei geni di virulenza in ceppi di *M. bovis* isolati. Finanziato dal Ministero della Salute, Dipartimento della salute umana, della salute animale e dell'ecosistema (ONE HEALTH)



Selezione genetica per caratteri quali-quantitativi dei prodotti di origine animale: latte

- Identificazione e caratterizzazione di geni candidati per il miglioramento quali-quantitativo delle produzioni animali
- Individuazione di variabilità genetica a tali *loci* e analisi di possibili associazioni tra polimorfismi individuati e tratti fenotipici di interesse (es. quantità di latte, contenuto in proteine e grasso, etc..)



Queste strategie consentono di comprendere meglio la base genetica della produzione lattiera e di applicare una selezione mirata per migliorare la qualità e la quantità del latte



Selezione genetica nelle diverse specie.....

➤ Analisi del gene *CSN3* (Casein Kappa) ed associazione dello SNP c.536C>T con la produzione di latte in Bufale mediterranee italiane allevate in Campania. In collaborazione con Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari - UNITO.



➤ Caratterizzazione del gene *CSN1S2* (Casein-as2) in *Camelus bactrianus* e *Camelus dromedarius*. In collaborazione con Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari - UNITO.



➤ Analisi del gene *DGAT1* (DiacylGlycerol AcylTransferase 1), ed associazione dello SNP g.5553C>T del gene con tratti fenotipici quali contenuto di grasso e proteine nel latte della pecora Bagnoise. In collaborazione con Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali - UNINA.



Selezione genetica per caratteri quali-quantitativi del latte. RNA-seq

- Campioni di latte raccolti da 8 bufale
- Suddivisione in 2 gruppi (4 soggetti ciascuno):
 - Alta produzione di latte
 - Bassa produzione di latte
- Gruppi selezionati a parità di tenore in grasso e proteine del latte
- Analisi RNA-Seq eseguita per identificare i geni differenzialmente espressi tra i due fenotipi produttivi



Selezione genetica per caratteri quali-quantitativi associati al latte nella Bufala Mediterranea Italiana

- Selezione di 300 bufale Mediterranee italiane provenienti da aziende della provincia di Salerno e Caserta; comparabili per età, regime alimentare, ordine di lattazione. La selezione è stata effettuata in base ai dati ufficiali dei controlli funzionali/EBV per produzione latte, tenore in grasso e proteina, raccolti per la lattazione corrente e per quelle precedenti, disponibili presso l'ANASB
- Genotyping effettuato in outsourcing mediante sistema KASP (Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system)

Lo scopo dello studio è l'individuazione di marcatori associati a tratti fenotipici come resa e qualità del latte, resistenza a patologie, performance riproduttive, etc...

Presentazione

MGA

MGA (1)

MGA (2)

Tracciabilità

Prospettive



Selezione genetica per caratteri quali-quantitativi associati al latte nella Bufala Mediterranea Italiana

Sono stati analizzati 2 SNPs per ciascuno di 30 geni candidati/associati alla variabilità quali-quantitativa del latte, resistenza a patologie, resilienza a stress abiotici, performance riproduttive



Selezionando geneticamente animali con caratteristiche produttive e qualitative superiori e integrando i dati genomici nella filiera, si rafforza la trasparenza e la tracciabilità dei prodotti di origine animale, offrendo al consumatore un valore aggiunto di origine e qualità

Tracciabilità

Secondo il Codex Alimentarius 2006, la tracciabilità deve essere in grado di identificare a qualsiasi punto della catena alimentare (dalla produzione alla distribuzione) da dove proviene il cibo (one step back) e dove il cibo sia diretto (one step forward), in maniera conforme agli obiettivi dell’ispezione alimentare e della certificazione dei sistemi produttivi



Il settore lattiero-caseario



- Diverse tipologie di formaggio sono riconosciute come DOP in base al Regolamento UE 1151/2012, a patto che rispettino i disciplinari di produzione. Una frode molto comune dei prodotti lattiero-caseari è la non dichiarata sostituzione o aggiunta di latte di basso valore commerciale a causa delle differenze di prezzo e della disponibilità stagionale
- Ad esempio, il latte di bufala ha un elevato tenore in grasso e proteine rispetto al latte vaccino ed è utilizzato per la produzione di Mozzarella di Bufala Campana (certificata con PDO secondo Regolamento CE 1107/96 del 12 Giugno 1996). Data la continua e crescente richiesta di questo prodotto alimentare, le pratiche fraudolente che prevedono aggiunta di latte di altra specie è diventata un'attività illecita sempre più praticata



Tracciabilità molecolare

Sviluppo di una metodica di Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) più sensibile e di rapida esecuzione, utile ad individuare, inequivocabilmente, la presenza di quantità anche minime di un qualsiasi tipo di latte di diversa natura da quello previsto nel prodotto finito

Inserzioni/Delezioni specifiche (InDel)

	5	10	15	20	
Reference sequence	...	GGATTCTAGGTAAC	TCA	GTCGA...	
SNP	Allele 1	...	GGATTCTAGGTAAC	TCA	GTCGA...
	Allele 2	...	GGATTTC	CAGGTAAC	TCA
Indel A	Allele 1	...	GGATTCTAGGTAAC	TCA	GTCGA...
	Allele 2	...	GGATTCTAGGG	GGTAAC	TCA
Indel B	Allele 1	...	GGATTCTAGGTAAC	TCA	GTCGA...
	Allele 2	...	GGAT	--CTAGGTAAC	TCA

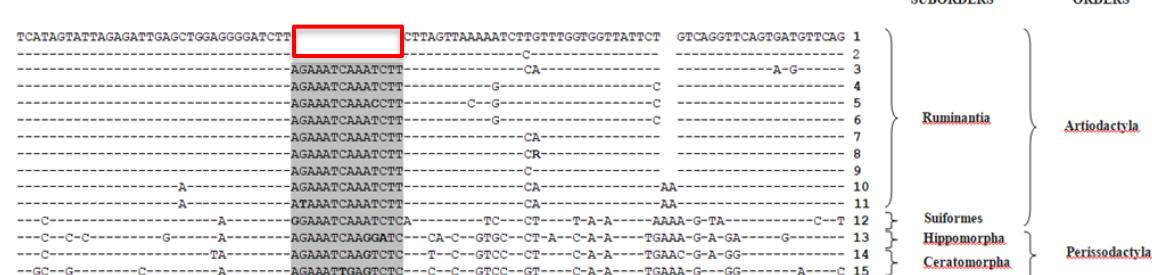


InDels

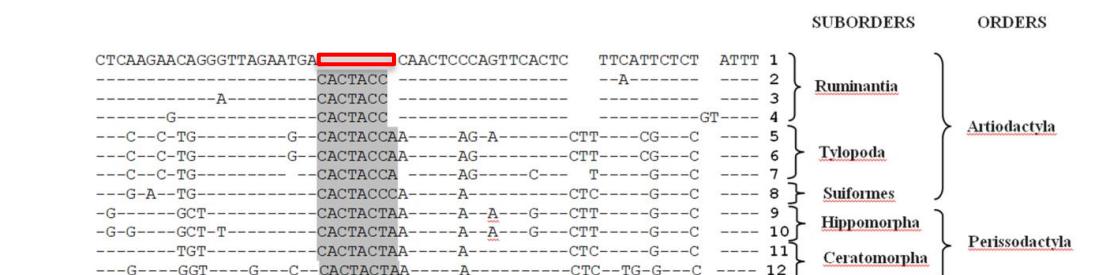
- Al fine di individuare Insertions/Deletions specie-specifiche (SPInDel), le sequenze genomiche di tutte le specie appartenenti agli ordini *Artiodactyla* and *Perissodactyla* disponibili in GeneBank sono state allineate per i geni candidati per la variabilità di caratteri quali carne e latte. Parallelamente è stata condotta una intensa indagine bibliografica
- Individuazione di InDels specifici ai loci *CSN1S2*, *CSN1S1*, *MSTN* e *PRLR* rispettivamente per *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis*



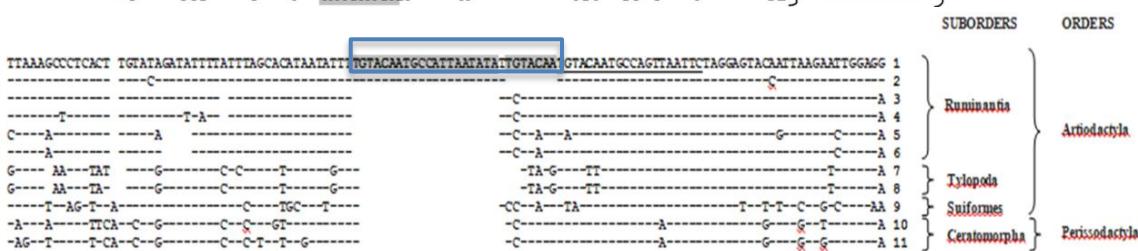
InDels



Allineamento sequenza nucleotidica parziale dell'introne 1 del gene *CSN1S2* in specie rappresentative appartenenti agli ordini *Artiodactyla* e *Perissodactyla*



Allineamento sequenza nucleotidica parziale dell'esone 10 del gene *PRLR* in specie rappresentative appartenenti agli ordini *Artiodactyla* e *Perissodactyla*



Allineamento sequenza nucleotidica parziale del promotore del gene *CSN1S1* in specie rappresentative appartenenti agli ordini *Artiodactyla* e *Perissodactyla*



Allineamento sequenza nucleotidica parziale dell'introne 1 del gene *MSTN* in specie rappresentative appartenenti agli ordini *Artiodactyla* e *Perissodactyla*



Presentazione

MGA

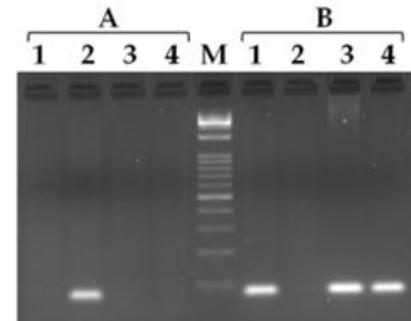
MGA (1)

MGA (2)

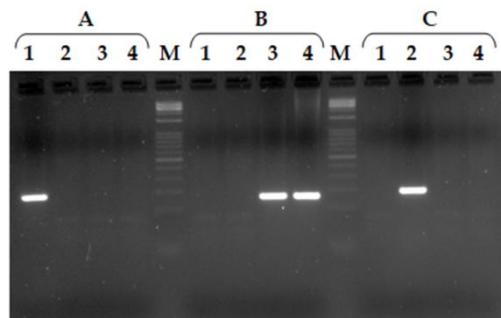
Tracciabilità

Prospettive

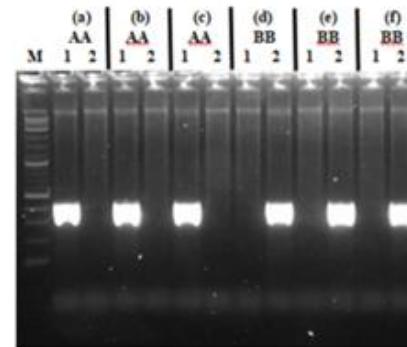
InDels



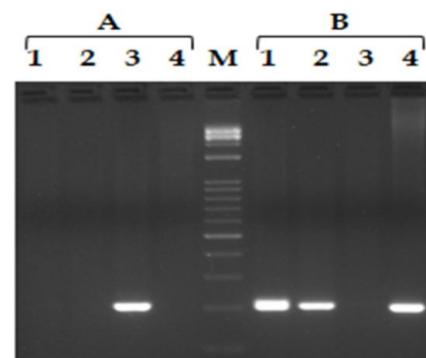
AS-PCR InDel (14 bp, AGAAATCAAATCTT) presente nell'introne 1 del gene *CSN1S2*. (A), delezione di 14bp; (B), inserzione di 14 bp in *Capra hircus* (1), *Ovis aries* (2), *Bos taurus* (3), and *Bubalus bubalis* (4)



AS-PCR InDel presente nella regione 5'UTR del gene *CSN1S1*: (A), inserzione 28 bp (TGTACAATGCCATTAATATATTGTACAA); (B) delezione 20 bp (TGTACAATGCCATTAATATA); (C) delezione 7 bp in *Capra hircus* (1), *Ovis aries* (2), *Bos taurus* (3), e *Bubalus bubalis* (4)



AS-PCR InDel (7 bp, CACTACC) presente nell'esone 10 del gene *PRLR* in (a) *Bubalus bubalis* razza Mediterranea, (b) Murrah e (c) Mehsana, (d) *Capra hircus*, (e) *Ovis aries* e (f) *Bos taurus*. AA, omozigote per la delezione CACTACC; BB, omozigote per l'inserzione CACTACC. 1, coppia primer delezione CACTACC; 2, coppia primer per inserzione CACTACC



AS-PCR InDel (16 bp, GAGTAGGTTATGGCTT) presente nell'introne 1 del gene *MSTN*: (A), delezione di 16bp; (B), inserzione di 16 bp in *Capra hircus* (1), *Ovis aries* (2), *Bos taurus* (3), and *Bubalus bubalis* (4)

Presentazione

MGA

MGA (1)

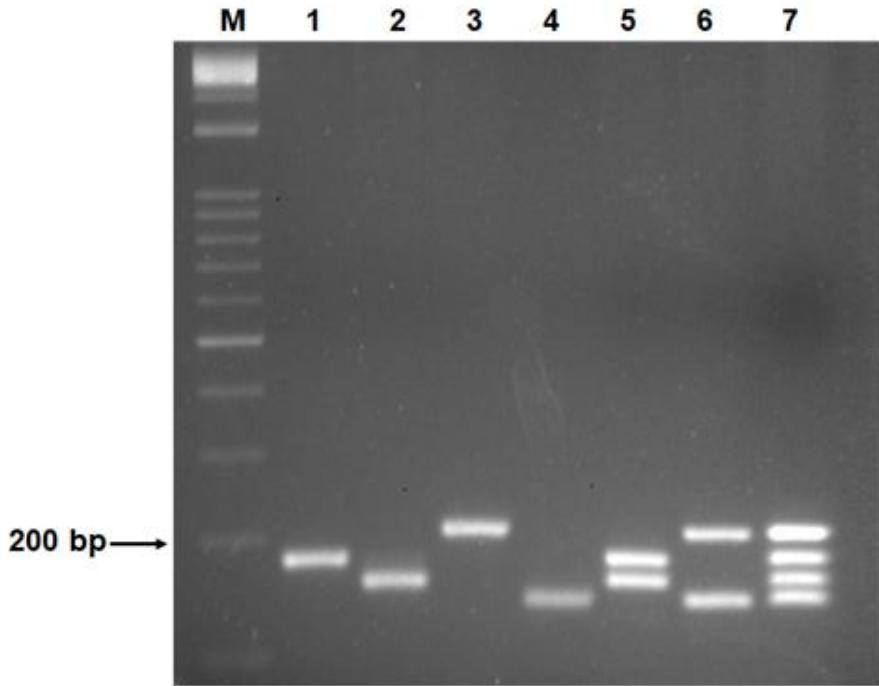
MGA (2)

Tracciabilità

Prospettive



InDels. Tetraplex Specie-Specific PCR



Elettroforesi su gel di agarosio di ampliconi ottenuti dalla TetraS-PCR, utilizzando DNA di 1) *Capra hircus* (183 bp); 2) *Ovis aries* (162 bp); 3) *Bos taurus* (211 bp); 4) Mediterranean river buffalo (144 bp). Ampliconi prodotti da miscele di DNA di 5) *Capra hircus* e *Ovis aries*; 6) Mediterranean river buffalo e *Bos Taurus*; 7) Mediterranean river buffalo, *Bos taurus*, *Capra hircus*, e *Ovis aries*.

Lo scopo dello studio è stato lo sviluppo di una metodica di discriminazione simultanea della presenza di DNA proveniente da *Bubalus bubalis*, *Bos taurus*, *Capra hircus* e *Ovis aries* in prodotti di origine animale siano questi latte, carne e derivati



Tracciare per conoscere, conoscere per andare.....

La delezione di 16 bp al locus *MSTN*, specifica di *Bos taurus*, permette di distinguere questa specie da *Bos indicus* e dagli incroci, offrendo uno strumento efficace per l'autenticazione della carne e la tutela della qualità e della fiducia dei consumatori



VS



Alcuni sistemi di etichettatura escludono la carne di zebù, rendendo fondamentali metodi di identificazione specie-specifici per garantire autenticità e fiducia del consumatore

**La sfida della bresaola:
addio allo zebù, torna la carne italiana**

Jenner Melatti





Prospettive future

- Integrazione di dati genomici, metabolomici e fenotipici per identificare marcatori associati a tratti complessi (resilienza, efficienza alimentare, qualità dei prodotti)
- Sviluppo di algoritmi predittivi per stimare il valore genetico e fenotipico individuale
- Simulazioni predittive per ottimizzare strategie di selezione

Verso una selezione genetica integrata e sostenibile, in grado di migliorare il potenziale produttivo, la resilienza e il benessere animale



**Grazie
per
l'attenzione!**

**Domande? E' tempo
per farle!**



Referenze bibliografiche

- Fulgione A, Gentile A, Iovane V, Peretti V, Montone AMI, Pauciullo A and Capparelli R. *TLR2 c.374C>T* variant linked to natural resistance against brucellosis in Italian Mediterranean river buffalo. *BMC Vet Res.* 2025 Oct 21;21(1):625. doi: 10.1186/s12917-025-05067-2.
- Cosenza G, Fulgione A, Albarella S, Ciotola F, Peretti V, Gallo D, Pauciullo A. Identification and Validation of Genus/Species-Specific Short InDels in Dairy Ruminants. *BMC Vet Res.* 2025 Mar 28; 21(1): 215. doi: 10.1186/s12917-025-04694-z.
- Gentile A, Fulgione A, Auzino B, Iovane V, Gallo D, Garramone R, Iaccarino N, Randazzo A, Iovane G, Cuomo P, Capparelli R, Iannelli D. In vivo biological validation of in silico analysis: A novel approach for predicting the effects of TLR4 exon 3 polymorphisms on brucellosis. *Infect Genet Evol* 2024 Jan 11; 118: 105552. doi: 10.1016/j.meegid.2024.105552.
- Pauciullo A, Versace C, Gaspa G, Letaief N, Bedhiaf-Romdhani S, Fulgione A, Cosenza G. Sequencing and Characterization of α s2-Casein Gene (CSN1S2) in the Old-World Camels Have Proven Genetic Variations Useful for the Understanding of Species Diversification. *Animals (Basel).* 2023 Sep 4; 13(17): 2805. doi: 10.3390/ani13172805
- Pugliano MG, Cosenza G, D'Anza E, Fulgione A, Murru N, Di Paolo M, Albarella S, Peretti V, Ciotola F. Milk traits characterization and association studies with DGAT1 polymorphisms in Bagnoles sheep. *Anim Biosci.* 2025 May; 38(5): 863-872. doi: 10.5713/ab.24.0323.
- Ashokan M, Rana E, Sneha K, Namith C, Naveen Kumar GS, Azharuddin N, Elango K, Jeyakumar S, Ramesha KP. Metabolomics-a powerful tool in livestock research. *Anim Biotechnol* 2023 Dec;34(7):3237-3249. doi: 10.1080/10495398.2022.2128814.

PROSSIMO SEMINARIO



10 Dicembre 2025 (Aula Magna DMVPA)



Speakers

Dott.ssa Piera Iommelli e Dott.ssa Marta Iommelli



Piante medicinali: antichi rimedi, nuove frontiere