



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

ATTIVITÀ DI CONSULENZA TECNICO-SCIENTIFICA NELL'AMBITO DEL PROGETTO DUALBREEDING "LE RAZZE BOVINE A DUPLICE ATTITUDINE: UN MODELLO ALTERNATIVO DI ZOOTECNIA ECO-SOSTENIBILE" – PSRN PROGRAMMA DI SVILUPPO RURALE NAZIONALE 2014/2020 – SOTTOMISURA 10.2 - SOSTEGNO PER LA CONSERVAZIONE, L'USO E LO SVILUPPO SOSTENIBILI DELLE RISORSE GENETICHE IN AGRICOLTURA – ATTIVITÀ DI CARATTERIZZAZIONE DELLE RISORSE GENETICHE ANIMALI DI INTERESSE ZOOTECNICO E SALVAGUARDIA DELLA BIODIVERSITÀ

Unità del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Sassari

Relazione tecnico-scientifica sullo stato di avanzamento delle attività del progetto a

Luglio 2019.

1) Analisi della diversità genetica fra razze bovine oggetto del progetto

DualBreeding

Dataset utilizzato

Sono stati utilizzati tutti gli animali genotipizzati con il chip HD (esclusi marcatori non mappati o mappati sui cromosomi sessuali) appartenenti alle 13 razze seguenti:

- Burlina (BUR, cod. = 19)
- Cabannina (CAB, cod. = 62)
- Cinisara (CIN, cod. = 96)
- Garfagnina (GAR, cod. = 58)
- Grigio Alpina (GAL, cod. = 11)



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

- Modicana (MOD, cod. = 8)
- Pezzata Rossa (PRI, cod. = 4)
- Pinzgauer (PZG, cod. = 14)
- Pustertaler (PUS, cod. = 77)
- Rendena (REN, cod. = 10)
- Valdostana Castana (CAST, cod. = 61)
- Valdostana Pezzata Nera (VPN, cod. = 18)
- Valdostana Pezzata Rossa (VPR, cod. = 3)

Calcolo diversità genetica

Ciascuna razza è stata confrontata singolarmente con le altre 12 tramite l'indice di fissazione di Wright (FST) calcolato secondo l'equazione di Weir (1996) utilizzando il programma GCTA. Il totale dei confronti eseguiti è stato di 156 (13 razze * 12 confronti). Ai valori grezzi di FST è stata applicata la LOWESS, una tecnica di regressione locale pesata: il parametro di *smoothing*, diverso per ogni cromosoma, è stato scelto in modo tale da applicare la regressione in finestra di 20 SNPs (quindi il parametro di *smoothing* è stato ottenuto dividendo 20 per il numero di marcatori di ciascun cromosoma). Per identificare i marcatori molecolari significativi è stato adottato il cosiddetto approccio CONTROL CHART: uno SNP è stato considerato significativo se il suo valore predetto dalla LOWESS superava di tre deviazioni standard la media dei valori cromosomici. Questi marcatori sono stati definiti *outliers* e salvati in una lista dei marcatori che differenziano dal punto di vista genetico le due razze coinvolte in ciascuna confronto. Ciascuno dei 156 confronti eseguiti è stato raffigurato mediante l'utilizzo di grafici Manhattan plots.

Marcatori razza-specifici

È stato tentato un approccio per la ricerca di marcatori razza-specifici, ossia un marcatore che risultava outlier in ciascun confronto di una razza contro le altre.



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Sono stati individuati dei marcatori solo per le razze Grigio Alpina e Rendena (Tabella 1).

Tabella 1. Marcatori significativi (outliers) in tutti i confronti riguardanti le razze Grigio Alpina e Rendena.

Razza	Cromosoma	Nome SNP	Posizione
Grigio Alpina	12	ARS-BFGL-BAC-16287	43,551,814
	12	BTA-21437-no-rs	43,601,825
	15	BovineHD1500024705	84,238,552
	15	BovineHD1500024714	84,254,145
	15	ARS-BFGL-NGS-102526	84,263,215
	15	BovineHD1500024724	84,289,282
	15	BovineHD1500024727	84,301,534
	15	BovineHD1500024737	84,331,461
	15	UA-IFASA-4389	84,338,289
Rendena	1	BovineHD0100041750	144,694,194
	1	ARS-BFGL-NGS-119891	144,704,305
	1	BovineHD0100041768	144,721,018
	1	ARS-BFGL-NGS-103161	144,733,397
	1	BovineHD0100041779	144,741,702



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria
Viale Italia 39, 07100 Sassari
Partita IVA 00196350904

2) Analisi dell'inbreeding calcolato con diverse categorie di lunghezza delle regioni di omozigosi

Descrizione delle regioni di omozigosi (*runs of homozygosity*)

(da Cesarani, 2015)

Per "run of homozygosity" (ROH) si intende una porzione del genoma priva di eterozigotità nello stato diploide. Questa regione è costituita da un lungo ed ininterrotto tratto di DNA in cui le due coppie di alleli sono identiche perché probabilmente ereditate da un antenato comune; ne consegue che, se in una data popolazione, avvengono accoppiamenti fra individui imparentati, aumenterà la porzione di ROH nel genoma della discendenza. Tale fenomeno sarà caratterizzato da più frequenti e lunghe porzioni di omozigotità che, a sua volta, non sarà privo di conseguenze nello sviluppo della specie. Non va dimenticato che le ROH possono essere considerati segmenti di DNA con tratti ininterrotti di loci omozigoti in un individuo, ma polimorfici nella popolazione di appartenenza dell'individuo stesso. L'interesse verso le ROH prende avvio dagli studi pionieristici di Browman & Weber (1999) che hanno identificato mediante lo studio di STR delle regioni di omozigosi; solo successivamente, Gibson et al. (2006) mette in evidenza la frequente presenza di questa caratteristica in diversi genomi umani di popolazioni non consanguinee. Successivamente sono stati studiati gli aspetti genetici delle ROH sia in individui sani sia in relazione alla loro eventuale associazione con malattie multifattoriali. È evidente l'importanza di questi studi da un punto di vista medico in quanto un aumento di ROH induce una maggiore probabilità di incorrere nella comparsa di varianti recessive su entrambe le coppie del genoma di un individuo, con conseguente espressività di una malattia genetica (Ku et al., 2011).

Questo stesso rischio è prevedibile anche negli animali da allevamento in cui l'aumento dei livelli di consanguineità avrà come esito da un lato la diminuzione della variabilità genetica e, dall'altro lato, un possibile aumento dell'incidenza di malattie genetiche rare. Non solo, ma



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

ne potrebbe derivare perfino una riduzione della produttività degli animali che, a sua volta, potrebbe indurre ad un calo della redditività degli allevamenti.

Il tasso di consanguineità all'interno delle specie di interesse zootecnico è in aumento a causa della sempre più frequente scelta dell'inseminazione strumentale con il ripetuto utilizzo dei migliori riproduttori e il conseguente rischio di inseminazione di femmine consanguinee. Grazie allo studio delle ROH è possibile conoscere il grado di parentela fra due individui allo scopo di evitarne l'accoppiamento che potrebbe causare, oltre ai già citati fenomeni, la comparsa della cosiddetta depressione da consanguineità: si tratta di un aspetto già conosciuto da tempo nel settore zootecnico, specialmente nei bovini da latte, e che porta sia ad un aumento morbilità, sia ad una diminuzione della fertilità con ripercussioni negative sul ciclo vitale degli animali e sulla loro resa produttiva (McParland et al., 2007).

Ancora, l'analisi dei ROH può essere utilizzata all'interno dello studio della genetica di popolazione per analizzare la distanza fra le diverse razze di una specie: più le razze sono geneticamente lontane fra loro, minore sarà l'omogeneità dei tratti di ROH. I segmenti di omozigosi ROH sono molto più comuni nelle regioni con alto *linkage disequilibrium* e bassa ricombinazione, secondo quanto sostenuto da Gibson et al. (2006). Vale la pena sottolineare come la presenza di ROH in un individuo è causata da eventi di consanguineità, ma queste regioni di genoma, come riportato negli studi di Gaspa et al. (2014), si possono trovare anche in popolazioni outbreed dove sono causati evidentemente da fattori di altra natura. Non va trascurato, infatti, che la presenza di una ROH in un individuo non implica necessariamente che questa regione sia stata ereditata da un antenato comune senza ricombinazione.

Se, come già detto in precedenza, lo studio dei ROH nell'uomo si è concentrato sulla loro associazione con la comparsa di malattie, viceversa negli animali domestici questi sono stati studiati in particolare per analizzare gli effetti della selezione recente operata dall'uomo e per misurare i coefficienti di inbreeding molecolari. Il coefficiente di inbreeding è definito come la probabilità di estrarre a caso due alleli uguali per discendenza mendeliana dallo stesso locus di due individui diversi (Wright, 1922). L'inbreeding è inevitabile nelle popolazioni animali



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

sotto selezione in quanto usando pochi riproduttori si ottiene un aumento del tasso di consanguineità. La caratteristica delle ROH forse più importante è la lunghezza, perché mediante la sua analisi si può prevedere quanto tempo prima è avvenuto l'accoppiamento fra individui parenti: ROH lunghe sono indice di inbreeding recente, mentre le ROH più corte sono il risultato di avvenimenti lontani nel tempo in quanto il passare delle generazioni ed eventi come il *crossing-over* hanno spezzato le ROH più lunghe riducendole a brevi segmenti. Va precisato che due alleli possono essere uguali per due ragioni: per stato, quando non sono copie che derivano da un antenato comune identificabile, oppure per discendenza, quando sono copie dello stesso allele individuabile in un antenato comune. Mediante l'utilizzo delle ROH è possibile stimare la frazione di geni allo stato omozigote, a differenza delle tecniche che si stimano le frazioni medie attese, basandosi sul pedigree. L'approccio delle ROH per il calcolo dei coefficienti di inbreeding risulta fondamentale quando le genealogie non sono note, o sono poco accurate.

Materiali e Metodi

Per questa analisi sono stati utilizzati 1,505 animali genotipizzati con il BeadChip HD in cui sono stati trattenuti tutti i marcatori in comune tra le razze. Le razze utilizzate (13) e il numero di animali per razza sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Razze e animali per ogni razza coinvolti nello studio.

Nome razza	Sigla	Codice razza	N° animali
Valdostana Pezzata Rossa	VPR	3	32
Reggiana	REG	7	48
Modicana	MOD	8	244
Rendena	REN	10	127
Grigio Alpina	GRA	11	181
Pinzgauer	PZG	14	85
Valdostana Pezzata Nera	VPN	18	112
Burlina	BUR	19	20



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Garfagnina	GAR	58	32
Valdostana Castana	CAST	61	231
Cabannina	CAB	62	8
Pustertaler/Barà	PUS	77	201
Cinisara	CIN	96	200

Utilizzano il software Zanardi sono state calcolate le ROH con i seguenti parametri:

- almeno 15 marcatori omozigoti consecutivi;
- nessun eterozigote o missing ammesso nella ROH;
- lunghezza minima di 1, 2, 4, 8 e 16 milioni di paia di basi.

Una volta identificate, le ROH sono state utilizzate per calcolare il coefficiente di inbreeding (FROH) per ogni animale, attraverso il rapporto fra la somma delle ROH per animale e la lunghezza del genoma in paia di basi. Un FROH uguale a 15 significa che il 15% del genoma di un animale è ricoperto da regioni di omozigosi (ROH).

Risultati

Nelle Tabelle dal numero 2 al numero 6 sono riportati i risultati dell'analisi delle ROH condotte utilizzando la lunghezza minima di 1, 2, 4, 8 e 16 Mbp. Il numero di animali che presentavano regioni di omozigosi variava a seconda della lunghezza minima:

- 1 Mbp = 1,505 animali
- 2 Mbp = 1,422 animali
- 4 Mbp = 1,288 animali
- 8 Mbp = 1,079 animali
- 16 Mbp = 537

La razza Garfagnina ha mostrato il valore di inbreeding medio più elevato in tutte e 5 le classi di lunghezza considerate.



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Tabella 2. Risultati dell'analisi delle regioni di omozigoti utilizzando 1 milioni di paia di basi come lunghezza minima per identificare una ROH.

Nome razza	N° animali	Media	DS	Massimo
Garfagnina	30	16.3	9.93	36.4
Rendena	127	10.4	2.39	18.5
Valdostana Pezzata Rossa	32	7.91	1.52	10.6
Valdostana Castana	231	6.49	1.91	16
Grigio Alpina	181	6.14	1.61	11.7
Valdostana Pezzata Nera	112	6.05	2.49	16.8
Reggiana	48	6.01	2.22	12.29
Pinzgauer	85	5.83	2.77	14.5
Pustertaler/Barà	199	5.82	4.69	30.4
Burlina	20	5.76	3.49	16.2
Cabannina	8	5.57	4.86	16.4
Modicana	243	4.29	4.53	21.9
Cinisara	189	3.43	4.2	32.3

Tabella 3. Risultati dell'analisi delle regioni di omozigoti utilizzando 2 milioni di paia di basi come lunghezza minima per identificare una ROH.

Nome razza	N° animali	Media	DS	Massimo
Garfagnina	28	15.8	9.20	35.2
Rendena	127	8.66	2.36	16.9
Valdostana Pezzata Rossa	32	5.61	1.39	8.03
Reggiana	48	5.25	2.10	11.46
Pinzgauer	84	4.83	2.60	13.4
Grigio Alpina	181	4.76	1.60	10.6
Pustertaler/Barà	190	4.76	4.51	29.2
Burlina	20	4.58	3.41	14.7
Cabannina	8	4.58	4.81	15.4
Valdostana Castana	231	4.24	1.84	13.8
Valdostana Pezzata Nera	111	3.97	2.39	14.9
Modicana	205	3.66	4.13	20
Cinisara	158	3.16	4.03	29.7



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Tabella 4. Risultati dell'analisi delle regioni di omozigoti utilizzando 4 milioni di paia di basi come lunghezza minima per identificare una ROH.

Nome razza	N° animali	Media	DS	Massimo
Garfagnina	27	13.40	8.21	31.5
Rendena	127	6.39	2.25	14.4
Reggiana	48	5.11	2.28	12.29
Pustertaler/Barà	173	4.04	4.15	27.4
Modicana	126	4.03	3.16	15.6
Burlina	18	3.90	2.98	12.5
Pinzgauer	83	3.60	2.19	10.8
Valdostana Pezzata Rossa	32	3.60	1.27	5.8
Cabannina	8	3.58	4.49	13.9
Grigio Alpina	181	3.48	1.48	9.07
Cinisara	129	2.77	3.46	23.4
Valdostana Castana	229	2.40	1.64	12.2
Valdostana Pezzata Nera	108	2.37	2.22	12.1

Tabella 5. Risultati dell'analisi delle regioni di omozigoti utilizzando 8 milioni di paia di basi come lunghezza minima per identificare una ROH.

Nome razza	N° animali	Media	DS	Massimo
Garfagnina	24	9.73	5.90	21
Rendena	125	3.62	1.86	10.6
Pustertaler/Barà	136	3.48	3.41	23.9
Reggiana	48	2.74	1.66	8.40
Burlina	17	2.57	1.95	8.14
Cabannina	8	2.54	3.88	11.8
Pinzgauer	77	2.30	1.78	8.49
Modicana	109	2.24	1.83	9.56
Cinisara	90	2.12	2.26	13.2
Grigio Alpina	171	1.95	1.10	6.24
Valdostana Pezzata Rossa	30	1.83	0.96	4.15
Valdostana Pezzata Nera	71	1.82	1.96	9.42
Valdostana Castana	175	1.37	1.22	9.46



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Tabella 6. Risultati dell'analisi delle regioni di omozigoti utilizzando 16 milioni di paia di basi come lunghezza minima per identificare una ROH.

Nome razza	N° animali	Media	DS	Massimo
Garfagnina	19	5.29	3.23	11
Cabannina	5	2.44	2.71	7.23
Pustertaler/Barà	81	2.42	2.14	14.9
Valdostana Pezzata Nera	31	1.85	1.30	5.34
Burlina	11	1.82	1.21	4.95
Rendena	84	1.67	0.97	4.25
Reggiana	48	1.60	1.12	5.02
Cinisara	37	1.52	0.93	4.73
Pinzgauer	35	1.41	0.76	3.4
Valdostana Castana	56	1.40	1.02	6.83
Modicana	46	1.37	0.79	3.51
Valdostana Pezzata Rossa	15	1.18	0.76	3.48
Grigio Alpina	83	1.10	0.62	4.28

Visto il minor numero di ROH identificate, generalmente, il coefficiente di inbreeding medio è andato calando al crescere della lunghezza minima in tutte le razze considerate. Questa diminuzione poteva essere più (es. Garfagnina) o meno (es. Modicana) accentuata. L'andamento del coefficiente di inbreeding medio nelle diverse classi di lunghezza delle ROH è rappresentato in Figura 1.



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

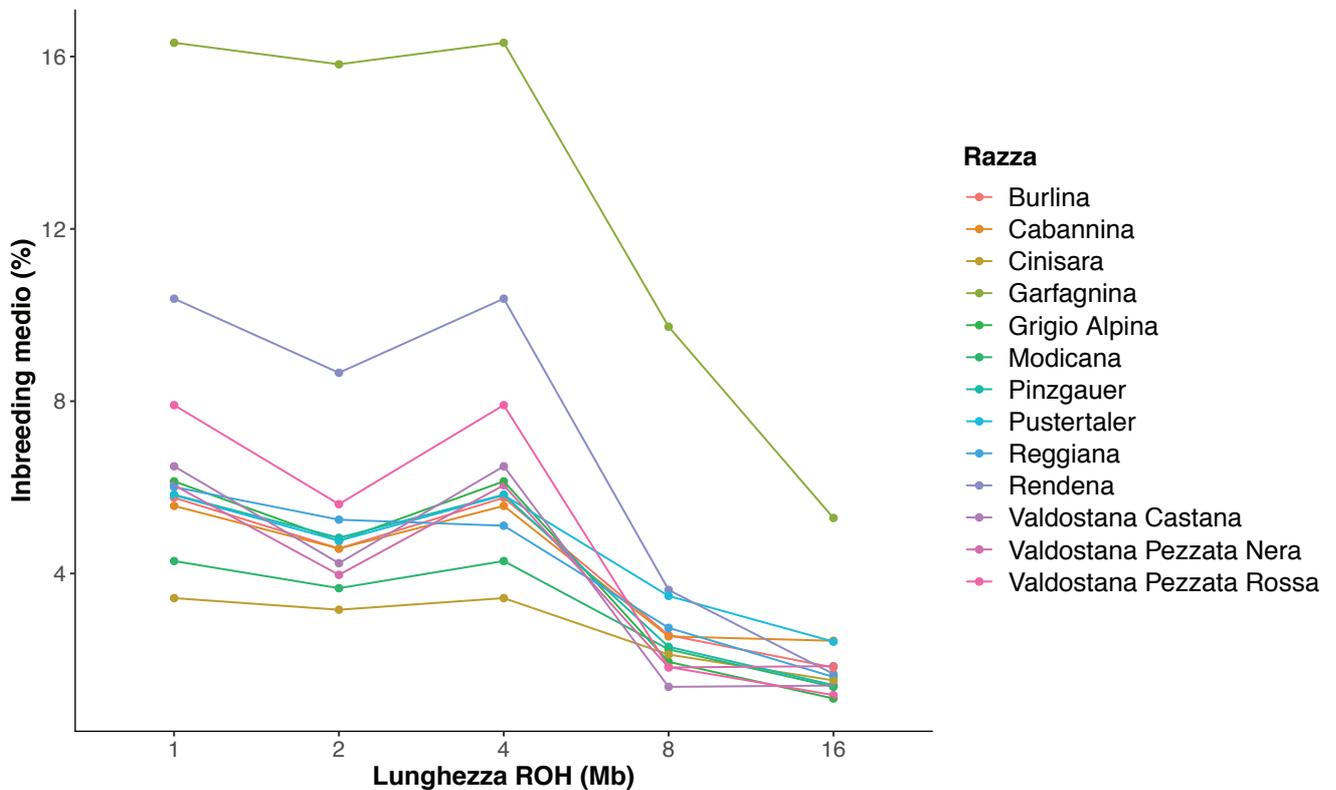


Figura 1. Rappresentazione grafica del livello di inbreeding nelle razze oggetto di studio utilizzando le 5 classi di lunghezza delle ROH.

Un discorso a parte merita l'analisi del coefficiente di inbreeding massimo registrato nel campione oggetto di studio, ossia l'animale con il genoma maggiormente ricoperto da ROH, in quanto veniva registrato in razze diverse a seconda della classe di lunghezza di ROH considerata:

- 1 Mbp = 36.4% Garfagnina;
- 2 Mbp = 35.2% Garfagnina;
- 4 Mbp = 31.5% Garfagnina;
- 8 Mbp = 23.9% Pustertaler/Barà;
- 16 Mbp = 14.9% Pustertaler/Barà.



Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Come si vede dall'elenco sopra, quando la lunghezza minima per identificare una ROH era minore di 8 milioni di paia di basi, l'inbreeding massimo è stato registrato nella razza Garfagnina. Per quanto riguarda le ultime due classi di lunghezza (> 8 e > 16 Mbp) l'inbreeding massimo è stato registrato per un animale della razza Pustertaler/Barà.

Il responsabile scientifico

Nicolò P.P. Macciotta