

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 sull'inbreeding genomico della razza Grigio Alpina.**

### **A) Inbreeding genomico FGRM**

I dati genomici ottenuti dalla genotipizzazione degli animali possono essere espressi come contenuto allelico e possono essere, quindi, identificati con 3 numeri; facciamo l'esempio di un marcatore molecolare SNP con 2 possibili alleli, A e C, e 3 possibili codifiche:

- 0 = nessuna copia dell'allele C, quindi il genotipo è AA;
- 1 = una sola copia dell'allele C, quindi il genotipo è AC;
- 2 = due copie dell'allele C, quindi il genotipo è CC.

Con i genotipi codificati in questa maniera si può procedere alla costruzione di una matrice di parentela genomica, che calcola la parentela tra coppie di animali, intesa come quantità di alleli condivisi tra le coppie di individui. La matrice di parentela più utilizzata è quella di VanRaden (2008) che prende il nome di GRM, *genomic relationship matrix*. La matrice si presenta con in diagonale i coefficienti di parentela degli animali con loro stessi e fuori diagonale i coefficienti di parentela tra gli animali (matrice simmetrica, il cui sopra-diagonale è uguale al sotto-diagonale). Quando il coefficiente di parentela genomico tra due individui è negativo, significa che questi due animali condividono meno geni tra loro rispetto alla media di popolazione. Da questa matrice di parentela genomico si può estrarre il coefficiente di inbreeding genomico ( $F_{GRM}$ ) che si calcola, per ciascun animale, come valore sulla diagonale

Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

– 1. Gli animali con coefficiente di inbreeding più elevato rispetto alla media di popolazione hanno come risultato di questa sottrazione un valore positivo e vengono identificati come animali *inbreed*. Gli animali con coefficienti di inbreeding pari a 0 sono risultati 149 su 181. Gli animali *inbreed* mostravano valori nel range tra <1% e il 5% di inbreeding. Gli animali con valori di inbreeding maggiore di 0 sono i seguenti:

Codice di laboratorio	F <sub>GRM</sub>
18BO31396/01	0.0006
18BO54218/01	0.0011
18BO31410/01	0.0028
18BO54165/01	0.0037
18BO31332/01	0.0078
18BO31439/01	0.0078
18BO31339/01	0.0078
18BO31399/01	0.0078
18BO31346/01	0.0093
18BO31435/01	0.0095
18BO54205/01	0.0097
18BO31369/01	0.0099
18BO54226/01	0.0120
18BO31367/01	0.0124
18BO31376/01	0.0137
18BO31384/01	0.0150
18BO31368/01	0.0151
18BO31420/01	0.0157
18BO31443/01	0.0161
18BO54203/01	0.0161
18BO31404/01	0.0165
18BO31405/01	0.0175
18BO31386/01	0.0199
18BO31336/01	0.0225
18BO31361/01	0.0271
18BO31437/01	0.0284
18BO31350/01	0.0338
18BO54220/01	0.0348
18BO31365/01	0.0361
18BO31455/01	0.0369
18BO31379/01	0.0462

Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

---

18BO31375/01      0.0513

---

Dall'analisi dei dati FGRM, gli animali con coefficienti di inbreeding più elevati sono risultati gli individui 18BO31379/01 e 18BO31375/01.

## **B) Inbreeding genomico FROH**

### **Descrizione delle regioni di omozigosi (*runs of homozygosity, ROH*)**

(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 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

Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

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 quanto riguarda la razza Grigio Alpina sono stati analizzati 181 animali genotipizzati con 101,805 marcatori.

Tramite il programma R, ed in particolare il pacchetto "*detectRuns*", sono state calcolate le regioni di omozigosi (ROH) utilizzando i seguenti parametri:

- lunghezza minima di 1 milione di paia di basi;
- minimo 50 marcatori omozigoti di fila;
- massimo 2 marcatori missing all'interno della ROH.

Per ogni animale sono stati calcolati il numero di regioni individuate e la lunghezza di ciascuna ROH ( $L_{ROH}$ ).

I coefficienti di inbreeding da ROH ( $F_{ROH}$ ) sono stati calcolati per ciascun animale con la seguente formula:

$$F_{ROH} = \sum L_{ROH} / L_{AUTO}$$

Dove  $\sum L_{ROH}$  è la somma della lunghezza di tutte le ROH trovate in ciascun animale, mentre  $L_{AUTO}$  è la lunghezza totale del genoma.

In tutti gli animali analizzati sono state riscontrate almeno 10 ROH.

Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

In Tabella 1 sono riportati i risultati dell'analisi delle ROH. In totale sono state identificate 5717 regioni di omozigosi, con una media di  $32 \pm 6$  ROH per animale. La lunghezza media delle ROH identificate è stata di  $4.48 \pm 4.64$  Mb e di  $183.36 \pm 185.58$  SNP, rispettivamente.

**Tabella 1.** Numero di ROH totali e per animale, e loro lunghezza media, nella razza Grigio Alpina.

Razza	Numero di ROH		Lunghezza	
	Totale	ROH / animale	Mb	SNP
GA	5717	$32 \pm 6$	$4.48 \pm 4.64$	$183.36 \pm 185.58$

I coefficienti di inbreeding da ROH sono riportati in Tabella 2. Considerando una lunghezza minima delle ROH di 1 Mb, il coefficiente di inbreeding medio era  $5.62 \pm 1.63$ : il che significa che in media, i 181 animali avevano il 5% del genoma coperto da regioni di omozigosi. Come ci si aspettava, all'aumentare della lunghezza minima delle ROH, i coefficienti di inbreeding diminuivano perché venivano identificate meno regioni negli animali.

**Tabella 2.** Valori di inbreeding calcolato con ROH (FROH) di diversa lunghezza nella razza Grigio Alpina.

Razza	Lunghezza minima delle ROH				
	> 1 Mb	> 2 Mb	> 4 Mb	> 8 Mb	> 16 Mb
GA	$5.62 \pm 1.63$	$4.96 \pm 1.62$	$3.91 \pm 1.58$	$2.49 \pm 1.42$	$1.51 \pm 1.02$

Il responsabile scientifico

Nicolò P.P. Macciotta

