

Azione 5: Miglioramento delle risorse genetiche animali ad interesse zootecnico (RGAiz), valutazione della consanguineità e della diversità genetica nelle popolazioni e calcolo dell'inbreeding, rilevamento dati in stazione di controllo in ambiente controllato.

Monitoraggio inbreeding

Premessa

Negli anni la selezione ha determinato un notevole progresso genetico per i caratteri di interesse selettivo; un punto di svolta è stata la possibilità di applicare per le valutazioni genetiche il BLUP ANIMAL MODEL, metodologia teorizzata da C. Henderson negli anni 50, grazie allo sviluppo di calcolatori, primi anni 80, in grado di risolvere il complesso modello matematico che sta alla base di questa procedura.

Il BLUP AM, proprio perché tiene conto delle relazioni di parentela esistenti tra gli individui, consente di effettuare una sorta di selezione per famiglie. In termini pratici vengono “evidenziati” con maggior probabilità riproduttori che appartengono ad una famiglia rispetto ad un'altra, con un conseguente rischio della perdita di linee di sangue. Negli anni, inoltre, in certi casi e per certe popolazioni, si è ricercato l'accoppiamento tra individui parenti al fine di fissare nel più breve tempo possibile i caratteri di interesse selettivo. In passato gli obiettivi di selezione erano pochi, vedi incremento delle performance produttive, con poche linee di sangue che andavano ad occupare le prime posizioni delle classifiche.

Tutti questi fattori hanno concorso ad una perdita delle linee di sangue e ad una riduzione della variabilità genetica. A farne le spese tutti quei caratteri a bassa ereditabilità che sono legati alla durata degli animali in stalla, alla resistenza alle malattie, alla fertilità. In altre parole si è assistito ad una perdita della capacità di adattamento, o fitness, del bestiame. Questo è particolarmente preoccupante anche in vista dei cambiamenti climatici che richiederanno animali versatili in grado di adattarsi alle nuove condizioni di allevamento.

Il monitoraggio della consanguineità (inbreeding) solitamente era fatto analizzando le sole informazioni genealogiche contenute nel pedigree; in questi ultimi anni, grazie dalla possibilità di genotipizzare gli animali è possibile calcolare il grado di parentela anche tra gli animali che nel pedigree non risultano essere connessi tra loro. Inoltre, il coefficiente di parentela calcolato con i genotipi risulta essere più preciso di quello stimato attraverso le informazioni di pedigree.

L'obiettivo del presente lavoro è quello di effettuare un primo monitoraggio dell'inbreeding nella Pezzata Rossa Italiana (PRI) non basandosi solo sulle informazioni di pedigree ma considerando anche i genotipi.

Analisi della consanguineità

Si sono calcolati i coefficienti di inbreeding seguendo due metodi, utilizzando il pedigree o utilizzando i genotipi. Il pedigree contava 1.101.246 animali, mentre erano disponibili 7.531 genotipi. Per il calcolo dei livelli individuali di pedigree è stata sviluppata un'apposita pipeline.

In tabella 1 si riporta la distribuzione degli animali nelle varie classi di inbreeding da pedigree. Si è limitata l'analisi ai soli soggetti con genitori noti nati in Italia a partire dal 1980; si sono filtrati complessivamente 392.887 animali. Relativamente alle femmine il 33,1% dei capi ha un livello di consanguineità pari a 0%. Nel 96,9% degli animali ha una consanguineità inferiore al 5%.

Tabella 1. Numero di animali e percentuale di maschi e femmine ricadenti in ciascuna classe di inbreeding.

Inbreeding	=0	<=0.05	=> 0.1	=>0.2	=>0.3	=>0.4
Femmine						
N° animali	119225	230248	9096	1568	487	2
%	33.1	63.8	2.5	0.4	0.1	0.0
Maschi						
N° animali	4143	26623	1294	148	52	1
%	12.8	82.5	4.0	0.5	0.2	0.0

In Figura 1 si riporta il trend del coefficiente di inbreeding da pedigree per due diverse categorie di animali presenti in popolazione e nati in Italia, le vacche e i tori utilizzati per l'inseminazione artificiale (IA) selezionati presso la stazione di controllo di Fiume Veneto. Si è scelto di rappresentare l'andamento a partire dal 1985. Come si può osservare dal grafico il livello di inbreeding nelle vacche è in continuo aumento. Nonostante l'incremento registrato nel valore di inbreeding, il coefficiente in questi ultimi anni ha raggiunto un livello medio su tutta la popolazione non elevato (circa il 2%).

Considerando, invece, il nucleo dei tori utilizzati per l'inseminazione artificiale si evidenzia un andamento molto più erratico, con scostamenti anche di un punto percentuale tra un anno e l'altro. Il livello medio rimane comunque sotto i livelli di guardia. In Figura 2 è rappresentata la situazione della consanguineità nel gruppo di animali genotipizzati, confrontando il trend dell'inbreeding da pedigree con quello genomico. L'inbreeding da pedigree rispecchia l'andamento di quello osservato in precedenza per le vacche (Figura 1), mentre più interessante risulta essere quello genomico. A partire dal 2003 si riscontra un progressivo aumento del livello medio di parentela genomica che porta a partire dal 2006 a livelli positivi. In generale il livello di consanguineità è relativamente

contenuto rispetto a quanto osservato in altre popolazioni. C'è da dire che si sta osservando un incremento costante del livello medio che è passato dal 1,1% dei soggetti nati nel 2000 a 2.2 per quelli nati nei primi mesi del 2019. L'entità di tale incremento non è drammatica ma è necessario monitorare nel lungo periodo questo parametro.

Figura 1. Andamento del coefficiente di consanguineità calcolato usando le informazioni di parentela (inbreeding da pedigree) nelle vacche e nei tori utilizzati per l'inseminazione artificiale.

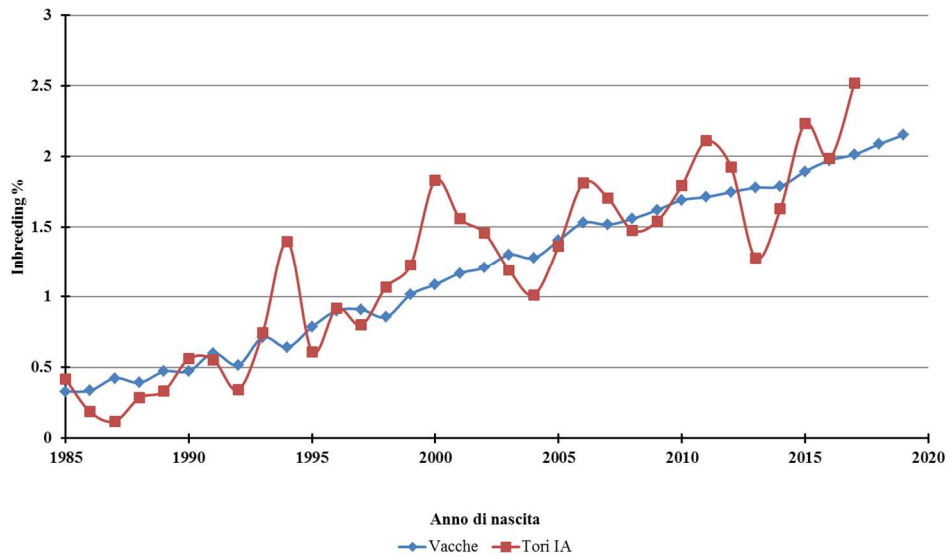
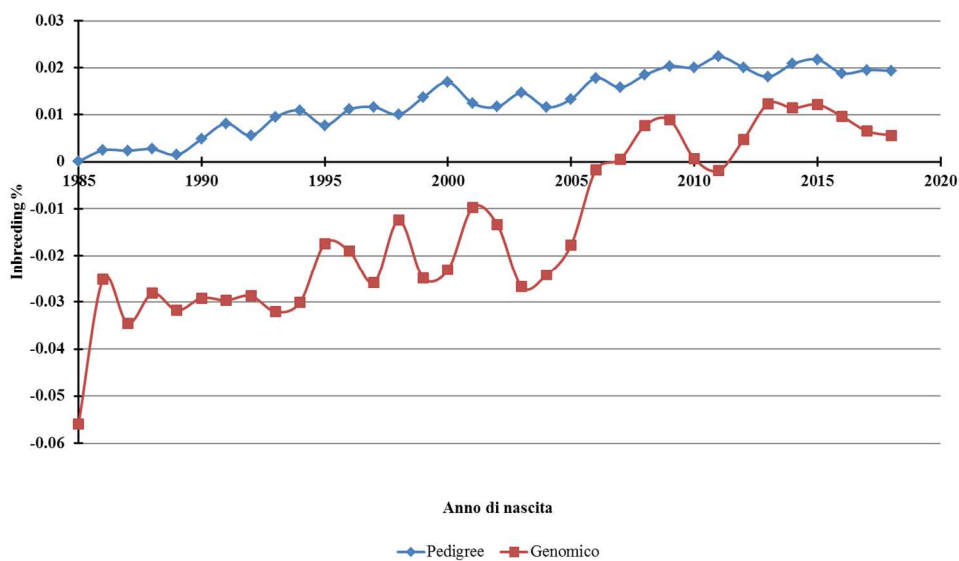


Figura 2. Trend della consanguineità negli animali genotipizzati di Pezzata Rossa Italiana dal 1985 al 2018. La linea blu rappresenta il coefficiente di inbreeding da pedigree, mentre la linea arancione il coefficiente di inbreeding genomico.



Studio depressione da inbreeding

Uno degli effetti negativi dell'aumento del livello di inbreeding in una popolazione animale è la comparsa della cosiddetta depressione da inbreeding, ossia uno stato di diminuzione nel vigore e nelle performance riproduttivi e produttive degli animali di interesse zootecnico.

Questi eventi di depressione da inbreeding sono più frequenti in popolazioni molto piccole e/o chiuse e nelle popolazioni animali sottoposte a forti spinte di selezione genetica. Nonostante i bassi livelli dei coefficienti di inbreeding registrati nella PRI, è stato condotto uno studio preliminare dell'effetto dell'inbreeding sui caratteri di produzione del latte.

Per lo studio sono stati utilizzati 2911 tori PRI nati in 5 diverse nazioni Europee:

- Austria (AT, 351)
- Svizzera (CH, 158)
- Repubblica Ceca (CZ, 248)
- Germania (DE, 470)
- Italia (IT, 1684).

Tutti gli animali sono stati genotipizzati con il BeadChip Illumina a media densità (50k); dopo il quality control sono stati trattenuti per le analisi successivi 40,099 marcatori mappati sui cromosomi autosomali (29) nella release 3.1.

Per prima cosa sono state calcolate le regioni di omozigosi (ROH), ossia segmenti del genoma costituiti da una serie di marcatori omozigoti e privi di eterozigosi allo stato diploide, utilizzando il pacchetto di R DetectRuns (Marras et al., 2017) con i seguenti parametri:

- almeno 15 marcatori omozigoti di fila con almeno un marcatore ogni 100 kb.
- lunghezza minima di 1 milione di paia di basi (Mb);
- nessun marcatore *missing* o eterozigote;

È stato poi calcolato il coefficiente di inbreeding individuale per ogni cromosoma tramite la formula:

$$\mathbf{FROH} = \mathbf{numero\ di\ SNP\ in\ ROH} / \mathbf{totale\ degli\ SNP\ del\ cromosoma}$$

Di tutti gli animali si disponeva, infine, degli EBV calcolati per i caratteri della produzione di latte (milk), di grasso (fat) e di proteina (pro).

Sono stati poi eseguiti differenti modelli ANOVA, uno sul dataset complessivo e uno per ciascuna nazione di provenienza, in modo da identificare gli effetti dell'inbreeding sui caratteri produttivi presi in considerazione. Sul dataset complessivo è stato applicato il seguente modello:

$$EBV = FROH + \text{country} + e$$

dove **EBV** sono i tre caratteri (milk, fat, pro); **FROH** il coefficiente di inbreeding individuale per ciascuno dei 29 cromosomi; **country** è l'effetto fisso della nazione di provenienza (5 livelli: AT, CH, CZ, DE, IT); **e** è il residuo. Nella Tabella 2 sono riportati i risultati delle analisi sul dataset complessivo; l'effetto della nazione era sempre estremamente significativo

Tabella 2. Risultati della analisi sulla depressione da inbreeding condotte sul dataset complessivo.

BTA	Milk P-value	Fat P-value	Pro P-value
1	n.s.	n.s.	n.s.
2	n.s.	n.s.	n.s.
3	n.s.	n.s.	n.s.
4	n.s.	n.s.	n.s.
5	n.s.	n.s.	n.s.
6	n.s.	n.s.	n.s.
7	n.s.	n.s.	n.s.
8	*	n.s.	n.s.
9	***	***	***
10	*	n.s.	*
11	n.s.	n.s.	n.s.
12	n.s.	n.s.	n.s.
13	n.s.	n.s.	n.s.
14	*	n.s.	*
15	n.s.	n.s.	n.s.
16	n.s.	n.s.	n.s.
17	*	***	*
18	***	***	***
19	***	*	***
20	*	n.s.	n.s.
21	n.s.	n.s.	n.s.
22	n.s.	n.s.	n.s.
23	*	***	*
24	n.s.	n.s.	n.s.
25	*	n.s.	n.s.
26	n.s.	n.s.	n.s.
27	*	n.s.	n.s.
28	n.s.	n.s.	n.s.
29	n.s.	n.s.	n.s.

*** = P < 0.001; ** = P < 0.01; * = P < 0.05

È stato riscontrato un effetto significativo del coefficiente di inbreeding su almeno un carattere in 11 diversi autosomi (BTA 8, 9, 10, 14, 17, 18, 19, 20, 23, 25, 27). Nei cromosomi significativi era sempre presente un effetto sul carattere della produzione di latte, mentre solo in 5 cromosomi è stato registrato un effetto sul carattere del grasso. Infine, per quanto riguarda la proteina, l'effetto significativo del coefficiente di inbreeding si è registrato in 7 diversi autosomi.

Le analisi successive riguarderanno l'ampliamento dei caratteri utilizzati per lo studio della depressione da inbreeding e l'eventuale identificazione delle regioni (e dei geni mappati in esse) dei cromosomi significativi maggiormente associate ai caratteri analizzati.