



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 DUALBREEDING2 "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

Aggiornamento sullo stato di avanzamento delle attività del progetto a Febbraio 2022

Analisi dei dati genomici forniti dall'associazione ANARE

Gestione dei dati genomici

A Febbraio 2022, UNISS ha elaborato un totale di 46 diversi batch provenienti dall'associazione ANARE. I files contenevano un totale di 1,791 animali, di cui 1,403 del primo progetto DualBreeding, e 388 del secondo progetto DualBreeding2. I files sono stati divisi in:

- media densità, MD: con numero di marcatori SNP $\leq 50,000$, per un totale di 21 files;
- alta densità, HD: con numero di marcatori SNP $\geq 100,0000$, per un totale di 25 files.

Entro ciascuna densità, sono stati tenuti i marcatori in comune tra i diversi files. Inoltre, sono stati tenuti solo i marcatori mappati sui cromosomi autosomali (da 1 a 29), nell'ultima release disponibile (ARS-UCD 1.2 / bosTau9). Sono state eliminate le eventuali repliche degli



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

animali genotipizzati più di una volta. Infine, sono stati applicati i seguenti filtri per il controllo di qualità dei dati genomici:

- call rate di ciascun animale $\geq 95\%$;
- call rate di ciascuno SNP $\geq 95\%$;
- frequenza dell'allele minore $\geq 5\%$;
- p-value del test per l'equilibrio di Hardy Weinberg $1e^{-6}$.

Dopo i vari passaggi di preparazione, sono stati creati i seguenti files:

- HD = 732 animali e 114,958 marcatori;
- MD = 1,013 animali e 22,152 marcatori.

L'associazione ANARE ha fornito dati genomici di quattro diverse razze:

- Rendena, REN, con codice razza = 10;
- Cabannina, CAB, con codice razza = 62;
- Burlina, BUR, con codice razza = 19;
- Agerolese, AGE, con codice razza = 63.

ANALISI DATI MD

Nel dataset a media densità, MD, sono stati analizzati 1,013 animali di razza Rendena.

1) Analisi delle frequenze alleliche e genotipiche

Usando PLINK, sono state calcolate le frequenze alleliche e genotipiche di tutti i 22,152 marcatori considerati. In Tabella 1 sono riportate le medie per ciascun cromosoma della frequenza dell'allele minore (MAF) e l'eterozigosità (HET)



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Tabella 1. Frequenze alleliche/genotipiche medie (media±deviazione standard) per cromosoma

CHR	MAF	HET
1	0.301±0.127	0.392±0.114
2	0.301±0.124	0.396±0.113
3	0.308±0.124	0.401±0.112
4	0.298±0.125	0.393±0.113
5	0.297±0.127	0.390±0.117
6	0.304±0.123	0.399±0.111
7	0.304±0.121	0.398±0.108
8	0.297±0.126	0.391±0.116
9	0.298±0.123	0.394±0.110
10	0.300±0.126	0.391±0.116
11	0.302±0.122	0.398±0.110
12	0.298±0.128	0.391±0.117
13	0.308±0.126	0.400±0.114
14	0.302±0.125	0.395±0.112
15	0.310±0.124	0.404±0.111
16	0.299±0.127	0.391±0.114
17	0.305±0.125	0.397±0.111
18	0.305±0.125	0.396±0.112
19	0.311±0.123	0.404±0.109
20	0.303±0.128	0.397±0.113
21	0.300±0.129	0.394±0.116
22	0.296±0.130	0.386±0.120
23	0.307±0.124	0.401±0.112
24	0.301±0.121	0.398±0.110
25	0.310±0.127	0.403±0.113
26	0.303±0.122	0.397±0.112
27	0.302±0.124	0.395±0.115
28	0.305±0.125	0.394±0.111
29	0.299±0.125	0.394±0.114



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

I valori più elevati di MAF (0.310) sono stato registrato nei cromosomi 15, 19, e 25, mentre il valore più basso (0.296) nel cromosoma 22. Per quanto riguarda i valori di HET, il valore più alto (0.403) è stato registrato nei cromosomi 15,19, e 25 e quello più basso (0.386) nel cromosoma 22.

Da queste analisi emerge come la frequenza dell'allele maggiore e del corrispondente genotipo fosse più alta nel cromosoma 22, ad indicare una maggiore rassomiglianza della razza in quel cromosoma.

2) Analisi degli omozigoti mancanti e dei possibili geni letali

Tramite l'analisi delle frequenze genotipiche si sono ricercati i cosiddetti geni letali, ossia geni che provocano la morte prematura degli animali, di solito nei primi stati di vita. In questo studio sono stati considerati possibili indicatori di geni letali i marcatori che non presentavano un omozigote (a1a1): in particolare, utilizzando la probabilità binomiale si sono evidenziati i marcatori che mostravano uno scostamento tra il numero di genotipi attesi e quelli effettivamente osservati (uguali a zero). I risultati sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Marcatori molecolari con deviazione degli omozigoti osservati (N=0) da quelli attesi.

CHR	SNP	Attesi	CHR	SNP	Attesi
1	BTB-01755357	5	19	BovineHD1900003121	3
1	BovineHD0100015399	4	19	BovineHD1900016038	5
1	BovineHD0100017507	3	19	BovineHD1900016039	5
2	BovineHD0200023618	3	19	BovineHD1900016040	5
3	BovineHD0300035081	5	19	BovineHD1900016041	5
5	ARS-BFGL-NGS-84009	3	19	BovineHD1900016046	5
5	BovineHD0500011166	3	21	ARS-BFGL-NGS-30167	3
5	BovineHD0500019812	5	21	ARS-BFGL-NGS-68709	3
5	BovineHD0500026412	3	21	BovineHD2100016579	3
6	BovineHD0600000808	3	23	BovineHD2300002219	4



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

6	BovineHD0600011237	3	23	BovineHD2300003515	4
6	ARS-BFGL-NGS-112073	4	23	ARS-BFGL-NGS-4248	3
6	ARS-BFGL-NGS-23251	5	24	ARS-BFGL-NGS-85094	5
7	BovineHD0700026876	3	25	BovineHD2500007547	3
8	BovineHD0800005385	4	26	BTA-61189-no-rs	4
9	BovineHD0900017051	4	27	BovineHD2700007859	3
10	BovineHD1000010086	3	27	BovineHD2700012629	3
10	BovineHD1000014015	3	27	BovineHD2700012654	3
10	BovineHD1000017129	4	28	BovineHD2800010171	5
14	BovineHD4100011659	3	29	BovineHD2900000046	3
15	BovineHD1500000667	5	29	BovineHD4100019154	3
15	ARS-BFGL-NGS-107160	4			

3) Inbreeding genomico

Utilizzando il software PLINK, sono stati calcolati tre diversi coefficienti di inbreeding:

- F1= basato sulla varianza genotipica, in particolare il valore è espresso come differenza dall'unità. Animali con valori minori di 0 sono privi di inbreeding, mentre gli animali con valori superiori a 0 presentano valori di inbreeding.
- F2 = basato sull'eccesso di omozigosi;
- F3= basato sulla correlazione tra i gameti.

Su un totale di 1,013 animali, solo 380 presentavano valori di inbreeding. Gli animali con coefficiente di inbreeding (F1) più elevato, fissato a $\geq 5\%$, sono elencati in Tabella 3.



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Tabella 3. Animali con coefficienti di inbreeding superiore al 5%.

Matricola	%	Matricola	%	Matricola	%	Matricola	%	Matricola	%
10IT022990175154	5.00	10IT028990362309	5.51	10IT028990269935	6.41	10IT022990151082	7.81	10IT022990176093	11.18
10IT028990329815	5.01	10IT028990329833	5.56	10IT028990364664	6.42	10IT022990113741	7.99	10IT022990176179	11.67
10IT022990150095	5.02	10IT028990213728	5.57	10IT024990530356	6.57	10IT028000363239	8.00	10IT028990216006	13.87
10IT024990611295	5.04	10IT022990151107	5.59	10IT028990145301	6.68	10IT022990151106	8.01	10IT022990192823	13.92
10IT024990611287	5.06	10IT022990258846	5.67	10IT022990103706	6.70	10IT028990281547	8.06	10IT028990195709	14.06
10IT022990113507	5.13	10IT022990175839	5.69	10IT028990240990	6.74	10IT023990478175	8.24	10IT022990175455	14.13
10IT028990357488	5.14	10IT022990236191	5.69	10IT028990417860	6.79	10IT022990175523	8.56	10IT023990478173	17.15
10IT028990296336	5.15	10IT028990189741	5.77	10IT028990320240	6.85	10IT022990176091	8.74	10IT028990320220	17.51
10IT022990131790	5.16	10IT028990392017	5.79	10IT028990354117	6.86	10IT028990273623	8.78		
10IT022990175163	5.16	10IT022990258722	5.81	10IT028990416422	6.91	10IT028990303174	8.82		
10IT028990246774	5.21	10IT022990237112	6.06	10IT028990165737	7.00	10IT022990151077	8.88		
10IT028990296354	5.24	10IT022990130916	6.07	10IT028990315254	7.10	10IT022990197216	9.04		
10IT024990512384	5.31	10IT028990362302	6.07	10IT024990106586	7.15	10IT024990543272	9.46		
10IT028990341248	5.36	10IT028990396351	6.10	10IT028990254959	7.15	10IT028990142907	9.85		
10IT022990174312	5.37	10IT024990530370	6.11	10IT028990354116	7.30	10IT022990174525	9.86		
10IT028990214439	5.40	10IT028990311392	6.22	10IT028990314965	7.36	10IT022990072706	9.87		
10IT022990236148	5.47	10IT028990341255	6.27	10IT022990175517	7.68	10IT028990343657	10.98		
10IT028990373080	5.49	10IT028990166933	6.39	10IT028990213765	7.68	10IT028990397527	11.00		



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

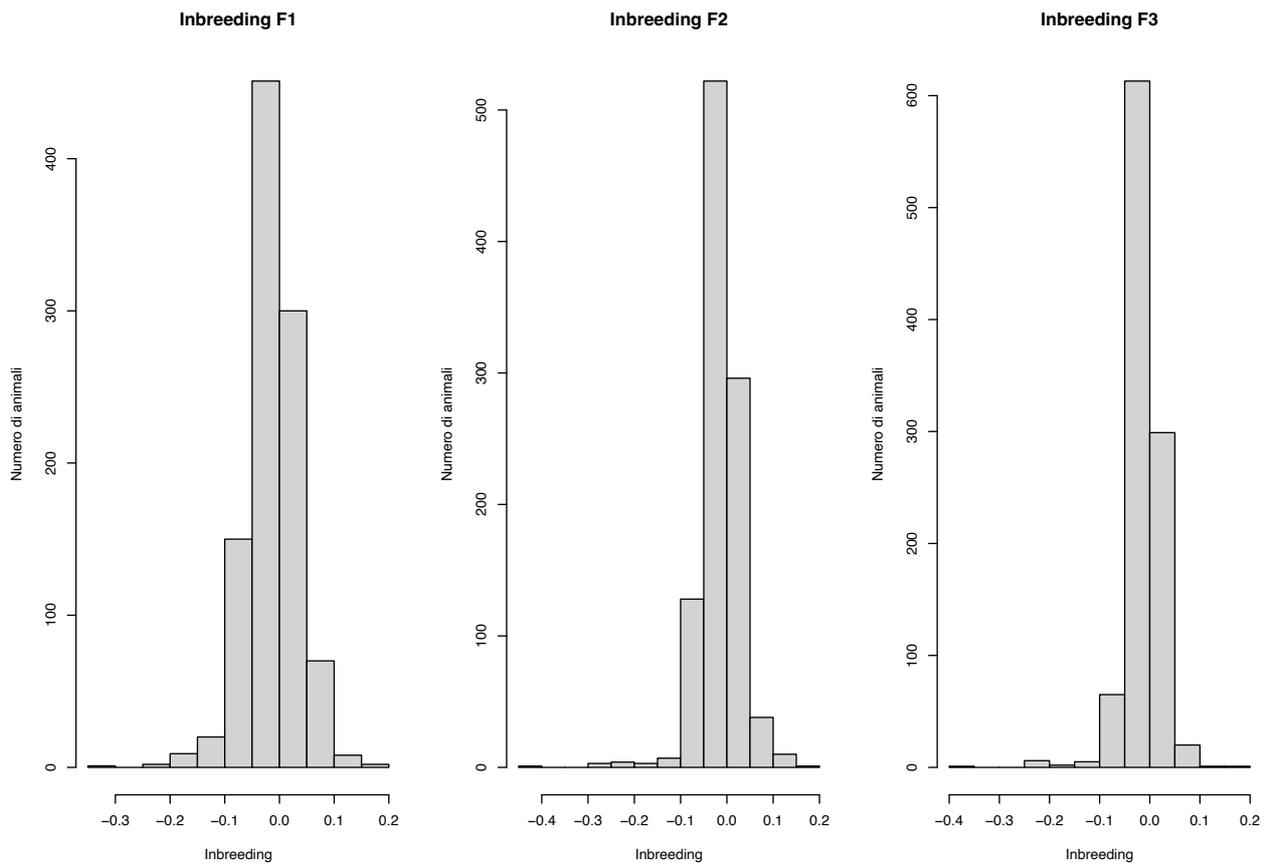


Figure 1. Istogrammi dei tre diversi coefficienti di inbreeding stimati con PLINK.

4) Analisi dei blocchi del genoma e del disequilibrio di Linkage

Tramite il software PLINK, sono stati calcolati il numero di blocchi e la loro lunghezza. I blocchi del genoma sono regioni caratterizzate da bassa ricombinazione in cui si possono identificare solo pochi aplotipi; data la bassa ricombinazione della regione, lo studio dei blocchi permette di identificare regioni del genoma in cui il grado di rassomiglianza genomica degli individui è più elevato. Sul totale di 22,152 SNPs sono stati identificati 994 blocchi. Il blocco più esteso è stato trovato sul cromosoma 5 tra 56.29Mb e 56.49Mb con una lunghezza di circa 199kb (21 SNPs).



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Usando il software Haploview è stato calcolato il livello di disequilibrio di Linkage cromosoma per cromosoma. In particolare, sono stati calcolati i valori di r^2 tra SNPs separati da non più di 1000kb (confronti a coppie di SNPs dentro questo intervallo). In tabella 4 sono riportati il numero di confronti per cromosoma e il valore medio (con la deviazione standard) del valore di r^2 . I valori più alto e più basso di confronti sono stati registrati rispettivamente nel cromosoma 20 e 27. Il valore medio più elevato di r^2 (0.18 ± 0.24) è stato registrato nel cromosoma 15. Il cromosoma 28 ha, invece, mostrato il valore medio di r^2 più basso (0.08 ± 0.11).

Tabella 4. Numero di confronti tra SNP, valore medio e deviazione standard del valore di R^2 per cromosoma.

CHR	Confronti	r^2 media	r^2 DS
1	12,848	0.13	0.20
2	10,203	0.13	0.19
3	15,022	0.13	0.18
4	7,373	0.11	0.15
5	12,246	0.12	0.17
6	9,522	0.12	0.17
7	7,480	0.11	0.15
8	6,112	0.10	0.14
9	9,690	0.13	0.20
10	6,602	0.11	0.15
11	8,638	0.09	0.14
12	6,206	0.09	0.13
13	5,724	0.10	0.14
14	7,652	0.09	0.12
15	8,217	0.18	0.24
16	8,382	0.14	0.21
17	6,009	0.09	0.13
18	7,304	0.10	0.12
19	12,248	0.10	0.15
20	15,473	0.15	0.22



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

21	9,866	0.14	0.19
22	5,331	0.10	0.13
23	9,110	0.12	0.17
24	5,526	0.10	0.14
25	5,685	0.12	0.15
26	5,036	0.11	0.15
27	3,900	0.09	0.13
28	4,936	0.08	0.11
29	6,162	0.09	0.13

La Figura 2 mostra l'andamento del r^2 , come indicatore di disequilibrio di linkage, all'aumentare della distanza tra marcatori.

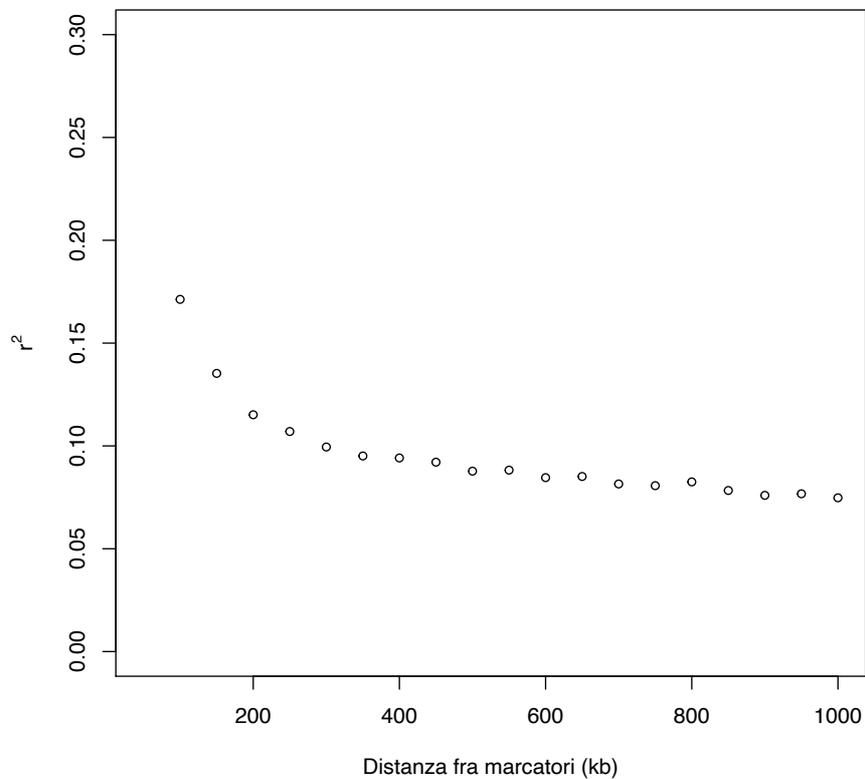


Figura 2. Andamento del r^2 , come indicatore di disequilibrio di linkage, all'aumentare della distanza tra marcatori.



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Come si può facilmente notare, i valori di r^2 diminuiscono all'aumentare della distanza: questo risultato è in linea con il tipico andamento decrescente del disequilibrio di linkage noto in tutte le specie di interesse zootecnico.

Dai valori di disequilibrio di Linkage (sotto forma di r^2) si può stimare la popolazione effettiva della razza sotto esame. In particolare, la Figura 3 mostra come la popolazione effettiva sia diminuita con il passare delle generazioni, con valori più elevati stimati per le generazioni passate rispetto al presente. Anche questo risultato è in linea con quanto riportato in letteratura.

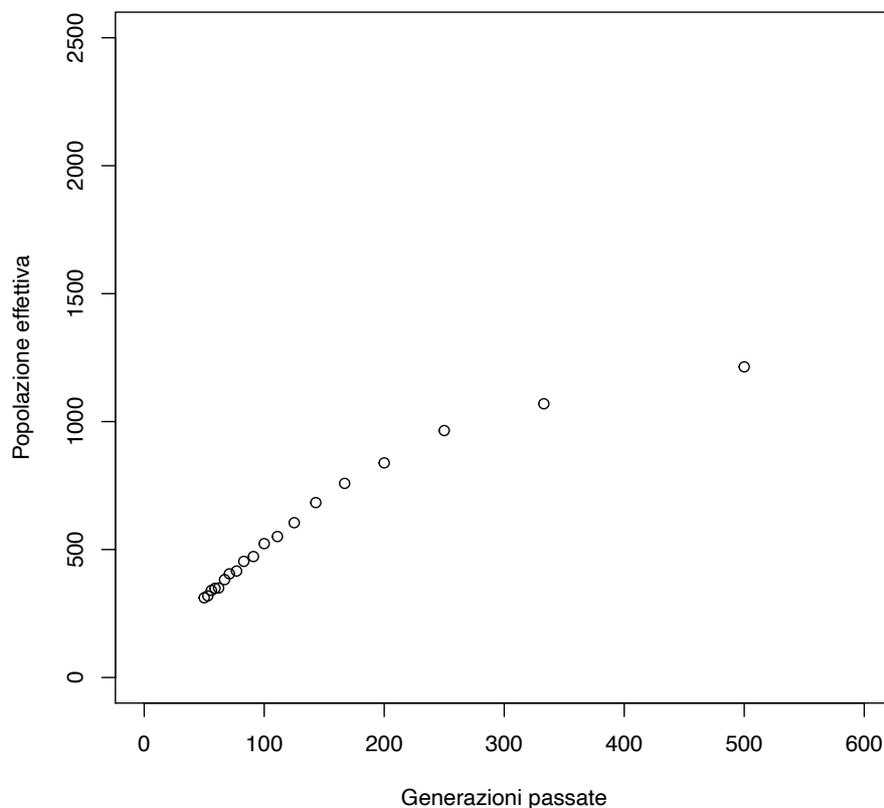


Figura 3. Andamento della popolazione effettiva da 500 generazioni fa ad oggi.



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

5) Analisi delle regioni di omozigosi

Usando il pacchetto di R “detectruns” sono state calcolate le regioni di omozigosi (ROH), ovvero segmenti del genoma privi di eterozigosi. Per il calcolo delle ROH sono stati utilizzati i seguenti parametri:

- almeno 15 marcatori omozigoti di fila;
- nessun eterozigote e massimo 1 missing all’interno della ROH;
- almeno 1 Mb di lunghezza.

È stato poi calcolato, per ciascun animale, il coefficiente di inbreeding con le ROH utilizzando la formula:

$$F_{ROH} = \frac{\text{lunghezza totale delle ROH}}{\text{lunghezza totale del genoma}}$$

Sono state individuate un totale di 45,423 ROH. Tutti gli animali presentavano almeno 5 ROH, e il numero medio di ROH per animale era 44.84 ± 7.73 . Gli animali con più regioni erano: 10IT022990175199 (77 ROH) e 10IT022990174502 (74 ROH). La regione più lunga (83.35Mb con 580 SNP), individuata nell’animale 10IT028990397542, si trovava sul cromosoma 8 a 29.8-113.2 Mb.

In Tabella 5 sono riportati i risultati dell’analisi delle ROH per cromosoma.

Tabella 5. Risultati dell’analisi delle regioni di omozigosi.

CHR	N° ROH	Media±SD	N° Anim	FROH
1	2,321	6.24±7.29	937	0.098±0.086
2	1,889	5.88±6.31	855	0.096±0.085
3	1,998	5.93±6.80	884	0.111±0.104
4	2,388	6.11±7.07	925	0.132±0.112
5	2,247	6.37±7.70	924	0.129±0.114
6	2,679	4.77±5.88	957	0.113±0.096
7	1,926	6.10±5.82	888	0.120±0.093
8	1,564	6.77±7.55	808	0.116±0.109
9	1,972	5.10±5.91	889	0.108±0.099



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

10	2,046	6.69±7.07	878	0.151±0.127
11	1,845	5.21±5.46	851	0.106±0.099
12	1,657	5.68±5.52	826	0.131±0.109
13	1,554	5.31±5.33	829	0.119±0.103
14	1,279	5.54±6.93	740	0.116±0.119
15	1,575	6.23±5.78	821	0.141±0.115
16	1,631	5.07±5.08	838	0.122±0.107
17	1,319	5.13±5.28	758	0.122±0.108
18	1,362	5.07±5.32	764	0.137±0.119
19	1,203	3.98±4.32	713	0.106±0.105
20	1,298	5.68±5.70	740	0.139±0.116
21	1,220	5.55±5.88	747	0.130±0.119
22	1,234	5.68±5.91	733	0.158±0.134
23	1,170	4.16±3.96	703	0.132±0.121
24	947	6.15±6.05	620	0.151±0.134
25	1,087	4.72±3.95	705	0.172±0.126
26	1,253	4.55±3.76	708	0.155±0.130
27	1,022	4.58±4.30	653	0.158±0.136
28	796	4.75±4.59	572	0.144±0.136
29	941	4.91±4.35	657	0.138±0.120

Il maggior numero di ROH (2,679) sono state individuate nel cromosoma 6 su 957 animali.

Il cromosoma con un minor numero di ROH (796) individuate è stato il CHR 28, riscontrate su 572 animali.

I coefficienti di inbreeding da ROH sono stati calcolati utilizzando 5 lunghezze minime delle ROH: $\geq 1\text{Mb}$, $\geq 2\text{Mb}$, $\geq 4\text{Mb}$, $\geq 8\text{Mb}$, $\geq 16\text{Mb}$.

In tutti e 5 i casi, l'animale con il coefficiente di inbreeding da ROH più elevato era 10IT023990478173.

L'inbreeding medio più elevato (0.172 ± 0.126) è stato riscontrato nel cromosoma 25, mentre il valore medio più basso (0.096 ± 0.085) sul cromosoma 2.



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

ANALISI DATI HD

Nel dataset ad alta densità, HD, sono stati analizzati 732 animali genotipizzati con 114,958 SNPs. In particolare:

- 614 animali di razza Rendena (REN, 10);
- 52 animali di razza Burlina (BUR, 19);
- 45 animali di razza Cabannina (CAB, 62);
- 21 animali di razza Agerolese (AGE, 63).

1) Analisi delle frequenze alleliche e genotipiche

Utilizzando il software PLINK sono state calcolate le frequenze alleliche e genotipiche nei 29 cromosomi entro ciascuna razza. In Tabella 6 sono riportati i valori di MAF medi per cromosoma nelle 4 razze oggetto di studio.

Tabella 6. Frequenze medie per cromosoma dell'allele minore (MAF) nelle 4 razze oggetto di studio.

CHR	Rendena	Burlina	Cabannina	Agerolese
1	0.288±0.132	0.346±0.178	0.332±0.184	0.341±0.175
2	0.289±0.131	0.351±0.176	0.337±0.176	0.345±0.183
3	0.284±0.133	0.352±0.184	0.335±0.173	0.343±0.176
4	0.281±0.135	0.36±0.188	0.348±0.179	0.354±0.191
5	0.282±0.135	0.355±0.192	0.344±0.181	0.347±0.191
6	0.291±0.133	0.363±0.184	0.344±0.185	0.351±0.198
7	0.284±0.133	0.368±0.199	0.344±0.179	0.358±0.186
8	0.282±0.133	0.351±0.178	0.338±0.179	0.349±0.18
9	0.287±0.133	0.355±0.181	0.345±0.173	0.354±0.18
10	0.281±0.135	0.369±0.187	0.351±0.183	0.357±0.181
11	0.285±0.132	0.354±0.179	0.341±0.181	0.346±0.18
12	0.279±0.134	0.358±0.187	0.341±0.181	0.346±0.188
13	0.285±0.134	0.357±0.185	0.34±0.188	0.353±0.177
14	0.292±0.133	0.353±0.2	0.332±0.177	0.336±0.186



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

15	0.288±0.132	0.359±0.181	0.353±0.18	0.349±0.183
16	0.285±0.132	0.357±0.198	0.34±0.172	0.353±0.177
17	0.284±0.134	0.346±0.189	0.333±0.173	0.351±0.188
18	0.283±0.133	0.36±0.179	0.342±0.172	0.356±0.186
19	0.297±0.13	0.359±0.187	0.34±0.176	0.349±0.177
20	0.286±0.136	0.345±0.189	0.329±0.178	0.343±0.178
21	0.284±0.133	0.359±0.186	0.341±0.177	0.348±0.185
22	0.283±0.134	0.358±0.178	0.348±0.173	0.351±0.183
23	0.289±0.136	0.356±0.178	0.341±0.178	0.348±0.178
24	0.292±0.132	0.356±0.179	0.343±0.172	0.349±0.175
25	0.288±0.138	0.367±0.174	0.354±0.171	0.355±0.177
26	0.288±0.131	0.367±0.185	0.352±0.174	0.352±0.184
27	0.283±0.136	0.363±0.182	0.341±0.179	0.36±0.182
28	0.292±0.132	0.357±0.182	0.337±0.177	0.347±0.176
29	0.289±0.133	0.353±0.181	0.336±0.184	0.347±0.181

I valori di media generale della MAF entro razza erano: 0.29±0.13 per la REN, 0.36±0.19 per la BUR, 0.34±0.18 per la CAB, 0.35±0.18 per la AGE.

In Tabella 7 sono riportati i valori medi di eterozigosi per cromosoma nelle 4 razze oggetto di studio. I valori medi di eterozigosi entro razza erano: 0.38±0.13 per la REN, 0.39±0.13 per la BUR, 0.38±0.13 per la CAB, e 0.39±0.15 per la AGE.

Tabella 7. Valori medi di eterozigosi per cromosoma nelle 4 razze oggetto di studio.

CHR	Rendena	Burlina	Cabannina	Agerolese
1	0.379±0.123	0.382±0.127	0.374±0.142	0.405±0.154
2	0.382±0.122	0.397±0.129	0.377±0.133	0.388±0.153
3	0.379±0.128	0.385±0.129	0.382±0.132	0.393±0.148
4	0.374±0.129	0.397±0.136	0.395±0.136	0.390±0.158
5	0.374±0.130	0.393±0.136	0.394±0.139	0.367±0.146
6	0.382±0.126	0.397±0.128	0.378±0.132	0.372±0.154
7	0.376±0.127	0.391±0.134	0.377±0.135	0.410±0.152
8	0.373±0.128	0.402±0.132	0.377±0.134	0.390±0.146
9	0.377±0.125	0.402±0.130	0.388±0.132	0.382±0.143



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

10	0.375±0.131	0.395±0.126	0.379±0.13	0.403±0.15
11	0.381±0.125	0.394±0.128	0.39±0.135	0.386±0.147
12	0.369±0.128	0.394±0.133	0.385±0.137	0.396±0.157
13	0.378±0.127	0.398±0.134	0.382±0.141	0.405±0.151
14	0.383±0.126	0.383±0.142	0.373±0.134	0.367±0.149
15	0.380±0.125	0.392±0.126	0.390±0.130	0.404±0.152
16	0.378±0.126	0.390±0.140	0.384±0.130	0.406±0.152
17	0.375±0.127	0.389±0.138	0.381±0.131	0.396±0.153
18	0.378±0.130	0.407±0.131	0.394±0.133	0.406±0.156
19	0.389±0.121	0.399±0.135	0.393±0.139	0.410±0.155
20	0.373±0.127	0.390±0.141	0.381±0.139	0.396±0.149
21	0.377±0.126	0.393±0.130	0.395±0.136	0.395±0.154
22	0.373±0.130	0.409±0.132	0.380±0.124	0.408±0.157
23	0.380±0.129	0.402±0.128	0.385±0.132	0.400±0.150
24	0.381±0.122	0.397±0.130	0.364±0.124	0.409±0.150
25	0.380±0.133	0.415±0.125	0.394±0.127	0.405±0.149
26	0.382±0.126	0.399±0.130	0.394±0.129	0.403±0.146
27	0.375±0.132	0.403±0.128	0.372±0.134	0.401±0.157
28	0.387±0.125	0.401±0.133	0.391±0.137	0.416±0.155
29	0.379±0.126	0.394±0.129	0.380±0.140	0.400±0.152

2) Inbreeding genomico

Utilizzando il software PLINK, sono stati calcolati tre diversi coefficienti di inbreeding:

- F1= basato sulla varianza genotipica, in particolare il valore è espresso come differenza dall'unità. Animali con valori minori di 0 sono privi di inbreeding, mentre gli animali con valori superiori a 0 presentano valori di inbreeding.
- F2 = basato sull'eccesso di omozigosi;
- F3= basato sulla correlazione tra i gameti.

Ci si è concentrati sul primo coefficiente di inbreeding in quanto è il più usato ed equivalente a quello estratto dalla matrice di parentela genomica e quindi più comunemente chiamato FGRM. Degli animali analizzati per ciascuna razza, solo i seguenti presentavano valori di inbreeding superiori a zero:



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

- REN (614 animali) = 217 con inbreeding > 0%, 48 con inbreeding > 5% (Tabella 8);
- BUR (52 animali) = 23 con inbreeding > 0%, 9 con inbreeding > 5% (Tabella 9);
- CAB (45 animali) = 19 con inbreeding > 0%, 10 con inbreeding > 5% (Tabella 10);
- AGE (21 animali) = 8 con inbreeding > 0%, ma nessuno con inbreeding > 5%.

Tabella 8. Lista degli animali con valore di inbreeding più elevato per la razza Rendena.

Matricola	Fhat1	Matricola	Fhat1
10IT022990281331	5.06	10IT028990357484	7.50
10IT024990542319	5.06	10IT024990542323	7.84
10IT022990280195	5.15	10IT022990258795	7.96
10IT022990132249	5.22	10IT024990542372	8.52
10IT028990214426	5.27	10IT028990341861	8.52
10IT028990329805	5.27	10IT028990329829	8.62
10IT028990362004	5.44	10IT022990309585	8.65
10IT022990342059	5.48	10IT028990237798	8.68
10IT028990283253	5.52	10IT028990282567	8.70
10IT028990373515	5.56	10IT028990416820	8.71
10IT028990283287	5.57	10IT024990542320	9.07
10IT028990191180	5.59	10IT028990427955	9.51
10IT028990414303	5.79	10IT028990357428	10.34
10IT028990413615	5.85	10IT028990388022	10.51
10IT028990332137	5.87	10IT024990440355	11.18
10IT028990415086	5.98	10IT026990438757	13.11
10IT028990492201	5.98	10IT028990186024	14.20
10IT022990237398	6.03	10IT024990367881	15.21
10IT028990375776	6.32	10IT028990373521	15.87
10IT028990416819	6.36	10IT028990479340	19.72
10IT028990396296	6.52	10IT024990599919	20.58
10IT028990362075	6.67	10IT028990186010	21.49
10IT022990237380	7.23	10IT028990289462	21.59
10IT022990280192	7.47	10IT028990375774	29.60



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Tabella 9. Lista degli animali con valore di inbreeding più elevato per la razza Burlina.

Matricola	Fhat1
IT026990386907	5.55
IT026990306724	5.76
IT024990495300	5.93
IT024990473279	6.02
IT024990418046	6.30
IT024990350357	6.70
IT026990258405	6.84
IT024990320324	9.13
IT026990369119	10.79

Tabella 10. Lista degli animali con valore di inbreeding più elevato per la razza Cabannina.

Matricola	Fhat1
IT010990006879	5.98
IT62GE0036173	6.22
IT010990012273	6.81
IT62GE0000492	7.97
IT010990016501	11.87
IT010990018512	12.50
IT62GE0000412	13.79
IT010990002049	14.23
IT62GE0000491	18.07
IT010990018403	20.01

4) Analisi dei blocchi del genoma e del disequilibrio di Linkage

Tramite il software PLINK, sono stati calcolati il numero di blocchi e la loro lunghezza entro ciascuna razza. Il numero di SNP usato era di 114,958 marcatori e il numero di blocchi individuati di:

- REN = 20,905 blocchi con lunghezza media di 33.87 ± 44.1 kb;
- BUR = 10,931 blocchi con lunghezza media di 31.28 ± 39.49 kb;



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

- CAB = 10,014 blocchi con lunghezza media di 31.78±39.77 kb;
- AGE = 4,559 blocchi con lunghezza media di 32.61±42.01 kb.

I blocchi più estesi, ossia le regioni di genoma con più bassa ricombinazione e maggiore rassomiglianza tra gli individui, sono stati trovati a:

- REN = cromosoma 10 a 85.35-85.55 Mb con 10 SNPs;
- BUR = cromosoma 17 a 35.08-35.28 Mb con 5 SNPs;
- CAB = cromosoma 1 a 102.91-103.11 Mb con 9 SNPs;
- AGE = cromosoma 9 a 42.56-42.76 Mb con 5 SNPs.

5) Analisi delle regioni di omozigosi

Usando il pacchetto di R “detectruns” sono state calcolate le regioni di omozigosi (ROH), ovvero segmenti del genoma privi di eterozigosi. Per il calcolo delle ROH sono stati utilizzati i seguenti parametri:

- almeno 15 marcatori omozigoti di fila;
- nessun eterozigote e massimo 1 missing all’interno della ROH;
- almeno 1 Mb di lunghezza.

È stato poi calcolato, per ciascun animale, il coefficiente di inbreeding con le ROH utilizzando la formula:

$$F_{ROH} = \frac{\text{lunghezza totale delle ROH}}{\text{lunghezza totale del genoma}}$$

Sono state individuate un totale di 35,995 ROH. In Tabella 11 sono riportate le statistiche delle ROH individuate nelle 4 razze; in Tabella 12 sono illustrate le caratteristiche delle ROH per cromosoma.



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Tabella 11. Statistiche delle ROH calcolate nelle 4 razze oggetto di studio.

	Rendena	Burlina	Cabannina	Agerolese
nROH \geq 1 Mb	10,663	633	504	226
nROH \geq 2 Mb	9,291	420	331	137
nROH \geq 4 Mb	7,237	264	226	121
nROH \geq 8 Mb	4,032	138	181	72
nROH \geq 16 Mb	1,308	69	114	28
Totale nROH	32,531	1,524	1,356	584
nROH per animale				
media \pm DS	53 \pm 10	29 \pm 10	30 \pm 14	29 \pm 14
Min	24	12	14	13
Max	125	60	78	63
Lunghezza, media \pm DS				
nROH \geq 1 Mb	1.48 \pm 0.27	1.44 \pm 0.267	1.47 \pm 0.276	1.49 \pm 0.258
nROH \geq 2 Mb	2.84 \pm 0.577	2.75 \pm 0.555	2.78 \pm 0.544	2.77 \pm 0.535
nROH \geq 4 Mb	5.62 \pm 1.14	5.63 \pm 1.15	5.80 \pm 1.18	5.78 \pm 1.20
nROH \geq 8 Mb	11.10 \pm 2.24	11.3 \pm 2.25	10.90 \pm 2.14	11.30 \pm 2.13
nROH \geq 16 Mb	23.00 \pm 7.21	22.6 \pm 7.33	25.00 \pm 9.41	25.30 \pm 8.83
Media generale	4.48 \pm 5.11	4.38 \pm 5.22	5.75 \pm 7.21	5.03 \pm 5.94

La razza con il numero di ROH per animale più alto era la razza Rendena (53 \pm 10), mentre la Burlina ha mostrato il valore medio di ROH per animale più basso (29 \pm 10). Per quanto riguarda la lunghezza media delle ROH, la Cabannina ha mostrato le ROH più lunghe (5.75 \pm 7.21), mentre la Burlina le ROH più corte (4.38 \pm 5.22). Bisogna ricordare che ROH più lunghe sono indice di fenomeni di inbreeding recenti nel tempo, mentre le ROH più corte indicano eventi di inbreeding passati.



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

Tabella 12. Caratteristiche delle ROH per cromosoma nelle 4 razze oggetto di studio.

CHR	Rendena		Burlina		Cabannina		Agerolese	
	nROH	mediaMb	nROH	mediaMb	nROH	mediaMb	nROH	mediaMb
1	1,719	5.03±5.84	98	6.26±8.95	81	8.17±9.52	25	3.89±4.22
2	1,441	5.04±5.54	78	4.26±6.22	64	7.61±12.30	18	9.22±12.38
3	1,456	4.94±5.49	87	5.40±5.98	62	5.87±9.36	26	6.07±7.13
4	1,645	5.43±5.92	63	4.16±4.53	59	3.49±4.40	31	5.34±4.98
5	1,606	5.26±5.20	78	3.71±3.53	58	4.45±6.08	38	7.71±9.05
6	2,071	4.41±5.68	82	4.60±5.27	89	5.85±7.52	66	4.78±5.30
7	1,543	4.82±4.72	88	4.48±3.86	72	5.23±6.44	16	2.49±1.31
8	1,295	5.38±5.13	59	3.61±3.88	69	6.19±6.83	29	5.73±7.58
9	1,293	5.10±5.77	38	4.34±5.13	50	6.30±6.51	33	5.91±6.06
10	1,429	5.46±5.9	60	5.65±5.84	56	6.74±7.75	26	4.27±4.75
11	1,206	5.00±5.80	73	4.45±4.80	53	4.63±4.79	27	5.53±4.57
12	1,115	5.53±5.5	52	3.82±2.79	47	4.78±4.19	28	2.79±1.95
13	1,125	4.66±4.32	47	4.46±5.29	53	4.27±4.50	19	3.49±2.98
14	878	4.79±5.84	76	3.60±6.29	38	7.55±12.43	31	5.91±9.79
15	1,205	5.26±5.02	52	4.97±5.91	41	7.47±7.18	14	3.51±2.22
16	1,201	4.33±4.06	64	3.77±3.30	49	5.08±6.06	12	6.03±6.03
17	935	4.50±4.37	55	3.29±4.21	39	5.19±5.98	14	4.26±2.72
18	859	4.64±4.25	30	4.30±4.99	30	4.79±5.79	16	4.10±3.18
19	806	3.64±3.53	43	3.27±3.96	33	3.51±2.76	11	3.20±2.02
20	964	5.01±4.98	28	5.13±5.52	30	5.54±6.00	12	6.50±4.42
21	881	4.81±4.95	39	4.74±5.49	35	4.31±4.89	15	5.13±4.82
22	820	5.35±5.20	29	3.47±2.59	37	5.89±5.51	8	5.18±3.23
23	925	3.41±3.19	47	3.06±3.76	38	4.50±4.71	16	3.95±4.09
24	705	5.76±6.00	31	4.94±5.75	40	9.41±9.49	8	3.62±3.73
25	717	4.18±3.21	14	4.68±3.75	23	5.84±4.48	8	4.65±4.18
26	889	3.89±3.39	42	3.65±3.70	34	4.27±3.06	9	4.97±3.60
27	686	4.19±3.91	21	4.89±5.16	30	6.82±6.82	15	3.12±2.77
28	447	3.87±3.65	23	3.71±4.90	12	7.94±7.79	2	1.87±0.12
29	669	4.55±3.75	27	4.65±3.07	34	3.98±3.95	11	4.74±5.30



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

I coefficienti di FROH nei 29 cromosomi sono riportati in Tabella 13.

Tabella 13. Coefficienti di inbreeding da ROH medi nei 29 cromosomi nelle 4 razze oggetto di studio.

CHR	Rendena		Burlina		Cabannina		Agerolese	
	Animali	FROH	Animali	FROH	Animali	FROH	animali	FROH
1	585	0.094±0.078	41	0.095±0.112	41	0.104±0.113	14	0.044±0.046
2	572	0.095±0.081	37	0.067±0.083	32	0.112±0.160	11	0.112±0.107
3	571	0.105±0.092	40	0.098±0.103	31	0.099±0.166	13	0.101±0.141
4	570	0.131±0.110	35	0.063±0.088	31	0.056±0.070	16	0.087±0.065
5	589	0.122±0.103	47	0.054±0.078	40	0.057±0.092	19	0.130±0.155
6	603	0.130±0.107	46	0.073±0.103	39	0.116±0.105	17	0.158±0.15
7	564	0.121±0.107	41	0.09±0.074	39	0.090±0.150	13	0.03±0.021
8	546	0.113±0.104	35	0.054±0.048	27	0.140±0.149	14	0.105±0.114
9	552	0.115±0.106	25	0.064±0.086	28	0.108±0.148	17	0.110±0.133
10	566	0.134±0.115	34	0.097±0.121	33	0.112±0.120	14	0.078±0.079
11	523	0.108±0.105	38	0.080±0.139	30	0.078±0.078	10	0.141±0.144
12	518	0.137±0.115	33	0.071±0.070	24	0.107±0.106	12	0.075±0.089
13	530	0.119±0.098	24	0.105±0.100	25	0.109±0.101	11	0.074±0.067
14	567	0.095±0.115	50	0.075±0.125	39	0.095±0.168	19	0.123±0.205
15	552	0.136±0.125	30	0.102±0.159	21	0.172±0.273	7	0.083±0.102
16	540	0.121±0.108	36	0.084±0.076	31	0.100±0.139	7	0.128±0.156
17	460	0.126±0.115	30	0.083±0.087	24	0.116±0.138	7	0.118±0.058
18	465	0.132±0.122	25	0.082±0.103	20	0.110±0.128	8	0.125±0.117
19	475	0.099±0.092	30	0.078±0.086	22	0.084±0.085	11	0.052±0.043
20	559	0.123±0.125	43	0.051±0.094	34	0.071±0.120	13	0.090±0.162
21	497	0.123±0.117	29	0.092±0.102	26	0.084±0.101	12	0.093±0.100
22	468	0.155±0.131	24	0.071±0.057	20	0.179±0.145	6	0.114±0.149
23	508	0.119±0.112	26	0.107±0.096	23	0.146±0.136	9	0.135±0.153
24	481	0.138±0.137	34	0.077±0.127	33	0.186±0.228	14	0.038±0.058
25	413	0.172±0.130	10	0.155±0.205	15	0.212±0.219	6	0.147±0.129
26	465	0.144±0.140	25	0.119±0.147	17	0.165±0.159	5	0.172±0.226
27	413	0.154±0.128	17	0.136±0.188	21	0.215±0.203	10	0.105±0.084
28	331	0.114±0.113	18	0.105±0.162	10	0.208±0.276	2	0.041±0.003
29	393	0.152±0.129	21	0.119±0.100	22	0.121±0.129	9	0.114±0.176



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

I valori medi di FROH per razza erano: 0.10 ± 0.03 (Rendena), 0.05 ± 0.03 (Burlina), 0.07 ± 0.06 (Cabannina), 0.06 ± 0.04 (Agerolese). Per la Rendena il cromosoma con il valore medio più alto di FROH era il BTA25 (0.172 ± 0.130), mentre il più basso era il BTA1 (0.094 ± 0.078). Il valore più basso per la Burlina è stato riscontrato nel cromosoma 20 (0.051 ± 0.094), mentre il valore più elevato nel cromosoma 25 (0.155 ± 0.205). Per la Cabannina, i cromosomi con i valori più basso (0.056 ± 0.07) e più alto (0.215 ± 0.203) erano il BTA4 e il BTA27. Infine, per la razza Agerolese, i valori più basso (0.03 ± 0.021) e più alto (0.172 ± 0.226) sono stati trovati nei cromosomi 7 e 26.

La Tabella 14 mostra i 10 animali di ciascuna razza con i coefficienti FROH più elevati.

Tabella 14. Lista dei 10 animali con coefficiente di inbreeding da ROH più elevato nelle 4 razze oggetto di studio.

Razza	Matricola	Froh				
		> 1Mb	> 2Mb	> 4Mb	> 8Mb	>16Mb
Rendena	10IT028990375774	0.28	0.27	0.25	0.22	0.13
	10IT024990367881	0.22	0.22	0.19	0.16	0.10
	10IT022990330795	0.20	0.20	0.17	0.14	0.07
	10IT022990280182	0.19	0.18	0.17	0.13	0.09
	10IT024990559695	0.19	0.18	0.16	0.13	0.06
	10IT022990330839	0.18	0.17	0.15	0.12	0.07
	10IT022990258795	0.18	0.17	0.15	0.12	0.05
	10IT028990355935	0.17	0.17	0.15	0.12	0.08
	10IT028990458122	0.17	0.16	0.15	0.11	0.05
	10IT022990309585	0.17	0.16	0.15	0.10	0.04
Burlina	IT026990277000	0.16	0.15	0.14	0.10	0.06
	IT026990306724	0.12	0.11	0.10	0.07	0.05
	IT024990435737	0.10	0.10	0.09	0.07	0.02
	IT026990258405	0.10	0.09	0.08	0.06	0.04
	IT026990392617	0.09	0.08	0.06	0.04	0.02
	IT024990320324	0.09	0.08	0.07	0.05	0.02
	IT026990413732	0.09	0.08	0.07	0.04	0.02
	IT026990365567	0.08	0.08	0.07	0.05	0.03



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

	IT026990386904	0.08	0.07	0.06	0.04	0.03
	IT026990409344	0.08	0.07	0.07	0.05	0.02
	IT010990018403	0.34	0.32	0.31	0.28	0.21
	IT010990017197	0.20	0.19	0.17	0.15	0.11
	IT010990018780	0.18	0.17	0.15	0.13	0.07
	IT010990012380	0.16	0.16	0.14	0.12	0.08
Cabannina	IT62GE0000492	0.14	0.13	0.12	0.09	0.07
	IT010990005425	0.12	0.11	0.10	0.08	0.04
	IT010990015554	0.12	0.11	0.10	0.07	0.03
	IT010990018512	0.11	0.11	0.10	0.08	0.05
	IT62GE0000491	0.11	0.10	0.09	0.07	0.04
	IT62GE0000604	0.11	0.10	0.09	0.07	0.04
	IT063990035650	0.14	0.13	0.12	0.10	0.04
	IT066990021409	0.12	0.11	0.11	0.09	0.05
	IT066990001068	0.11	0.11	0.10	0.07	0.05
	IT063990029741	0.11	0.10	0.08	0.04	0.01
Agerolese	IT063990015450	0.10	0.09	0.07	0.04	0.02
	IT063990018830	0.08	0.07	0.07	0.05	0.03
	IT063990015434	0.08	0.07	0.06	0.04	0.01
	IT062990099117	0.06	0.06	0.05	0.04	0.02
	IT062990099101	0.06	0.05	0.05	0.04	0.02
	IT066990001093	0.05	0.04	0.04	0.03	0.02

La Figura 4 mostra l'andamento dell'inbreeding medio all'aumentare della lunghezza minima delle ROH. Come ci si aspettava, i valori medi di FROH diminuiscono all'aumentare della lunghezza minima delle ROH perché si trovano meno regioni di omozigosi e quindi la somma totale della lunghezza delle ROH per animale è minore.



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

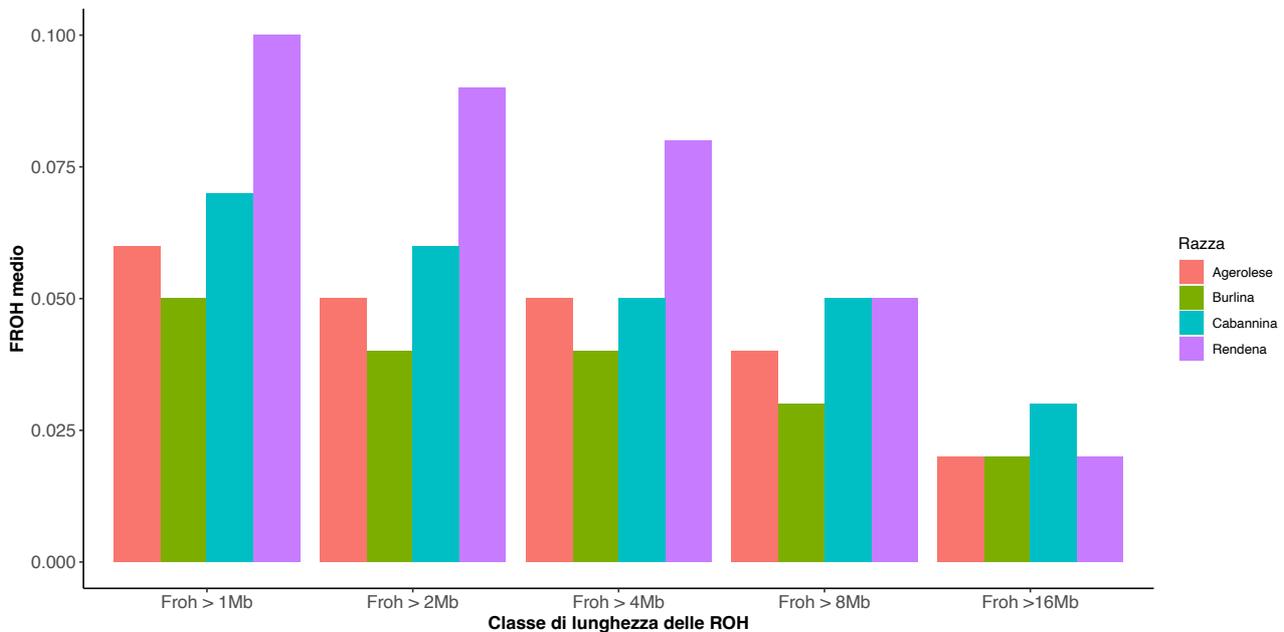


Figura 4. Andamento dei coefficienti di inbreeding medio all'aumentare della lunghezza minima delle ROH.

6) Stratificazione della popolazione

Tramite il programma PLINK è stata costruita la matrice di parentela genomica, da cui sono state estratte le componenti principali (PC). La PC1 spiegava il 37.80% della variabilità totale, mentre la PC2 il 5.07%. La Figura 5 riporta gli animali nel nuovo spazio delle componenti principali. Si può notare come ci sia una sovrapposizione degli animali delle razze Agerolese e Cabannina, con la razza Rendena che si discosta in maniera più netta rispetto alla Burlina.



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Viale Italia 39, 07100 Sassari

Partita IVA 00196350904

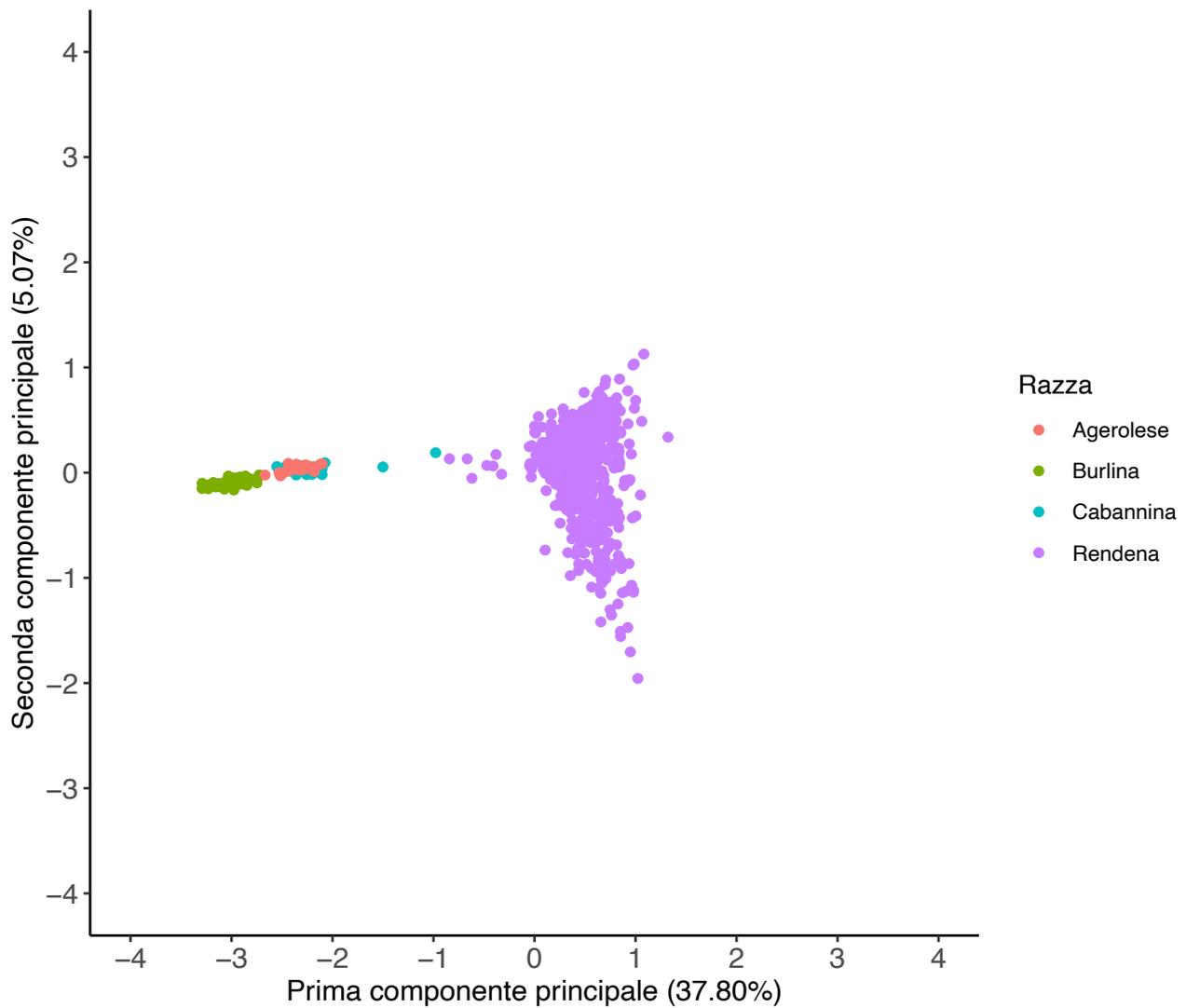


Figura 5. Grafico delle prime due componenti principali estratte dalla matrice di parentela genomica.

Il Responsabile Scientifico
Prof. Nicolò P.P. Macciotta