



Relazione sulle attività svolte in ambito di PSRN EQUINBIO.2 nel corso del 2023/24 – 7° STEP

a cura di: Prof. Roberto Mantovani – Dipartimento DAFNAE – Università di Padova

CONSULENTE SCIENTIFICO PROGETTO PSRN EQUINBIO.2-ANACAITPR

Hanno collaborato il Dott. Enrico Mancin e Dott.ssa Angelica Oian – Dipartimento DAFNAE – Università di Padova

RISULTATI INERENTI ALL'UTILIZZO DEI DATI GENOMICI IN COMBINAZIONE CON I RILIEVI MORFOLOGICI LINEARI RELATIVE AI PULEDRI SOTTO-MADRE.

Nel corso del primo trimestre del 2024 sono state portate a termine le attività del settimo e ultimo STEP del progetto EQUINBIO.2 – Sottomisura 10.2 2020-2023 per la Razza CAITPR - PSRN Programma di Sviluppo Rurale Nazionale – “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”.

Le attività finali condotte sono state indirizzate, secondo le previsioni iniziali e le successive varianti progettuali, alla valutazione sulle possibilità e risultati dell'inclusione dei dati genomici raccolti nell'ambito dell'intero progetto (quindi anche quello relativo ad EQUINBIO – PSRN 2017-2020) nelle valutazioni genetiche dei puledri sotto-madre (età 2-9 mesi circa), utilizzando sia i fenotipi tradizionalmente raccolti, sia i 4 nuovi fenotipi misurati nel corso del PSRN, ovvero direzione e lunghezza dell'incollatura, lunghezza e direzione della groppa.

Di seguito di riporta descrizione dei principali risultati emersi nel 7° step del PSRN, nel quale sono stati combinati i dati genomici disponibili di 642 soggetti genotipizzati con chip *GGPEquine70k Illumina* e *Affimetrix* 67Kb con le valutazioni morfologiche lineari tradizionali (11 caratteri) di 10.796 puledri e quelle relative ai 4 nuovi caratteri rilevati nell'ambito del PSRN relativi a 3.360 puledri.

Nella Tabella 1 vengono riportate alcune statistiche descrittive inerenti ai fenotipi (tradizionali e nuovi fenotipi) misurati sui puledri sotto-madre per i 15 rilevi morfologici nonché i valori di ereditabilità (h^2), ri-stimati per i 15 caratteri totali; ereditabilità che indica l'incidenza della componente genetica additiva sulla trasmissibilità alla discendenza di ciascuno dei caratteri analizzati.

Si ricorda, a riguardo della stima dell'ereditabilità che è stato utilizzato il seguente modello statistico:

$$y = AGAE_i + sex_j + CLetaV_k + CLetaM_l + a_m + e_{ijklm}$$

Dove, $AGAE_i$ rappresenta l'effetto dell'allevamento o gruppo di allevamenti (codificati per Area geografica-tipo di stabulazione, destinazione produttiva, profilassi vaccinale sui puledri e stato di

mantenimento medio materno) combinato con l'esperto valutatore (2560 livelli per gli 11 rilevi tradizionali e 745 livelli per 4 i nuovi fenotipi), sex_j indica il sesso del puledro (2 livelli, femmina o maschio), $CLetaV_k$ indica la classe di età del puledro alla valutazione (9 livelli), $CLetaM_l$ indica la classe di età al parto della madre (5 livelli), a_m e e_{ijklm} indicano rispettivamente la componente genetica additiva animale, $\sim N(0, \sigma_a^2)$; e il termine residui casuale, $\sim N(0, \sigma_e^2)$.

Tabella 1. Statistiche descrittive relative agli 11 fenotipi tradizionali e ai 4 nuovi fenotipi rilevati in ambito PSRN e valori di ereditabilità ri-stimate per i singoli caratteri.

Carattere	Media (sd)	h^2
Espressione/distinzione	3,38 (0,56)	0,32
Nevrilità/movimento	3,46 (0,46)	0,20
Sviluppo generale	3,49 (0,51)	0,35
Incidenza masse muscolari	3,57 (0,46)	0,29
Incidenza impalcatura scheletrica	3,00 (0,31)	0,12
Profondità toracica	3,51 (0,44)	0,27
Diametri anteriori	3,27 (0,57)	0,41
Diametri posteriori	3,54 (0,50)	0,31
Lunghezza linea dorso – lombare	3,13 (0,28)	0,13
Direzione linea dorsale	2,99 (0,10)	0,02
Falciatura/stangatura	2,99 (0,21)	0,07
Direzione incollatura	3,26 (0,41)	0,08
Lunghezza incollatura	3,23 (0,45)	0,12
Lunghezza groppa	3,18 (0,37)	0,20
Direzione groppa	3,01 (0,29)	0,09

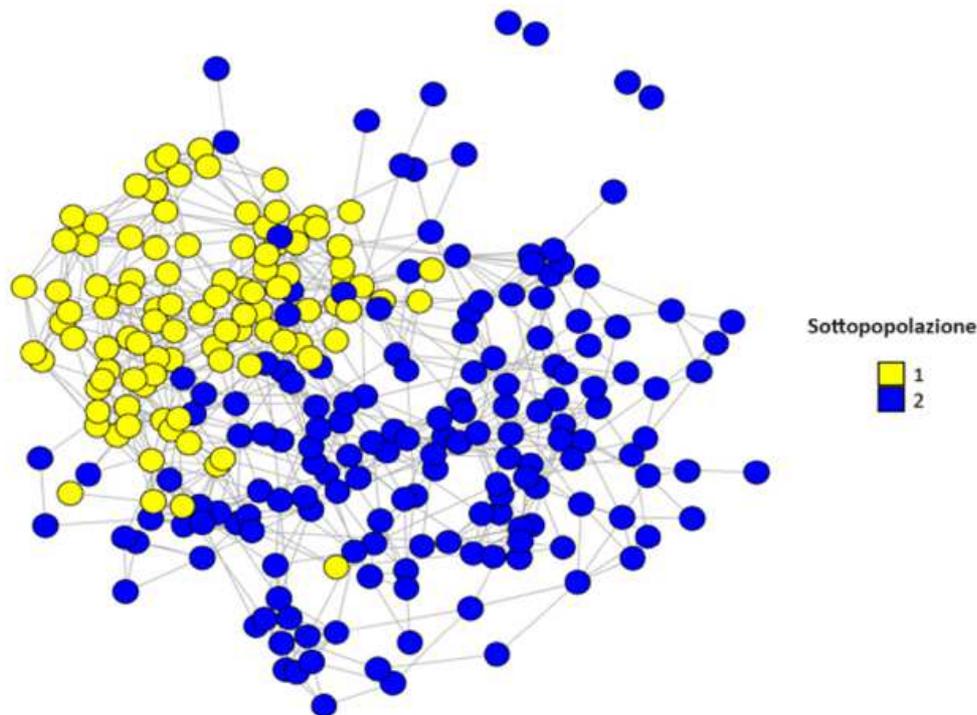
Sui rilievi effettuati emerge per quasi tutti i caratteri una media di circa 3 punti sui 5 di scala disponibili, suggerendo valori intermedi per la quasi totalità dei caratteri, se si eccettuano la profondità toracica (3,51), i diametri posteriori (3,54) e l'incidenza delle masse muscolari (3,57). Quelli con un punteggio inferiore a 3, anche se solo leggermente, sono invece la direzione della linea dorsale (2,99) e la falciatura/stangatura (2,99).

Relativamente ai valori di ereditabilità, invece, spiccano tra i caratteri tradizionali quelli inclusi nel Valore complessivo Selettivo (VSC), indice di selezione che include, appunto, l'Espressione e distinzione ($h^2=0,32$), la Nevrità/movimento ($h^2=0,20$), l'Incidenza delle masse muscolari ($h^2=0,29$), Diametri anteriori e posteriori ($h^2=0,41$ e $0,31$, rispettivamente). Di rilievo anche il valore di ereditabilità misurato per lo Sviluppo generale (0.35), carattere comunque legato (in termini di correlazione genetica) alle masse muscolari e ai diametri. Di minore impatto, tra i fenotipi tradizionali, caratteri quali l'incidenza dell'impalcatura scheletrica (0,12), lunghezza direzione dorso-lombare (0,13) e, soprattutto, direzione della linea dorso-lombare (0.02) e falciatura/stangatura (0,07). I nuovi fenotipi hanno nel complesso anch'essi messo in luce valori non particolarmente elevati di ereditabilità (h^2 da 0,08 a 0,20); ciononostante, i buoni valori di correlazione genetica emersi in precedenti analisi per questi caratteri con i 5 caratteri che costituiscono il VSC (da 0,52 a 0,66) e la maggior valenza che direzione e lunghezza dell'incollatura e della groppa hanno sulle caratteristiche dinamiche dei soggetti CAITPR, hanno suggerito il loro inserimento in via definitiva nel quadro dei rilievi effettuati sui puledri sotto-madre a partire dal 2024.

Sono state condotte delle comparazioni tra le accuratezze degli indici genetici con e senza l'impiego della matrice di parentela genomica. In generale, l'inclusione della matrice genomica ha determinato un miglioramento delle accuratezze. Tuttavia, i risultati ottenuti non sono ancora statisticamente significativi a causa del numero limitato di soggetti genotipizzati. Un aumento del

numero di soggetti disponibili per la genotipizzazione potrebbe portare a risultati più robusti e statisticamente significativi.

Utilizzando un subset di analisi genomiche uniformi, condotte con animali genotipizzati con chip GGP 70K, per un totale di 267 individui, è stato possibile condurre un'indagine sulla struttura di popolazione attraverso le informazioni genomiche. In particolare, è stata analizzata la possibile presenza di sottopopolazioni nel gruppo di animali genotipizzati, mediante un'analisi sulle proporzioni di ascendenza degli individui stessi. L'analisi ha permesso di identificare l'esistenza di 2 sottopopolazioni, rispettivamente di 102 e 155 individui. Questo risultato è stato riportato graficamente nella figura sottostante, in cui gli animali sono nodi (gialli o blu a seconda della sottopopolazione di appartenenza) e le loro distanze genetiche relative sono rappresentate dalle linee di congiunzione. Questa parte dello studio ha messo in luce come nella popolazione CAITPR esistano quindi due gruppi o sottopopolazioni di individui segregati. Guardando il grafico, gli individui della sottopopolazione 1 (gialla), risultano più strettamente connessi tra loro rispetto agli individui della sottopopolazione 2 (blu), dove, tra l'altro, quattro individui risultano non imparentati con la restante parte del gruppo e non sono collegati con nessun altro individuo.



Dal punto di vista genealogico, la diversità genetica delle due sottopopolazioni è stata spiegata da 109 antenati per la sottopopolazione 1 e 195 per la sottopopolazione 2, includendo rispettivamente 26 (cioè, il 24%) e 48 (anch'essi il 24%) animali di origine Bretone. Questa analisi, in sostanza, mette in evidenza in modo abbastanza netto l'influenza e differenziazione ancora in atto nella popolazione, dei progenitori Bretoni, nonostante la moratoria sul possibile impegno di soggetti di questa razza proveniente dalla Francia fin dal 2011.

Analisi GWAS

I dati genomici utili disponibili (642 soggetti) hanno permesso un'analisi di associazione genica (GWAS) per ognuno dei 15 caratteri considerati, utilizzando finestre composte da circa 500 SNPs ciascuna, distribuite uniformemente lungo l'intero genoma. Le finestre che spiegavano almeno l'1% della varianza genetica additiva totale sono state identificate come potenziali regioni di interesse

per individuare geni candidati. Sono stati quindi generati i “Manhattan” plot per identificare le regioni cromosomiche che mostrano un effetto significativo sul carattere (Figura 1) e, successivamente, sono stati identificati i geni che si trovavano nelle vicinanze delle regioni di SNPs significative.

Tabella 2. Identificativo del gene, posizioni iniziale e finale, SNP di riferimento, cromosoma (CHR) e posizionamento, carattere con cui risulta associato il gene (1=Espressione e distinzione, 10=Direzione linea dorsale, 15=Direzione incollatura, 18=Direzione groppa) e significatività dell’associazione (valore di P quando P>1.0).

Gene symbol	Gene start	Gene end	SNP_ID	CHR	POS	P	trait	WHTIN
VAV3	56344665	56756986	BIEC2_910408	5	56446872	1.12	1	T
VAV3	56344665	56756986	BIEC2_910441	5	56517049	1.02	1	T
VAV3	56344665	56756986	BIEC2_957800	5	56517106	1.01	1	T
VAV3	56344665	56756986	BIEC2_957840	5	56625745	1.13	1	T
VAV3	56344665	56756986	BIEC2_957843	5	56627556	1.09	1	T
VAV3	56344665	56756986	BIEC2_957854	5	56659258	1.05	1	T
CA10	27142204	27611490	BIEC2_153874	11	27313524	1.42	10	T
CA10	27142204	27611490	BIEC2_146353	11	27363048	1.44	10	T
CA10	27142204	27611490	BIEC2_146358	11	27373973	1.41	10	T
CA10	27142204	27611490	BIEC2_153933	11	27445598	1.25	10	T
CA10	27142204	27611490	BIEC2_146440	11	27516665	1.45	10	T
CA10	27142204	27611490	BIEC2_146441	11	27516857	1.41	10	T
CA10	27142204	27611490	BIEC2_146450	11	27522685	1.22	10	T
CA10	27142204	27611490	BIEC2_146456	11	27529197	1.03	10	T
eca-mir-8998	48731363	48731457	BIEC2_998366	7	48309708	1.62	15	F
eca-mir-8998	48731363	48731457	BIEC2_998369	7	48314947	1.36	15	F
eca-mir-8998	48731363	48731457	BIEC2_998395	7	48651819	1.78	15	F
eca-mir-8998	48731363	48731457	BIEC2-998408	7	48775910	2.16	15	F
eca-mir-8998	48731363	48731457	BIEC2_998409	7	48776037	1.85	15	F
eca-mir-8998	48731363	48731457	BIEC2_998411	7	48776083	1.56	15	F
eca-mir-8998	48731363	48731457	BIEC2_998414	7	48776649	1.30	15	F
eca-mir-8998	48731363	48731457	BIEC2_998415	7	48776686	1.06	15	F
eca-mir-8998	48731363	48731457	BIEC2-998408	7	48775910	1.07	18	F

CA10

Il gene CA10 si trova sull’undicesimo cromosoma del genoma equino ed è responsabile della produzione dell’anidrasi carbonica, un enzima essenziale per il trasporto dei gas e l’equilibrio acido-base nell’organismo (Nishita et al., 2005). Attualmente, le informazioni specifiche su questo gene nei cavalli sono limitate, ma studi condotti su altre specie suggeriscono che l’anidrasi carbonica potrebbe svolgere diversi ruoli fisiologici.

In uno studio su cavalli da corsa, è stata osservata una maggiore concentrazione di anidrasi carbonica nel sangue in cavalli allenati, correlata a un aumento dello stress fisico (Nishita et al., 2005). In un altro studio su bovini, l’anidrasi è stata associata alla solubilizzazione e alla regolazione dell’osteoporosi e dell’osteoartrosi (Lyu et al., 2023).

Si ipotizza che il gene CA10 possa influenzare i normali processi fisiologici come la respirazione. In questo studio il gene è risultato significativo per i caratteri di direzione e linea dorsale.

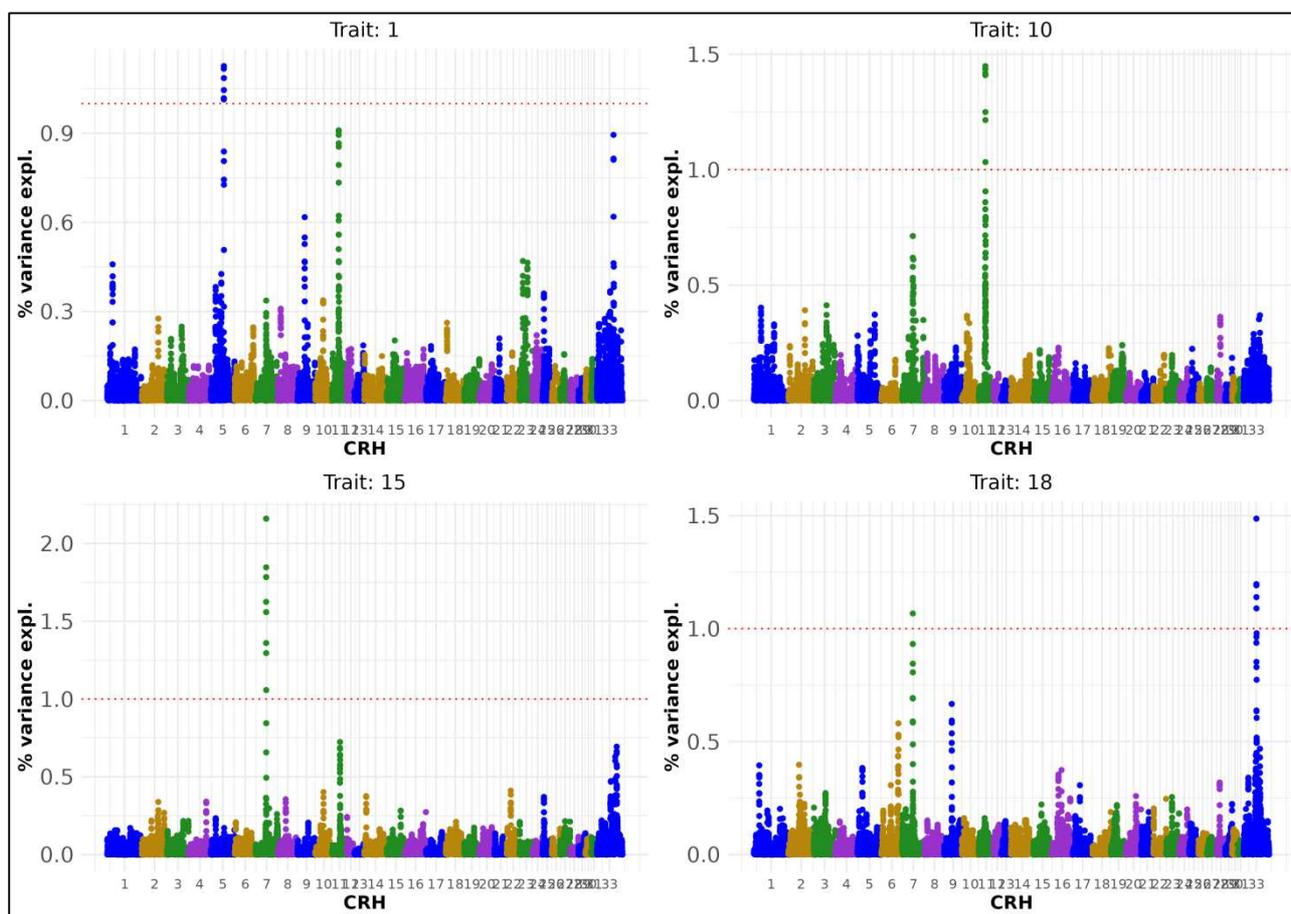
VAV3

Il gene VAV3 si trova sul quinto cromosoma del genoma equino. Appartiene alla famiglia dei fattori di scambio nucleotidico della guanina (GEFs) della famiglia Rho e potenzia l'osteoclastogenesi attraverso l'attivazione del segnale TRAF6 (Stefaniuk-Szmukier et al., 2019). Pertanto, è un fattore essenziale nella regolazione della funzione degli osteoclasti, espresso negli osteoblasti maturi e negli osteoclasti, e influenza la maturazione e lo sviluppo delle funzioni normali degli osteoclasti maturi. In uno studio condotto su 23 cavalli di razza araba ha dimostrato come alcuni geni, incluso il VAV3, mostravano un aumento significativo nella trascrizione nel periodo di allenamento dei cavalli, ad indicare che probabilmente questi geni possono essere un indicatore per il turnover osseo (Stefaniuk-Szmukier et al., 2019). In questo studio il gene è risultato significativo per il carattere di espressione e distinzione.

eca-mir-8998

Per quanto riguarda l'ultimo gene che è risultato significativo per i caratteri di Direzione incollatura e Direzione groppa non sono state trovati studi a riguardo.

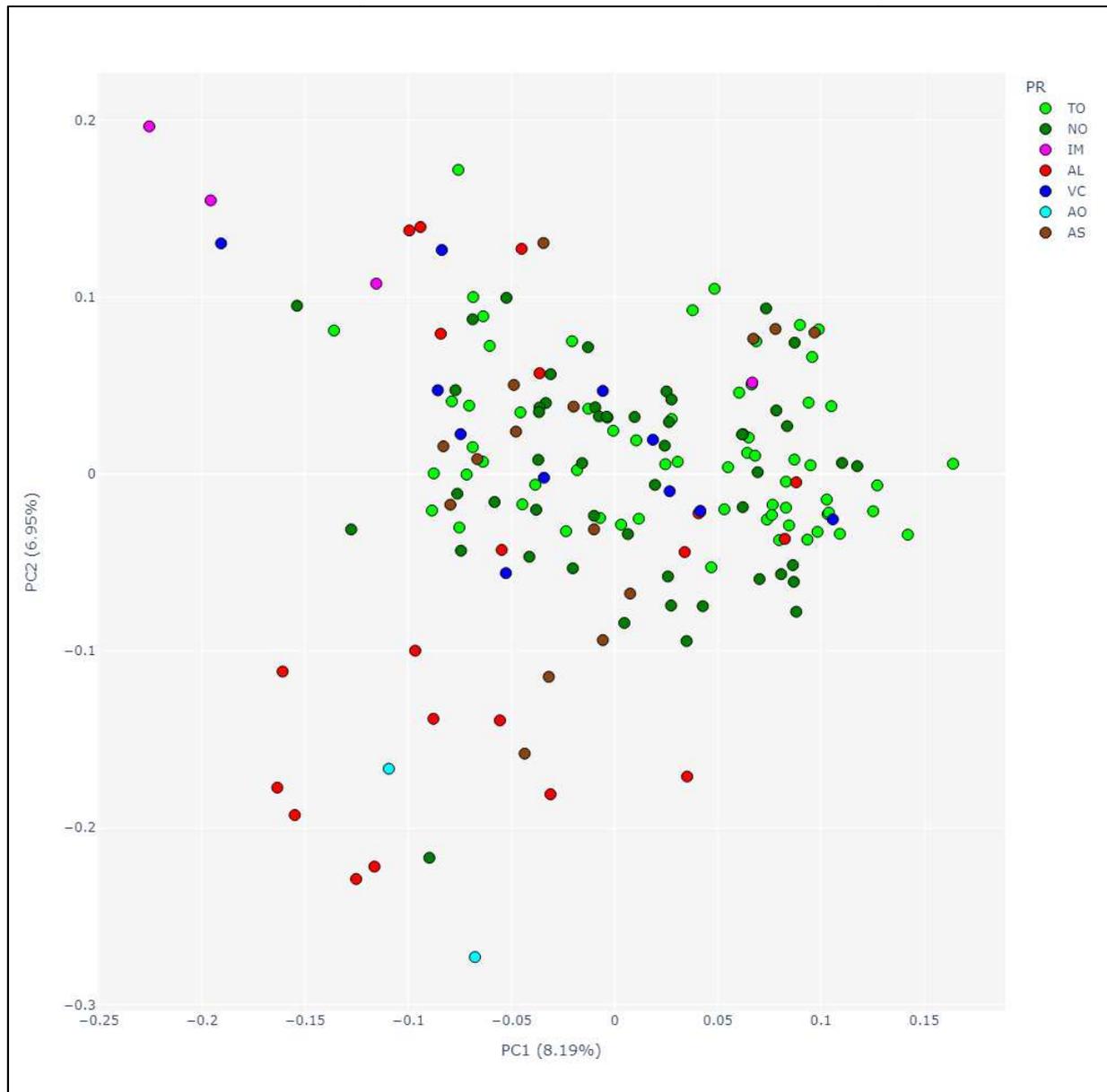
eca-mir-8998 è un microRNA e potrebbe influenzare l'espressione di geni bersaglio attraverso il meccanismo di base dei microRNA.



PCA – Principal component analysis

È stata eseguita un'analisi PCA utilizzando il software PLINK e la visualizzazione dei dati è stata realizzata attraverso un grafico. I soggetti sono stati colorati in base alla provincia di origine per esplorare la possibile struttura genetica tra le regioni. Tuttavia, il grafico non mostra distinzioni evidenti tra le diverse popolazioni regionali. Questo risultato può essere attribuito al numero limitato di soggetti inclusi nell'analisi (167 animali), dovuto alla selezione effettuata dal software

che ha portato all'esclusione di molte province e regioni. Di conseguenza, il grafico evidenzia principalmente le regioni settentrionali. Un campione più ampio potrebbe potenzialmente accentuare le differenze tra le regioni e migliorare la comprensione della struttura genetica delle popolazioni animali studiate.



CONCLUSIONI

Il settimo step del programma EQUINBIO2. ha rappresentato un utile tassello finale di completamento di attività che hanno coperto quasi sette anni di attività, consentendo finalmente l'applicazione di analisi dei dati derivanti dalla caratterizzazione genomica, ampliando ulteriormente le conoscenze e informazioni ai fini delle valutazioni genetiche della razza CAITPR.

I risultati emersi hanno in via definitiva suggerito la possibilità di utilizzare efficacemente nel programma di miglioramento genetico questi nuovi fenotipi al posto di alcuni tradizionalmente rilevati che si sono nel complesso rivelati di scarsa utilità pratica. Dal 2024 infatti sono stati inseriti in via definitiva tra i rilievi morfologici lineari sistematicamente effettuati sui puledri sotto madre la lunghezza e direzione del collo, la lunghezza e la direzione della groppa, in sostituzione dell'incidenza scheletrica, della lunghezza e direzione della linea dorso lombare e della falciatura/stangatura.

L'analisi GWAS ha consentito di identificare alcuni geni candidati di interesse generale, ma che in parte spiegano la loro utilità e legame con alcune funzioni fisiologiche che possono essere ricondotte ai caratteri con cui interagiscono.

Bibliografia

- Lyu, Y., Guan, X., Xu, X., Wang, P., Li, Q., Panigrahi, M., Zhang, J., Chen, N., Huang, B., & Lei, C. (2023). A whole genome scan reveals distinct features of selection in Zhaotong cattle of Yunnan province. *Animal Genetics*, 54(6), 731–742. <https://doi.org/10.1111/age.13363>
- Nishita, T., Takahasi, M., Kasuya, T., Matsui, K., Ichihara, N., Murakami, M., & Asari, M. (2005). Measurement of Erythrocyte Carbonic Anhydrase Isozymes (CA-I and CA-II) in Racehorses and Riding Horses Carbonic anhydrase (CA; EC 4.2.1.1) catalyzes the hydration of CO₂ and the dehydration of H₂CO₃. In *J. Vet. Med. Sci* (Vol. 67, Issue 1).
- Stefaniuk-Szmukier, M., Ropka-Molik, K., Piórkowska, K., & Bugno-Poniewierska, M. (2019). The expression profile of genes involved in osteoclastogenesis detected in whole blood of Arabian horses during 3 years of competing at race track. *Research in Veterinary Science*, 123, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.013>

Legnaro (PD), 29/05/2024

In fede

Prof Roberto Mantovani

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE) AGRIPOLIS.
Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD)

