

***Centro Interuniversitario di Ricerca e di
Consulenza sulla Genetica e la Clinica
del Cane***

Università di Pisa e Università di Camerino



**UNIVERSITÀ
DI CAMERINO**

Relazione Conclusiva del Progetto di Ricerca

***“ANALISI GENETICA E MORFO
FUNZIONALE
DELLA RAZZA BRACCO FRANCESE”***

PREMESSA

La Ricerca “*ANALISI GENETICA E MORFO FUNZIONALE DELLA RAZZA BRACCO FRANCESE*” è stata totalmente finanziata da **E.N.C.I. Ente Nazionale per la Cinofilia Italiana**, su proposta progettuale promossa dal Presidente e dal Vice Presidente del **Club Italiano Bracco Francese (C.I.B.F.)** **Signor Marco Ragatzu** e **Signor Antonino La Barbera**, entusiasti ed instancabili sostenitori nonché preziosi collaboratori dei ricercatori che hanno lavorato all’ottenimento dei risultati.

La ricerca è stata commissionata al “**Centro Inter Ateneo Università di Pisa - Università di Camerino per gli Studi di Genetica e Clinica sul Cane**” Presidente **Prof. Andrea Spaterna**. Responsabile Scientifico della ricerca **Professoressa Roberta Ciampolini**

La presente monografia riassume i risultati del programma di ricerca volto all'applicazione delle moderne tecniche scientifiche alla gestione genetica della razza Bracco Francese.

Il progetto di ricerca si basa sulle seguenti linee di studio:

1. Analisi demografica della razza Bracco Francese Tipo Pirenei e stima dei valori di consanguineità e di parentela mediante l’analisi dei pedigree.
2. Definizione dei principali parametri genetici della popolazione ed analisi della struttura della variabilità genetica della razza Bracco Francese Tipo Pirenei mediante l’impiego dei marcatori genomici di ultima generazione SNPs. Confronto dei parametri genetici della razza stimati dai dati genealogici e dai dati molecolari.
Calcolo delle distanze genetiche esistenti tra il Bracco Francese Tipo Pirenei e le principali razze canine FCI mediante l’analisi del polimorfismo dei marcatori SNPs.
3. Utilizzo di un array ad alta densità (170 K) per identificare CNV. Le varianti del numero di copie (CNV) sono un'importante fonte di variabilità genetica esistente a livello genomico complementare ai polimorfismi dei marcatori SNPs. Solo pochi studi sono stati condotti sul cane, pertanto, abbiamo utilizzato questo nuovo approccio di studio nel genoma del Bracco Francese Tipo Pirenei.
4. Il “Genome Wide Association Scan” GWAS o “Studio di Associazione Genome-Wide”, permette di esaminare l’intero genoma attraverso l’analisi dei polimorfismi dei marcatori genomici SNPs. Lo studio ha avuto per obiettivo l’individuazione di particolari polimorfismi che possono presentarsi più frequentemente in associazione a particolari caratteri morfologici o attitudinali.

INDICE DEI CAPITOLI

PREMESSA

1. INTRODUZIONE

1.1 LA VARIABILITÀ GENETICA DI “CANIS LUPUS FAMILIARIS” – “CANE DOMESTICO”, DALLA DOMESTICAZIONE ALLA COSTITUZIONE DELLE RAZZE MODERNE

1.2 LA STORIA DELLA RAZZA BRACCO FRANCESE

1.3 LA SELEZIONE CINOTECNICA PRATICATA IN ITALIA PER LA RAZZA BRACCO FRANCESE TIPO PIRENEI

1.4 LA VARIABILITÀ GENETICA

1.4.1 Azioni che riducono la Variabilità Genetica all'interno di una razza

1.5 VARIABILITÀ GENETICA - PERCHÉ È IMPORTANTE CONOSCERLA E GESTIRLA

1.6 BIBLIOGRAFIA

2. STIMA DELLA VARIABILITÀ GENETICA DELLA RAZZA BRACCO FRANCESE TIPO PIRENEI ATTRAVERSO L'ANALISI DEI DATI GENEALOGICI

2.1 MATERIALI E METODI

2.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

2.2.1 Qualità Dell'informazione Genealogica e Numerosità Effettive

2.2.2 Intervallo Di Generazione

2.2.3 Fattrici e Stalloni

2.2.4 Consanguineità e Parentela: Dati generali

2.2.5 Consanguineità Per Generazione Tracciata

2.2.6 Trend Della Consanguineità Nel Corso Degli Anni

2.3 CONCLUSIONI

2.4 BIBLIOGRAFIA

3. STUDIO DELLA VARIABILITÀ GENOMICA IN ESTENSO ED ANALISI DELLE SEQUENZE GENOMICHE IN OMOZIGOSI ROH NELLA RAZZA BRACCO FRANCESE TIPO PIRENEI

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 Campionamento, Genotipizzazione e Controllo della Qualità

3.1.2 Analisi delle sequenze ROH

3.1.3 Parametri di Variabilità Genetica, Stima del Numero Effettivo ed analisi delle Sequenze Genomiche in Omozigosità (ROH)

3.1.4 Software

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

3.3 CONCLUSIONI

3.4 BIBLIOGRAFIA

4. LA CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DEL BRACCO FRANCESE TIPO PIRENEI E LE RELAZIONI GENOMICHE CON LE RAZZE CANINE FCI

4.1 MATERIALI E METODI

4.1.1 Campionamento, Genotipizzazione e Controllo della Qualità

4.1.2 Analisi delle sequenze ROH

4.1.3 Analisi Genealogiche

4.1.4 Stima dei parametri genetici

4.1.5 Parentela Genomica e Struttura della Popolazione

4.1.6 Software

4.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

4.2.1 Parentele Genealogiche e Genomiche

4.2.2 L'analisi delle sequenze di omozigosi ROH, Numero Effettivo della popolazione (N_e) e Linkage Disequilibrium (LD)

4.2.3 Relazioni Genetiche Esistenti tra Le Razze Canine FCI ed il Bracco Francese Tipo Pirenei e Struttura Genetica delle Singole Razze

4.3 CONCLUSIONI

4.4 BIBLIOGRAFIA

5. RILEVAMENTO NELL'INTERO GENOMA DEL BRACCO FRANCESE VARIETA' DEI PIRENEI DELLE COPY NUMBER VARIATIONS UTILIZZANDO GLI ARRAY DI GENOTIPIZZAZIONE SNP

5.1 MATERIALI E METODI

5.1.1 Campionamento e Genotipizzazione

5.1.2 Individuazione delle Copy Number Variation

5.1.3 Contenuti Genici ed Annotazioni Funzionali

5.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

5.2.1 Individuazione delle Copy Number Variation e delle Copy Number Variation Regions

5.2.2 Comparazione con le Copy Number Variation Regions pubblicate

5.2.3 Copy Number Variation Regions: Contenuto Genico ed Annotazioni funzionali

5.3 CONCLUSIONI

5.4 BIBLIOGRAFIA

6 GENOME WIDE ASSOCIATION SCAN

6.1 MATERIALI E METODI

6.1.1 Campionamento e Genotipizzazione

6.1.2 Analisi delle caratteristiche Morfologiche e Funzionali

6.1.3 Messa a punto di un modello per l'analisi GWAS

6.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

6.2.1 Statistiche descrittive dei dati genotipici e fenotipici

6.2.2 Risultati dell'analisi Genome Wide Association Scan

6.2.3 Associazioni tra marcatori SNPs e Caratteristiche fenotipiche

6.2.4 Associazioni tra marcatori SNPs e Caratteristiche Attitudinali -Venatorie

6.2.5 Analisi delle associazioni tra marcatori SNPs e Caratteristiche Morfologiche

6.3 CONCLUSIONI

7. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE PER LA GESTIONE DELLA RAZZA

7.1 CONCLUSIONI

7.2 PROSPETTIVE PER LA GESTIONE DELLA RAZZA

8. PRODOTTI DELLA RICERCA

1 INTRODUZIONE

1.1 La Variabilità Genetica di “Canis Lupus Familiaris” – “Cane Domestico”, dalla domesticazione alla costituzione delle razze moderne

Le tecnologie oggi disponibili e le analisi di genetica molecolare, condotte sia a livello di DNA Mitocondriale che di DNA Genomico, permettono di comprendere in che modo, quando e dove sia iniziata la nostra relazione con quello che, a partire dal Lupo, diventerà il “Cane Domestico”. L’impiego dei marcatori SNPs permette di indagare a livello genomico l’evoluzione della Variabilità Genetica di “Canis Lupus Familiaris” (Cane Domestico), dai primi eventi di domesticazione alla costituzione delle oltre 300 razze canine attualmente riconosciute e di analizzarla anche all’interno di ogni singola razza. Studiare la variabilità genetica all’interno della razza Bracco Francese Tipo Pirenei è stato l’obiettivo principale del presente progetto di ricerca.

Fino da 100.000 anni A.C., Homo Sapiens e “Canis Lupus” (Lupo) cacciavano le stesse prede ed avevano un’organizzazione sociale molto simile caratterizzata da gruppi familiari omogenei, ruoli definiti ed una marcata gerarchia.

Olfatto, udito, forza, velocità, erano caratteristiche del Lupo molto apprezzate dalle piccole comunità umane di Cacciatori Raccoglitori. L’Uomo ha tentato più volte, in tempi diversi, con alterni risultati, ed in luoghi anche molto distanti tra di loro, di avviare il processo di domesticazione.

La storia di “Canis Lupus Familiaris” inizia in un’epoca compresa tra 30.000 e 15.000 anni A.C., con i primi eventi di domesticazione a partire dal Lupo Grigio avvenuti indipendentemente in una vasta area geografica che va prevalentemente dall’Europa occidentale, all’Asia dell’est. [1] [2], L’analisi di ossa fossili e di reperti archeologici ritrovati in siti di Homo Sapiens ha dimostrato una convivenza tra le due specie. Questi fossili suggeriscono che animali “simili al Lupo ma non ancora Cani” e l’Uomo, abbiano condiviso lo stesso ambiente ed abbiano viaggiato insieme in tutto il mondo fin dalla preistoria [2].

I più recenti studi, effettuati confrontando i risultati delle analisi condotte sul genoma nucleare del Lupo Grigio e del Cane, suggeriscono una possibile datazione per la domesticazione tra 30.000 e 15.000 anni A.C., stimabile in circa 9000 generazioni, e collocano i primi “cani/lupo” in stretta vicinanza con l’uomo in Europa già 30.000 A.C. nell’attuale Belgio, nell’attuale Francia 15.000 A.C., in varie aree dell’attuale Russia, 13.000-17.000 anni A.C., e dell’Asia quali le attuali Mongolia e Cina, 26.000 anni A.C.. [2] [3].

I primi “cani/lupo” costituivano una macchina predatrice ed un’arma perfetta non solo per collaborare alle azioni di caccia dell’uomo ma anche per difendere il territorio di caccia, le riserve di cibo e gli altri beni mobili sia da altre specie animali predatrici che da altri gruppi di uomini. Il Cane Domestico deriva dunque dal Lupo Grigio, specie che esiste ancora oggi allo stato selvaggio anche in Italia sotto la protezione delle leggi che ne vietano la caccia e che continua la sua naturale evoluzione.

Evidenze ottenute da analisi genomiche stimano che la parte codificante del DNA Genomico Nucleare del cane (Geni) differisca da quella del lupo solo per uno 0,04% indicando che le due specie sono molto vicine geneticamente. [3]

La domesticazione ha cambiato l'ambiente di vita e la fonte di cibo, entrambi questi fattori hanno alterato il consumo dell'energia ed i modelli comportamentali del cane consentendo ad individui meno predisposti alla selezione naturale di prosperare e riprodursi sotto la diretta protezione dell'uomo. Il contatto costante con l'uomo ha avuto un effetto drastico sulla variabilità genetica canina attraverso le migrazioni umane e canine in aree geografiche dove vivevano popolazioni canine diverse e loro successivi incroci, e/o re-incroci con il Lupo, casuali o voluti, ed attraverso l'allevamento e la selezione per precise caratteristiche morfologiche o attitudinali volute dall'uomo.

Il risultato di queste dinamiche ha determinato la diffusione e la fissazione di un vasto numero di mutazioni genomiche che hanno costituito la base genetica, e di conseguenza fenotipica, sulla quale l'uomo ha lavorato attraverso la selezione.

Nel tentativo di creare un compagno perfetto, l'uomo ha selezionato:

1. *Attitudini Comportamentali*: caccia, difesa, lavoro, compagnia, e più recentemente, ricerca persone scomparse, esplosivi, stupefacenti ed individuazione di stati patologici quali Diabete e Tumori.
2. *Caratteristiche Estetiche*: colore del mantello, lunghezza consistenza del pelo, conformazione della testa e dell'orecchio colore e forma dell'occhio, etc.
3. *Caratteristiche Morfo-funzionali*: dimensioni corporee, lunghezza degli arti, inclinazione della scapola e della groppa, etc.

Il processo di selezione artificiale attuata in maniera sistematica che ha portato alla costituzione delle attuali 250 razze canine riconosciute è iniziato circa 200 anni fa durante l'era "vittoriana" a partire da fenotipi prodotti da mutazioni genomiche spontanee presenti nelle diverse popolazioni canine allora esistenti, ed ha fissato tali mutazioni mediante la scelta di riproduttori maschi e femmine portatori delle caratteristiche desiderate.

Le regole adottate dal processo di selezione sono state molto stringenti imponendo che i genitori di ogni nuovo cucciolo, affinché questo potesse essere iscritto ad una razza, dovessero essere iscritti a loro volta nel registro della stessa razza. Inoltre, sono stati stabiliti dettagliatissimi standard di razza ai quali attenersi, riportanti caratteristiche morfologiche precise (dimensioni corporee, conformazione e colore del mantello ed attitudini comportamentali qualificanti la razza)

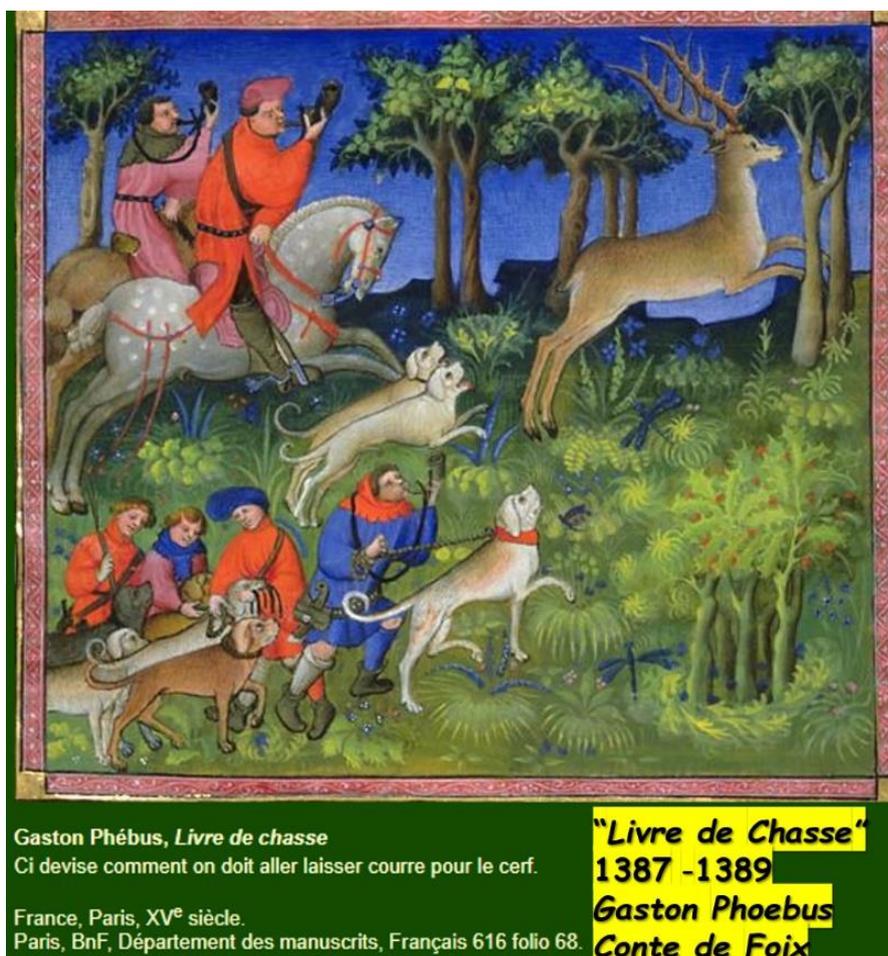
Nel 1859 in Inghilterra è stato fondato il primo Kennel Club, il cui compito era quello di regolamentare le Mostre e stabilire uno Stud Book all'interno del quale descrivere i vari tipi di cani, come già si faceva da tempo con i cavalli. Nello Stud Book ad ogni cane è stato assegnato un codice e ne è stato registrato pedigree. Se uno stallone o una fattrice avevano un albero genealogico affidabile e riportante molte generazioni, anche questo veniva registrato. Il Kennel Club Italiano istituito 1881 aveva lo scopo di ricostituire alcune razze italiane in via di estinzione ed introdurre in Italia razze straniere poco conosciute. Nel 1882 il Kennel Club Italiano aprì il Libro delle Origini Italiano (LOI). Nel 1930 dal Kennel Club Italiano ebbe origine **l'Ente Nazionale della Cinofilia Italiana (E.N.C.I.)**. I Club delle singole razze selezionando hanno contribuito a generare la variabilità morfologica osservata nelle attuali razze canine ed attraverso le registrazioni ed il monitoraggio dei pedigree da parte deli Kennel Club Nazionali, è stata determinata e garantita la costituzione di popolazioni geneticamente chiuse "Le Razze". Gli Stud Book e gli Standard di razza sono in vigore anche oggi ed hanno la stessa funzione di 200 anni fa.

1.2 La Storia della Razza Bracco Francese

Come per tutte le razze canine moderne, anche la razza Bracco Francese, è stata formalmente costituita alla metà del 1800 con l'istituzione del Club di Razza, la costituzione dello Stud Book, la registrazione dei pedigree e l'attuazione di piani selettivi tendenti al raggiungimento delle caratteristiche morfologiche e funzionali descritte nello standard di razza.

A differenza delle altre razze canine, la Razza Bracco Francese è forse l'unica che può vantare la storia delle sue origini insieme ad una dettagliata descrizione morfologica attitudinale iscrivibile in un contesto storico e geografico documentabile e dunque certo.

Il Trattato sulla Caccia o "Livre de Chasse", scritto dal Conte de Foix Gaston Phoebus tra il 1387 ed il 1389, attualmente conservato presso la Bibliothèque Nationale de France, in un capitolo dedicato ai cani da caccia, <http://expositions.bnf.fr/phebus/chasse/index.htm>, illustra dettagliatamente le razze canine e le rispettive specialità di caccia che fanno parte della muta del Conte de Foix, anche attraverso immagini che ne offrono una fedele rappresentazione.



Il Conte di Foix Gaston Phoebus descrive, “...una varietà di cani in grado di individuare le piste del selvatico... ed una varietà di cani in grado di affrontare prede di grande taglia ed aggressive come il cinghiale” [4].



“... una varietà di cani per inseguire a lungo e stancare il cervo ... ed una varietà di cani coraggiosi pronti a cacciare prede feroci come la Lince ... [4].



“..... una varietà di cani Levrieri che fiutano ed individuano la lepre nei terreni coltivati ... ed infine descrive una varietà di **cani da ferma** che definisce “**chiens d’oiseaux ou épagneuls**”, di cui la

rappresentazione grafica si trova al centro dell'immagine tratta dal Folio 40v (Livre de Chasse Folio 40v). http://expositions.bnf.fr/phebus/grands/c16_616.htm ” [4].



La somiglianza morfologica del “Chien d’Oiseaux o Epagneul” con l’attuale Bracco Francese risulta evidente. La forma della testa dell’orecchio del muso, la colorazione e la distribuzione delle macchie sul mantello così come il portamento e la lunghezza della coda che oggi viene tagliata, sono identiche.



In Francia la selezione ha determinato la creazione di due diverse tipologie di Bracco Francese caratterizzate da aspetti morfologici e conseguentemente, aspetti funzionali diversi:

Il Bracco Francese Varietà Pyrénées, originario della zona centrale dei Pirenei, di taglia più piccola con una struttura scheletrica leggera e di temperamento nevrile, ed il Bracco Francese Varietà Gascogne originario del sud ovest della Francia, di mole più imponente con scheletro più pesante e temperamento meno nevrile.



Bracco Francese Tipo Pyrénées



Bracco Francese Tipo Gascogne

In Francia, fino alla fine degli anni '70 dello scorso secolo, era prevista la possibilità, di accoppiare soggetti delle due differenti varietà ed i cuccioli nati da questi accoppiamenti, nella medesima cucciolata, venivano iscritti, alcuni come Pyréné, ad altri come Guascogne, secondo le caratteristiche morfologiche presentate. La "Confirmation", procedura ancora utilizzata in Francia per tutte le razze canine, ha dato possibilità anche in seguito, quando si era deciso di non praticare più l'accoppiamento tra le due varietà, di iscrivere al Libro delle Origini Francesi LOF nella stessa cucciolata parte dei soggetti come Tipo Pirenei e parte come Tipo Guascogne. La suddetta pratica oggi non risulta sentenzialmente vietata ma non viene più attuata. Di fatto, la selezione effettuata in Francia fino a pochi decenni fa ha determinato, all'interno della razza Bracco Francese, linee di sangue che derivano da entrambe le varietà.

1.3 La selezione Cinotecnica della razza Bracco Francese Tipo Pirenei praticata in Italia

*** Comunicazione Personale del Presidente Club Bracco Francese Sign. Marco Ragatzu*

fino all'anno 2002 la presenza del Bracco Francese Tipo Pirenei in Italia è stata esigua, con limitatissime importazioni di riproduttori e poche cucciolate prodotte dagli allevatori italiani. Nel 2002, nasce il Club Italiano Bracco Francese C.I.B.F. (nel 2006 riconosciuto dall'Ente Nazionale della Cinofilia Italiana ENCI) che avvia una oculata selezione zootecnica per la tutela e promozione della razza. L'obiettivo selettivo, oltre all'adeguamento allo standard di razza previsto, mirava all'ottenimento di Bracchi Francesi Tipo Pirenei ben distinti dal Tipo Guascogne, ed al contempo ben lontani dalle particolarità che caratterizzano la Razza Pointer, preservando gli aspetti somatici riguardanti i punti della regione della testa e del tronco intero.

Determinante è stato lo stretto rapporto di collaborazione intercorso tra il Club C.I.B.F. e la Presidente del Club Bracco Francese Francia M.me Cerianà, storica e profonda conoscitrice delle diffuse linee di sangue utilizzate in Francia, che ha permesso di approfondire le cognizioni riguardanti le fondamentali caratteristiche del Bracco Francese Tipo Pirenei. La suddetta collaborazione ha permesso di individuare in Francia i migliori riproduttori ed i loro prodotti e di acquisire al contempo una precisa conoscenza zootecnica che ha consentito di dare inizio

all'importazione in Italia di soggetti appartenenti a linee di sangue definite "pure" che non presentavano antenati della Tipologia Guascogne. Ciò a garanzia dell'ottenimento di soggetti Bracco Francese Tipo Pirenei che maggiormente interessavano gli allevatori italiani. In Italia ha inizio così la selezione che ha potuto godere di un oculato lavoro di collaborazione tra i Soci del Club C.I.B.F., i quali hanno sapientemente considerato le indicazioni fornite dalla Commissione Tecnica del Club C.I.B.F., sia per l'impiego dei riproduttori nati in Italia che nell'utilizzo degli stalloni francesi.

E' stata affidata al Club C.I.B.F. anche la distribuzione dei cuccioli in Italia, cercando di garantire una presenza diffusa e diversificata in tutta la Penisola, senza concentrazioni di soggetti delle medesime cucciolate nello stesso territorio a facilitare la scelta dei riproduttori maschi e femmine per gli accoppiamenti futuri. Da sempre è stato attuato un approfondito lavoro di controllo dei risultati ottenuti con l'attuazione degli schemi selettivi grazie agli strumenti di valutazione adottati dal Club C.I.B.F. e consistenti nelle verifiche funzionali, (prove di lavoro) e nelle verifiche morfologiche, (raduni ed esposizioni), organizzate direttamente dal Club C.I.B.F., aventi per obiettivo la valutazione morfo-funzionale dei riproduttori e delle giovani generazioni.

In Italia la gestione della Razza da parte del Club C.I.B.F. ha consentito di ottenere una base genetica sufficientemente ampia e monitorata da un punto di vista selettivo e cinotecnico, che nel tempo ha permesso sia di conservare la purezza delle caratteristiche fenotipiche che di mantenere le caratteristiche attitudinali del Bracco Francese Tipo Pirenei.

Oggi, dopo quindici anni di un accurato e rigoroso lavoro di selezione, si può parlare di una vera e propria "sottopopolazione" italiana del Bracco Francese Tipo Pirenei.

1.4 La Variabilità Genetica

Nel Genoma del Cane è contenuta una straordinaria quantità di Variabilità Genetica che si manifesta con una grande variabilità fenotipica e che contraddistingue le diverse razze canine. [5] In nessun'altra specie allevata dall'uomo possono coesistere razze che differiscono tra di loro per le dimensioni corporee di oltre 30 volte come ad es. il Chihuahua vs l'Alano. [6] [7]

Conseguentemente all'azione svolta dai piani selettivi che attendono agli stringenti standard di razza, ogni razza canina rappresenta oggi una popolazione isolata dalle altre razze, ovvero, costituisce un'"Isola di Variabilità Genetica" nell'arcipelago delle oltre 300 razze oggi riconosciute e che, pur essendo contraddistinte dalle più disparate caratteristiche morfologico-attitudinali, appartengono ad un'unica specie "Canis Lupus familiaris". Questa condizione fa sì che ciascuna razza possieda al suo interno una ridotta variabilità genetica rispetto all'elevata la variabilità genetica che esiste tra le diverse razze. [3].

1.4.1 Fattori che influiscono sulla Variabilità Genetica presente all'interno di una razza

A) Utilizzo frequente degli stessi riproduttori

La Variabilità Genetica all'interno delle diverse razze è stata spesso ridotta dal frequente utilizzo di stalloni e fattrici in un arco temporale piuttosto ristretto corrispondente alla carriera riproduttiva del singolo soggetto e questo in virtù del fatto che alcuni riproduttori risultano più popolari di altri in quanto vincitori dei principali concorsi di bellezza o delle gare di performance. Alcuni stalloni possono, nell'arco della loro esistenza, diventare i padri anche di oltre 100 cucciolate. Se si considera che in media nascono 8 cuccioli per cucciolata, si può intuire quale impronta genetica possono imporre pochi stalloni in pochi anni sull'intera razza riducendone drasticamente la variabilità genetica totale. Qui di seguito a titolo esemplificativo viene riportato in **Tabella 1** l'utilizzo di stalloni e fattrici per la razza "**Bracco Francese Tipo Pirenei**" nel periodo di tempo che va dall'anno 2000 al 2016. Come avremo modo di illustrare di seguito, questa razza è stata gestita con la massima accuratezza nella scelta dei riproduttori maschi e femmine, proprio per evitare che si riducesse la variabilità genetica al suo interno, ma anche perseguendo questo obiettivo, è facile osservare come alcuni stalloni in soli 3-4 anni abbiano avuto 30, 40, 50, ed addirittura 71 cuccioli. Sempre per le stesse motivazioni, in un'identico arco temporale, le femmine hanno generato, per ovvi motivi fisiologici, un numero di cuccioli inferiore rispetto agli stalloni, ma hanno ugualmente impresso la loro impronta genetica sulla razza con oltre 20, 30, ed addirittura 40 cuccioli per carriera riproduttiva.

Tabella 1. Numero di Cuccioli per Stalloni e Fattrici più utilizzati nel periodo 2000-2016 **

Stalloni	Nome	N° figli ANNI 2000-2016																	
		2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
STALLONI																			
LO00106650	ORION DU MAS D'ERDIAL	25	12	0	0	0	0	7	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LO0749890	VAL DES RESTANQUES DE LA COLLE NOIR	40	0	0	0	0	0	0	0	17	13	4	6	0	0	0	0	0	0
LO08126314	ADRIANO DE FELPAOLA	26	0	0	0	0	0	0	0	0	19	7	0	0	0	0	0	0	0
LO0844885	GERRI	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49	7	10	0	0	0	5
LO1195088	BOSQUU DU CLOS DE GAOU	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	9	18	8	0	0	0
LO10177229	MADE IN CANADA AXEL	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	16	5	0
LO1370875	HIDRO DE LA VALLEE DU NEBBIU	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	2	10	0
LO1370875	IACOPO DI S.DONATO	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	0
LO0715122	BUFFON DEL LIMONCELLO	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	15	0	5	6	0	0
LO0715125	BRIX DEL LIMONCELLO	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	1	0	0	0
LO1372667	DEMON	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
LO09107414	BARONE	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	0	8	0
LO10115150	FEAL	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18
LO04118811	ROLAF DU VALLON DE BEAUDINI	44	0	0	0	0	26	2	11	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LO04118815	VASCODELLIMONCELLO DI S.DONATO	20	0	0	0	0	0	0	5	4	5	6	0	0	0	0	0	0	0
Fattrici																			
FATTRICI																			
LO01130412	OKA DU MAS DU DIABLE	34	5	4	0	8	15	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LO0224307	LUNA DI S.DONATO	29	0	0	0	8	4	6	5	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LO04118817	VASIA DI S.DONATO	19	0	0	0	0	0	8	0	9	0	0	2	0	0	0	0	0	0
LO0418839	ONDINE DE LA SUELIERE	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LO0852675	COE	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	10	7	8	4	0	7	0
LO1297402	IOLE DELLE SURIE	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
LO10190562	FRIDA	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	5	0	8	0
LO10115148	FLORA	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
LO1198376	NANA	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
LO0538575	UTESSE DE LA TOUR SARRAZINE	22	0	0	0	0	0	2	0	1	9	0	7	0	3	0	0	0	0
LO0850878	AMBRA DELLE SURIE	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8	0	4	0	0
LO06115808	BIBA DEL SANDALYON	16	0	0	0	0	0	0	0	0	6	4	0	0	6	0	0	0	0
LO064181	ZITA DI S.DONATO	28	0	0	0	0	0	5	4	5	6	5	0	3	0	0	0	0	0
LO04118820	VIVA DI S.DONATO	31	0	0	0	0	0	0	10	11	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LO0747443	ASIE DE TEBSEMA	24	0	0	0	0	0	0	0	5	7	5	7	0	0	0	0	0	0

**Comunicazione Personale del Presidente Club Bracco Francese Sign. Marco Ragatzu

B) Stratificazione della variabilità genetica

Studi condotti a livello genomico hanno evidenziato una stratificazione della variabilità genetica all'interno delle razze canine derivante dalla popolarità ed apprezzamento da parte del pubblico di varianti diverse delle dimensioni corporee come ad esempio nel caso della razza Schnauzer in cui si differenziano sottopopolazioni a taglia di dimensioni medie, (medio Schnauzer), giganti (Riesen Schnauzer) e ridotte (Zwerg Schnauzer), oppure dalla popolarità legata alla moda, di alcune varietà del colore del mantello come ad esempio nella razza Barboncino Toy, in cui le varianti possono essere: nero, bianco, marrone, grigio, albicocca e rosso fulvo. Infine, la stratificazione della variabilità genetica all'interno di una razza può essere determinata dalla diffusa pratica in cinotecnica dell'accoppiamento in Consanguineità o Inbreeding imposto dai selezionatori per propagare e fissare determinati caratteri fenotipici.

C) La pratica dell'accoppiamento in Consanguineità o Inbreeding e le sue conseguenze

Nella selezione delle razze canine, al fine di fissare determinate e precise caratteristiche fenotipiche imposte da standard di razza eccessivamente stringenti, è stata adottata la pratica piuttosto diffusa degli accoppiamenti tra soggetti consanguinei o in Inbreeding.

L'Inbreeding risulta dall'accoppiamento di animali parenti. Maggiore è il grado di parentela dei due riproduttori e maggiore sarà l'Inbreeding presentato dai cuccioli. L'Inbreeding è espresso da un coefficiente che può assumere qualunque valore compreso tra zero (nessuna consanguineità) ed uno (massima consanguineità teoricamente possibile con l'autoriproduzione riscontrabile in campo vegetale ma non per gli animali superiori). Il coefficiente di Inbreeding di un soggetto (F_D), che è uguale alla metà del coefficiente di parentela additiva tra i suoi genitori ed indica la percentuale media di loci omozigoti per discendenza. In altre parole, esso esprime la frazione media del patrimonio genetico che un individuo riceve, in forma identica, sia dal padre che dalla madre in virtù del fatto che i genitori erano tra loro imparentati. Il calcolo del coefficiente di Inbreeding (F_D) degli individui è molto utile e deve essere condotto e monitorato in un allevamento, onde evitare gli effetti deleteri che sorgono in seguito ad un uso eccessivo della consanguineità e riassumibili brevemente in tre punti fondamentali:

1) Nei Geni che presentano alleli recessivi rari e indesiderati, e che in condizioni di non consanguineità si trovano frequentemente allo stato eterozigote, risulta maggiore la probabilità che vengano a trovarsi allo stato omozigote determinando la comparsa di patologie ereditarie. Il data base più esaustivo ed aggiornato riguardante i test per il depistaggio delle principali patologie canine a base ereditaria monofattoriale si trova al sito <https://www.vetgen.com/allbreedslist.aspx>

2) L'Inbreeding riduce la variabilità genetica all'interno di una razza che conseguentemente risulta meno suscettibile al miglioramento genetico. Se tutti gli individui di una popolazione fossero geneticamente uguali tra di loro, nessuna scelta sensata potrebbe essere operata a scopo selettivo.

3) L'Inbreeding determina un fenomeno chiamato "Depressione da Inbreeding" che si manifesta in generale con una diminuzione delle performance medie dei soggetti consanguinei per caratteri produttivi (nel caso degli animali da reddito) ma soprattutto per i caratteri riproduttivi (tasso di fertilità, tasso di concepimento, nati vivi per cucciolata), con evidenti ripercussioni negative sull'allevamento. Il coefficiente di consanguineità si accumula se gli accoppiamenti tra parenti vengono ripetuti nelle successive generazioni. Ad esempio, accoppiando un maschio e una femmina figli dello stesso cane e di madri diverse (mezzi fratelli di padre) il coefficiente di consanguineità dei cuccioli ottenuti sarà uguale allo 0,125. Se ripetiamo nuovamente un tale accoppiamento, il coefficiente di consanguineità raggiungerà il valore di 0,219 alla seconda generazione, di 0,305 alla terza, di 0,381 alla quarta, di 0,449 alla quinta e così via.

Normalmente l'allevatore cerca di evitare di accoppiare tra loro parenti di primo o secondo grado (parenti stretti), ma non dobbiamo dimenticarci del cosiddetto "Back-ground Inbreeding" ovvero della consanguineità che si viene ad accumulare di generazione in generazione. Prima di pianificare degli accoppiamenti risulta dunque necessario monitorare almeno 4-5 generazioni antecedenti nei pedigree di stalloni e fattrici proprio per evitare di raggiungere un livello critico di consanguineità.

La consanguineità di un soggetto non si trasferisce alla progenie se questo viene accoppiato ad un soggetto non parente: se due soggetti consanguinei ma non parenti vengono accoppiati la loro progenie avrà consanguineità pari a zero.

Su quale sia il coefficiente di consanguineità ritenuto pericoloso, ovvero oltre il quale non è opportuno spingersi, esistono pareri contrastanti.

In linea generale dobbiamo ricordarci che nessun coefficiente di consanguineità è esente dalla depressione da inbreeding, ovvero, gli effetti deleteri sono proporzionali a tale coefficiente, e valori superiori a 0,100 devono essere tenuti sotto controllo.

E' bene pertanto che gli allevatori, quando decidono di effettuare degli accoppiamenti "in purezza", controllino la parentela esistente tra lo stallone e la fattrice che intendono destinare all'accoppiamento per una razionale e responsabile gestione della variabilità genetica.

1.5 VARIABILITA' GENETICA: perché è importante conoscerla e gestirla

La caratterizzazione e la valutazione della variabilità genetica possono fornire un utile strumento di indagine per l'individuazione di adeguate strategie nella corretta gestione del patrimonio genetico di popolazioni canine caratterizzate da un ridotto effettivo numerico, quali il Bracco Francese Tipo Pirenei.

In tal senso, gli strumenti forniti dalla biologia molecolare consentono di approfondire le conoscenze relative al livello di variabilità ed alla stratificazione genetica della popolazione allo studio. Negli ultimi anni è stato avviato un numero crescente di studi volti alla caratterizzazione molecolare delle principali razze canine. Gli studi più recenti, realizzati mediante metodiche di indagine genomica, pur confermando le relazioni tradizionalmente accettate, consentono, in alcuni casi, di evidenziare anche nuove inattese connessioni tra razze o gruppi di razze. In aggiunta, lo studio diretto del genoma consente di integrare le informazioni genealogiche relative alla struttura genetica presente all'interno di una razza. Questo permette di raggiungere elevati livelli di accuratezza nella stima dei principali parametri demo-genetici che, soprattutto per popolazioni a contenuto effettivo numerico, costituiscono gli indicatori fondamentali per la verifica di una corretta gestione delle risorse disponibili.

L'adozione di strategie ottimali di selezione rappresenta un requisito fondamentale per la salvaguardia e la valorizzazione delle popolazioni canine e con esse dell'insieme di valori storico-culturali ed ecologici associati alla loro attività di utilizzazione primaria.

Interrogarsi sulle cause che determinano la perdita della Variabilità Genetica costituisce il primo passo per gestire responsabilmente il futuro di una razza. Quando una razza si avvia verso una condizione di ridotta variabilità genetica, il Club di Razza che la gestisce ha tutto l'interesse a cercare di capire quali siano le cause di questo stato di cose, ma ha anche il dovere di gestire consapevolmente la razza di cui è responsabile per cercare di invertire la rotta, se questa porta verso una direzione sbagliata, e per cercare di trovare dei rimedi fino a quando si è ancora in tempo.

Le attuali conoscenze e la possibilità di indagare direttamente il genoma degli animali, al fine di evidenziare, sia il reale livello di variabilità genetica oggi esistente nella popolazione, sia di monitorarne l'andamento negli anni a venire, costituiscono un mezzo potentissimo che ci fornisce la Genetica Molecolare per attuare concretamente un fattivo piano di salvaguardia della razza Bracco Francese.

L'esigenza di salvaguardia della variabilità genetica nasce:

- 1) dalla necessità di conservare forme alleliche utili e di scongiurare l'eccessiva fissazione in omozigosi di varianti alleliche che determinino il manifestarsi di patologie a base genetica. Le piccole popolazioni, infatti, sono maggiormente soggette alle fluttuazioni della deriva genetica, per azione delle quali alcune forme alleliche possono essere casualmente fissate nella popolazione ed altre possono, invece, andar perdute, con una complessiva riduzione della variabilità genetica ed un aumentato rischio di "*mutational meltdown*" (accumulo di mutazioni deleterie, con conseguente riduzione della salute genetica ed ulteriore, conseguente, declino della numerosità della popolazione);
- 2) dalla necessità di preservare una variabilità utile nei confronti di possibili cambiamenti degli obiettivi selettivi;
- 3) dalla necessità di scongiurare un impoverimento di variabilità genetica che si traduce anche in una riduzione della fertilità e della prolificità. Nelle piccole popolazioni, in aggiunta, aumenta anche la probabilità che soggetti imparentati tra di loro si accoppino, originando individui consanguinei

(caratterizzati da un aumento dei livelli di omozigosità e, maggiormente soggetti al fenomeno della depressione dovuta all'Inbreeding).

4) per motivazioni di ordine storico e culturale ed etico, in quanto la variabilità genetica non rappresenta esclusivamente un bene da difendere e da trasmettere a chi si troverà a gestirla per il futuro ma anche un bene in sé e per sé in quanto qualsiasi riduzione della variabilità genetica si rivela una pericolosa perdita sia per la razza canina allo studio che per l'intera specie, per i responsabili della gestione genetica di una razza (Club di Razza) ed infine per la biodiversità in generale.

Un aspetto importante ai fini del mantenimento e dell'ampliamento della variabilità genetica è quello relativo alle modalità di gestione della riproduzione.

Le azioni generali da intraprendere in un piano di accurata gestione della variabilità genetica all'interno di una razza dovrebbero prevedere:

- 1) l'identificazione e caratterizzazione dei singoli individui, evidenziandone peculiarità e potenzialità in termini di contributo al mantenimento della biodiversità, utilizzo attitudinale, rilevanza culturale ed ecologica;
- 2) il monitoraggio dei parametri demografici e la valutazione del rischio di ridotta variabilità genetica;
- 3) lo sviluppo di azioni che favoriscano, dove possibile, anche la valorizzazione economica della razza, quale strumento efficace di incentivazione alla salvaguardia (ad esempio, attraverso la valorizzazione del legame col territorio e con le tradizioni storico-culturali legate al suo allevamento quali caccia, utilizzo nella transumanza o nella custodia delle greggi che favoriscano nuovo impulso alla valorizzazione e diffusione della razza stessa);
- 4) l'adozione di strategie di conservazione del materiale genetico congelamento del seme e di ovuli nel caso di razze a ridotto effettivo numerico;
- 5) lo sviluppo di azioni di sostegno per la sensibilizzazione e l'educazione alla conservazione della biodiversità, con la promozione del riconoscimento presso ENCI di popolazioni canine legate al territorio in cui sono nate delle quali è un esempio il "Segugio Maremmano" recentemente riconosciuto o il "Toccatore Abruzzese" per il quale il riconoscimento non è stato ancora avviato, mediante l'adozione di politiche e strumenti normativi appropriati, il coinvolgimento e la ricerca di sinergie tra tutte le parti in causa (privati, Club di razza, ENCI e mondo accademico...);
- 6) La caratterizzazione e la valutazione della variabilità genetica intra-razza al fine di una corretta gestione e conservazione.

Da questo breve elenco di azioni risulta chiara l'importanza che il monitoraggio e la gestione della Variabilità Genetica assumono nella corretta gestione delle razze canine.

Le razze canine in passato sono state tradizionalmente studiate e classificate in base al loro ruolo nelle attività umane, in base a caratteri fenotipici e ad un insieme di informazioni di natura storico-evolutiva.

Nella realtà odierna non si può più parlare di "fatalità" nel caso in cui una razza presenti una ridotta variabilità genetica. Le moderne e sempre più performanti tecniche di indagine genomica forniscono un utile strumento nella stima della variabilità genetica, permettendo di valutarne la reale

entità all'interno di una razza e di poterla gestire ed ampliare impostando adeguate strategie di corretta gestione del patrimonio genetico attraverso mirati piani di selezione. Ad esempio, l'uso di marcatori molecolari STR può fornire un prezioso supporto per un Club di razza, prima di gestire i piani di accoppiamento, attraverso genotipizzazioni individuali, utili nella ricostruzione e/o nella conferma delle relazioni di parentela mediante test parentali permettendo in questo modo di validare con la massima accuratezza ed affidabilità le informazioni contenute nei pedigree.

Lo studio diretto del genoma mediante marcatori SNPs consente di integrare le informazioni genealogiche relative alla struttura genetica presente in seno ad una razza e permette di raggiungere elevati livelli di accuratezza nella stima dei principali parametri demo-genetici che costituiscono gli indicatori fondamentali per la verifica di una corretta gestione delle risorse disponibili. Nella valutazione della variabilità genetica intra-razza, l'uso di marcatori genomici si è rivelato uno strumento estremamente utile, consentendo, a partire direttamente dalle informazioni molecolari, la stima di parametri fondamentali quali: la taglia effettiva di popolazione, l'individuazione della presenza di riduzioni drastiche della variabilità genetica (bottleneck), la determinazione del contributo dei fondatori (Founder effect) nella storia della popolazione, la stima del livello di Inbreeding degli individui, la presenza di stratificazione genetica all'interno della razza.

Prima dell'avvento delle moderne tecniche di indagine della genetica molecolare, molti dei parametri sopra elencati erano stimati a partire soltanto da analisi di pedigree.

Oggi l'apporto dell'informazione molecolare risulta tanto più significativo quanto meno ampie ed accurate sono le registrazioni genealogiche disponibili per le razze in esame.

In anni recenti è stato avviato un numero crescente di studi genomici alcuni condotti su singole razze e prevalentemente focalizzati sull'analisi della variabilità genetica, ed altri progetti di ricerca scaturiti da collaborazioni internazionali quali ad esempio il progetto LUPA (<https://eurolupa.org>) del 7° programma quadro EU volto oltre che a stabilire le relazioni genetiche esistenti tra il maggior numero di razze canine appartenenti ai 10 Gruppi FCI ed allevate a livello globale, ad indagare la variabilità genetica intra razza. Il Progetto LUPA ha avuto anche l'obiettivo di determinare le basi genetiche delle principali malattie mono e multifattoriali della specie canina.

L'utilizzo di marcatori di ultima generazione quali gli SNPs permette di indagare una parte sufficientemente ampia e rappresentativa dell'intero genoma e per questo il microchip Illumina ad alta densità (173.662 SNPs) frutto del progetto Internazionale di ricerca LUPA è stato utilizzato nello studio della variabilità genetica della razza Bracco Francese Tipo Pirenei oggetto del presente progetto di ricerca.

1.6 BIBLIOGRAFIA

1. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography
Greger Larson, Elinor K. Karlsson, Angela Perria, Matthew T. Webster, Simon Y. W. Ho, Joris Peters, Peter W. Stahl, Philip J. Piper, Frode Lingaas, Merete Fredholm, Kenine E. Comstock, Jaime F. Modiano, Claude Schelling, Alexander I. Agoulnik, Peter A. Leegwater, Keith Dobney, Jean-Denis Vignes, Carles Vilà, Leif Andersson, and Kerstin Lindblad-Toh, PNAS June 5, 2012 vol. 109 no. 23 pag. 8883
2. Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs
Adam H. Freedman, Ilan Gronau, Rena M. Schweizer, Diego Ortega-Del Vecchyo, Eunjung Han, Pedro M. Silva, Marco Galaverni, Zhenxin Fan, Peter Marx, Belen Lorente-Galdos, Holly Beale, Oscar Ramirez, Farhad Hormozdiani, Can Alkan, Carles Vila, Kevin Squire, Eli Geffen, Josip Kusak, Adam R. Boyko, Heidi G. Parker, Clarence Lee, Vasisht Tadigotla, Adam Siepel, Carlos D. Bustamante, Timothy T. Harkins, Stanley F. Nelson, Elaine A. Ostrander, Tomas Marques-Bonet, Robert K. Wayne, John Novembre. PLOS Genetics January 2014 Volume 10 Issue 1 | e1004016
3. Genomic Analyses Reveal the Influence of Geographic Origin, Migration, and Hybridization on Modern Dog Breed Development
Heidi G. Parker, Dayna L. Dreger, Maud Rimbault, Brian W. Davis, Alexandra B. Mullen, Gretchen Carpintero-Ramirez, Elaine A. Ostrander Cell Reports 19, 697–708
April 25, 2017 The Author(s). <http://dx.doi.org/10.1016/j>.
4. Gaston Phoebus "Livre de Chasse" 1387 – 1389 Bibliothèque Nationale de France
(<http://classes.bnf.fr/phebus/livre/index.htm>)
5. The domestic dog: man's best friend in the genomic era
Adam R Boyko Genome Biology 2011, 12:216 <http://genomebiology.com/2011/12/2/216>
6. Demographic history, selection and functional diversity of the canine genome
Elaine A. Ostrander, Robert K. Wayne, Adam. Freedman, Brian W. Davis.
Nature Reviews Genetics Vol 18 December 2017 pag 705 doi:10.1038/nrg.2017.67
7. Canine Morphology: Hunting for Genes and Tracking Mutations.
Shearin AL, Ostrander EA (2010) PLoS Biol 8(3): e1000310. doi:10.1371/journal.pbio.1000310

2. STIMA DELLA VARIABILITÀ GENETICA DELLA RAZZA BRACCO FRANCESE TIPO PIRENEI ATTRAVERSO L'ANALISI DEI DATI GENEALOGICI

Autore Professoressa Francesca Cecchi

Gli obiettivi principali di questa parte della ricerca sono stati quelli di stimare i valori di consanguineità (F) di ogni singolo soggetto e di parentela tra i soggetti per la valutazione del grado di variabilità genetica esistente, utilizzando il database completo fornito da ENCI, e conseguentemente consegnare un mezzo agli allevatori per la definizione di accoppiamenti programmati volti al controllo della consanguineità.

2.1 MATERIALI E METODI

ACQUISIZIONE E CONSISTENZA DEL DATABASE BRACCO FRANCESE VARIERA' DEI PIRENEI

La struttura di un qualsiasi albero genealogico, per quanto numeroso e complesso possa essere, è completamente definita se per ciascun soggetto vengono indicati stallone e fattrice. Pertanto, un modo esaustivo per raccogliere l'informazione disponibile per una data genealogia è di creare una lista che includa il codice univoco di ciascun animale e i codici dei due genitori. I soggetti per i quali i genitori non sono noti vengono generalmente inclusi nella lista con i campi dei genitori vuoti, e vengono chiamati "fondatori".

Come atto preliminare necessario per lo svolgimento della ricerca è stato quindi richiesto all'ENCI, per tramite del consiglio direttivo del Club Italiano Bracco Francese, di fornire le informazioni genealogiche disponibili sulla razza tramite una apposita interrogazione dell'archivio elettronico. Il database risultante, trasmesso al Centro Genetico il 26/11/2014 per l'analisi genealogica, riportava le seguenti informazioni disponibili per ciascun animale registrato:

LL_CANE	SESSO_SSF
NOME_CANE	DATA_NASCITA_SSF
SESSO	CHIP_MARC_SSF
DATA_NASCITA	LL_CANE_SFS
CHIP_MARC	NOME_CANE_SFS
NOME_ALLE	SESSO_SFS
IND_ALLE	DATA_NASCITA_SFS
NOME_PROPRIE	CHIP_MARC_SFS
IND_PROPRIE	LL_CANE_SFF
LL_CANE_S	NOME_CANE_SFF
NOME_CANE_S	SESSO_SFF
SESSO_S	DATA_NASCITA_SFF
DATA_NASCITA_S	CHIP_MARC_SFF
CHIP_MARC_S	LL_CANE_FSS
LL_CANE_F	NOME_CANE_FSS
NOME_CANE_F	SESSO_FSS
SESSO_F	DATA_NASCITA_FSS
DATA_NASCITA_F	CHIP_MARC_FSS
CHIP_MARC_F	LL_CANE_FSF
LL_CANE_SS	NOME_CANE_FSF
NOME_CANE_SS	SESSO_FSF
SESSO_SS	DATA_NASCITA_FSF
DATA_NASCITA_SS	CHIP_MARC_FSF
CHIP_MARC_SS	LL_CANE_FFS
LL_CANE_SF	NOME_CANE_FFS
NOME_CANE_SF	SESSO_FFS
SESSO_SF	DATA_NASCITA_FFS
DATA_NASCITA_SF	CHIP_MARC_FFS
CHIP_MARC_SF	LL_CANE_FFF
LL_CANE_FS	NOME_CANE_FFF
NOME_CANE_FS	SESSO_FFF
SESSO_FS	DATA_NASCITA_FFF
DATA_NASCITA_FS	CHIP_MARC_FFF
CHIP_MARC_FS	
LL_CANE_FF	
NOME_CANE_FF	
SESSO_FF	
DATA_NASCITA_FF	
CHIP_MARC_FF	
LL_CANE_SSS	
NOME_CANE_SSS	
SESSO_SSS	
DATA_NASCITA_SSS	
CHIP_MARC_SSS	
LL_CANE_SSF	
NOME_CANE_SSF	

Il database originale comprendeva i dati genealogici di 921 cani (479 maschi e 442 femmine) nati fra il 12 Aprile 2003 e il 7 Settembre 2014. La media di iscritti all'ENCI per anno è risultata pari a 76,75 cani (il valore più basso è stato registrato nel 2003 con 27 iscritti ed il più alto nel 2010 con 173 iscritti) con una deviazione standard di 40,24.

Nella Figura 1 viene riportato l'andamento delle iscrizioni annuali all'ENCI. Nel 2010 le registrazioni sono raddoppiate rispetto agli anni precedenti, questo perché nel periodo 2003-2009 alcuni cani sono stati importati dalla Francia ma furono registrati all'ENCI solo nel 2010.

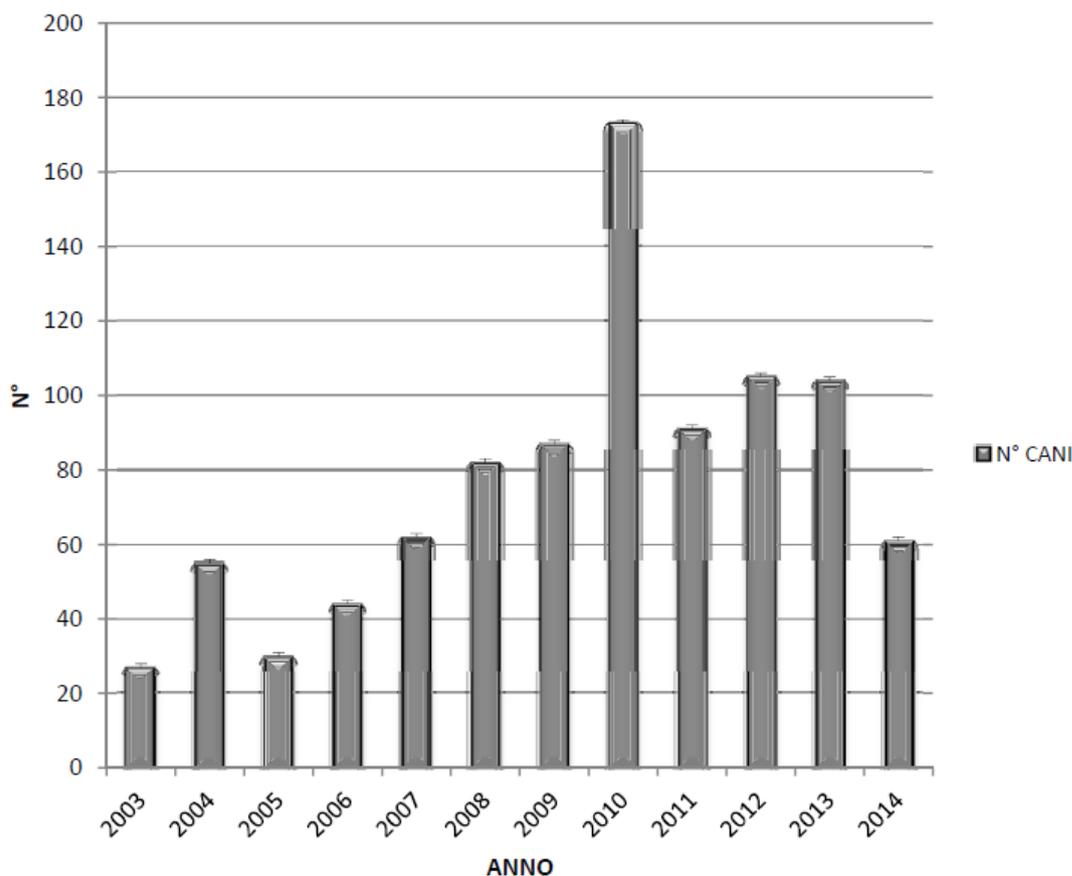


Figura 1 – Numero di iscritti all'ENCI per anno di nascita.

ELABORAZIONI STATISTICHE PER L'ANALISI DEI DATI GENEALOGICI

Sono stati elaborati i dati presenti nel libro genealogico della razza canina Bracco Francese. I dati, forniti dall'ENCI e riferiti al periodo 2003-2014, sono stati elaborati con i programmi ENDOG (Gutiérrez e Goyache, 2005, ver. 4.0), CFC (Sargolzaei et al., 2006), Pedigree Viewer (Kinghorn and Kinghorn, 2010), e JMP (2007) al fine di ottenere i parametri relativi alla struttura della popolazione, alla consanguineità e al numero di fondatori assoluti ed effettivi (f_t e f_e) e di ascendenti effettivi, le statistiche di natura demografica, e le rappresentazioni grafiche.

In particolare:

1) Il Programma Statistico CFC (Contribution, Inbreeding (F), Coancestry) è stato utilizzato per:

- a) Analizzare la struttura generale del pedigree (n° maschi, n° femmine, soggetti con figli, soggetti senza figli, n° animali della “Reference Population”, n° antenati, base della popolazione, coefficiente medio di consanguineità e parentela media);
- b) Individuare i soggetti consanguinei;
- c) Calcolare l’inincrocio medio, il numero dei soggetti consanguinei, l’inincrocio medio dei soggetti consanguinei con il valore minimo e massimo e per i soggetti suddivisi per anno di nascita.

2) Con il Programma Statistico “Endog” sono stati calcolati i seguenti parametri demografici e genetici:

- a) Il numero effettivo dei fondatori (f_e) ed il numero effettivo degli antenati (f_a).
- b) Completezza del pedigree. Al momento del calcolo dei coefficienti di consanguineità (F)

e di parentela (AR) ENDOG calcola per ogni individuo il numero delle generazioni tracciate, il numero massimo ed il numero minimo delle generazioni tracciate e le equivalenti generazioni complete per ogni animale. L’ultimo parametro è calcolato come la somma di tutti gli antenati conosciuti corrispondenti a $(1/2)^n$ dove n è il numero delle generazioni che separano il soggetto dal proprio antenato conosciuto.

- c) Calcolare l’inincrocio medio, il numero dei soggetti consanguinei, l’inincrocio medio dei soggetti consanguinei e la parentela per generazione tracciata.

3) Con il programma JMP (2007) sono state effettuate le statistiche di natura demografica come il numero delle iscrizioni annuali ed il numero di figli per riproduttore.

4) Il programma Pedigree Viewer (2010) è stato utilizzato per costruire le figure ed i grafici riportati nel testo.

2.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

2.2.1 Qualità Dell'informazione Genealogica E Nunerosita' Effettive

Il numero totale di animali presenti nel database elaborato, comprensivo dei 921 animali iscritti (Reference Population – RP) e tutta la loro genealogia include 1250 animali (Popolazione totale – Whole Population = RP più tutta la loro genealogia), ovvero 628 maschi e 622 femmine (tabella 1). I soggetti fondatori assoluti (ft: animali con uno o entrambi i genitori sconosciuti) sono 129 (10,32%); questa bassa percentuale indica la buona conoscenza della struttura genetica della razza. I soggetti consanguinei nella RP sono 772, pari all'83,82% della popolazione.

Tabella 1 - Principali parametri genealogici calcolati per il Bracco Francese.

	N°
Popolazione totale - Whole population (WP)	1250
- Maschi	628
- Femmine	622
Consanguinei nella popolazione totale	783
Reference population (RP)	921
- Maschi	479
- Femmine	442
Consanguinei nella RP	772
Popolazione di base - Base population (uno o due genitori sconosciuti = f _i)(BP)	129

In Figura 2, vengono riportati i dettagli della qualità del pedigree. La percentuale di completezza è di circa il 90% per la prima generazione (genitori), di circa l'82% la seconda generazione (nonni), dal 75% al 76% per la terza generazione, dal 63% al 67% per la quarta generazione e dal 33% al 52% per la quinta generazione. Il livello di completezza del pedigree è lievemente superiore per la via femminile.

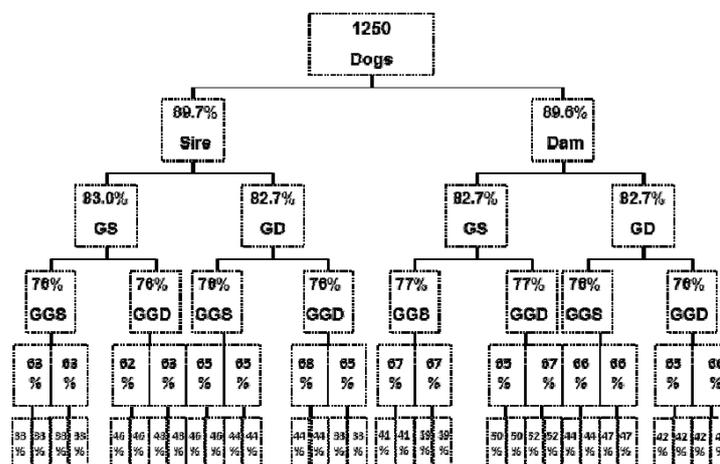


Figura 2- Profondità dell'informazione genealogica del Bracco Francese Tipo Pirenei.

La qualità dell'informazione genealogica si può anche stimare con il calcolo della media del numero di generazioni discrete equivalenti, che è definito come la somma, su tutte le generazioni degli antenati, della proporzione degli antenati noti a ciascuna generazione; un altro indice rilevante è il numero totale medio di ancestors (antenati) noti (tabella 2).

Anno	N° nati	Average n° of discrete generation equivalents	N° medio di ancestor
2003	27	3,27	79
2004	55	3,55	119
2005	30	3,75	110
2006	44	4,08	105
2007	62	4,25	138
2008	82	4,54	149
2009	87	4,95	204
2010	173	5,05	231
2011	91	5,07	229
2012	105	5,37	251
2013	104	5,24	271
2014	61	5,20	198
Media	76.6	4.53	173.7

Tabella 2 - Numero totale medio di antenati noti per anno di nascita.

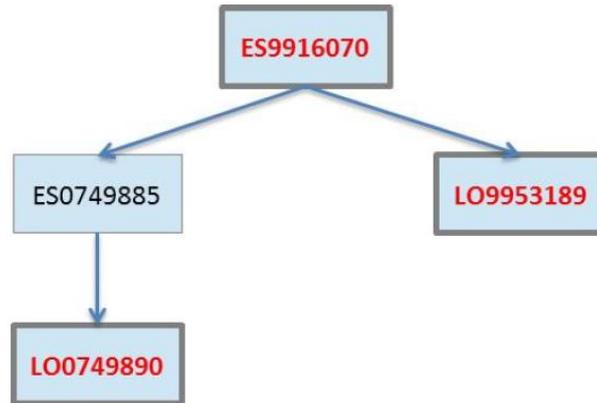
Il valore del numero effettivo dei fondatori (f: fondatori che contribuiscono alla variabilità genetica della razza, che tiene conto delle differenze del numero di figli), è risultato 32 e gli ascendenti effettivi (fa: ascendenti che contribuiscono alla variabilità della popolazione) sono risultati 24 nell'intera popolazione (WP) e 19 nella Reference Population (RP). Di questi ultimi, 7 spiegano il 50% della variabilità genetica della popolazione attuale (tabella 3), e 15 il 75%.

Tabella 3 - I principali 7 e 15 ancestors che contribuiscono rispettivamente al 50% e al 75% della variabilità genetica della RP.

ancestors	Sex	Year of birth	Genetic variance (%)	Progeny
N°1 LO01130412 Oka Du Mas Du Diable	F	1998	12.98	30
N°2 ES9916070 Lido De Saint Gens	M	1995	9.43	7
N°3 LO0543349 Puce De La Suveliere	F	1999	9.07	10
N°4 LO0749890 Valdes Restanques De La Colle Noire	M	2004	5.66	40
N°5 LO9953189 Orion	M	1998	5.32	2
N°6 LO08126314 Adriano De Felpaola	M	2005	5.07	6
N°7 LO0844885 GERRI	M	2007	4.20	66
N°8 LO0747443 Asie de Tebsene	F	2005	3.73	24
N°9 LO1195088 Boseq Du Clos De Gaou	M	2006	3.5	50
N°10 LO0538575 Utesse De La Tour Sarrazine	F	2003	3.47	22
N°11 ES001066490 Jenna Du Mas Poulian	F	-	3.22	1
N°12 ES063357 Unique Du Milobre De Bouisse	M	-	2.86	3
N°13 LO09889674 Maya	F	1996	2.54	5
N°14 ES0599913 Rip De Saint Gens	M	2000	2.51	14
N°15 ES0369111 Jex	M	-	1.78	10

Da rilevare invece che alcuni coefficienti di parentela sono piuttosto alti, come ad esempio il valore $a_{ij}=0,500$ per la coppia ES9916070-LO9953189, $a_{ij}=0,250$ per la coppia ES9916070- LO0749890 e $a_{ij}=0,125$ per la coppia LO0749890- LO9953189. Dalla figura 4 si evince che lo stallone ES9916070 è padre dello stallone LO9953189 e nonno dello stallone LO0749890 (di conseguenza LO9953189 è zio di LO0749890).

Figura 4 – Rappresentazione dei legami di parentela tra i 3 Ancestors.



Il confronto tra il numero effettivo dei fondatori (f_e) e l'effettivo numero degli ascendenti (f_a) ci permette di rilevare una diminuzione di variazione genetica in popolazioni che sono passate attraverso un "Bottle Neck" (il fenomeno identifica un particolare tipo di deriva genetica. Si verifica quando il numero di individui facenti parte di una popolazione viene ridotto drasticamente da forze atipiche nella selezione naturale. Solitamente comporta una riduzione critica della variabilità genetica, e tende ad eliminare del tutto alcuni alleli, ma soprattutto a far sì che altri vengano rappresentati in eccesso nel pool genico): l'alto valore del rapporto f_a/f_e ($24/32=0,66$) indicherebbe l'assenza di "colli di bottiglia" nella storia del Bracco Francese.

2.2.2 Intervallo Di Generazione

La tabella 5 mostra l'intervallo di generazione calcolato separatamente per gli stalloni e le fattrici e limitato agli animali nati tra il 2003 ed il 2014 (Reference Population).

Il valore medio è risultato pari a $5,47 \pm 0,234$ ed è simile a quello rilevato sul Braque Saint-German (5,6; Leroy et al., 2006), ma più alto rispetto a quello rilevato sul Bracco Italiano (Cecchi et al., 2013), e su molte altre razze canine come il Lagotto (Sabbioni et al., 2007), il Bolognese (Sabbioni et al., 2008), il Basset fauve de Bretagne, il Bouledogue Français, il Dogue de Bordeaux, il Barbet, Berger des Pyrénées, il Beauceron, l'Epagneul Breton e per il Montagne des Pyrénées (Leroy et al., 2006). L'intervallo di generazione è maggiore nei maschi rispetto alle femmine.

Tabella 5 - Intervallo di generazione calcolato separatamente per gli stalloni e le fattrici.

	Intervallo di generazione
	Media \pm s.e.
Padre-Figlio	6.19 \pm 0.543
Padre-Figlia	5.52 \pm 0.513
Madre-Figlio	5.85 \pm 0.631
Madre-Figlia	4.76 \pm 0.486
Totale	5.47 \pm 0.234

2.2.3 Fattrici e Stalloni

Considerando i 1250 cani facenti parte dell'intera popolazione, le fattrici sono in totale 259, con una media di 4,32 figli (minimo 1 – 128 fattrici –, massimo 36 per COE - LO0852675; tabella 6).

Tabella 6 – Distribuzione del numero di fattrici per numerosità della prole

N° FIGLI	N° FATTRICI
1	128
1-5	63
6-10	38
11-15	15
16-20	7
21-30	6
31-40	2
<i>Totale fattrici</i>	259

Gli stalloni sono in totale 197 (tabella 7), con una media di 5,68 figli per stallone.

Tabella 7 – Distribuzione del numero di stalloni per numerosità della prole

N° FIGLI	N° STALLONI
1	92
1-5	52
6-10	25
11-15	9
16-20	7
21-30	5
31-40	4
41-50	2
51-60	0
61-70	1
<i>Totale stalloni</i>	197

La maggior parte dei riproduttori hanno un numero di figli registrati all'ENCI inferiore a 11 (191 femmine, pari al 73,74% delle fattrici e 196 maschi, pari a circa l'86% degli stalloni), mentre 7 riproduttori maschi hanno un numero di figli superiore a 31 (3,5% dei maschi) e 8 femmine hanno un numero di figli compreso superiore a 21 (3,09% delle femmine).

In particolare i 7 riproduttori, per ambedue i sessi, che hanno prodotto più figli sono riportati nella tabella sottostante (tabella 8).

I due stalloni con il maggior numero di figli sono GERRI (LO0844885) con 66 figli e BOSQUU DU CLOS DE GAOU (LO1195088) con 50 figli.

Le fattrici con il maggior numero di figli sono COE (LO0852675) con 36 figli e VIVA DI S.DONATO (LO04118820) con 31 figli. OKA DU MAS DU DIABLE (LO01130412), con 30 figli, è al terzo posto. Da notare che quest'ultima fattrice riveste un ruolo molto importante nella costituzione della variabilità genetica della razza in quanto è anche il principale Ancestor della Reference Population.

Tabella 8 – Fattrici e Stalloni con il n° maggiore di figli registrati.

LOI	NOME	N° FIGLI	Anno Nascita
<i>Fattrici</i>			
LO0747443	ASIE DE TEBSEMA	24	19/08/2005
LO03145988	GENNA DEL GUARDENGO	24	21/06/2003
LO064181	ZITA DI S.DONATO	28	25/06/2005
LO0224307	LUNA DI S.DONATO	29	03/11/2001
LO01130412	OKA DU MAS DU DIABLE	30	06/06/1998
LO04118820	VIVA DI S.DONATO	31	23/03/2004
LO0852675	COE	36	12/06/2007
<i>Stalloni</i>			
LO0782569	CROLL	32	16/01/2007
LO0959683	BRICK DELLE SURIE	34	12/04/2008
LO1126545	FLASH DE CHANTOIZEAU	37	04/08/2010
LO0749890	VAL DES RESTANQUES DE LA COLLE NOIRE	40	13/02/2004
LO04118811	ROLAF DU VALLON DE BEAUDINI	46	15/03/2000
LO1195088	BOSQUU DU CLOS DE GAOU	50	03/07/2006
LO0844885	GERRI	66	27/07/2007

La tabella 9 riporta la distribuzione del numero di figli per anno dei riproduttori che hanno avuto un numero di figli registrati all'ENCI superiore a 30 (7 stalloni). Lo stallone GERRI ha prodotto 66 figli da 9 accoppiamenti con fattrici diverse (indicate nella tabella sottostante con lettere diverse sulla stessa riga). Da notare che alcuni maschi sono stati accoppiati più di una volta con la stessa femmina: la femmina D è stata accoppiata 2 volte con lo stallone LO0749890, come pure la femmina Q con lo stallone LO0411881 e la femmina M con lo stallone LO1126545.

Inoltre possiamo evidenziare che alcuni stalloni sono stati impiegati per la riproduzione ad un anno di vita: è il caso dello stallone LO0782569, anno di nascita 2007 e primo accoppiamento 2008 e dello stallone LO1126545, nato nel 2010 con primo accoppiamento nel 2011.

L'analisi dei dati evidenzia il fatto che la carriera riproduttiva di questi stalloni va dai 3 ai 4 anni.

Due sono gli stalloni attivi nel 2014 (LO0959683: 6 anni di età e LO1195088: 8 anni)

Tabella 9 - Numero di figli per anno degli stalloni che hanno avuto >30 figli

	N° ACC	Numero figli per anno (Numero Accoppiamenti)											N° Figli	
		2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014		
LO0782569	16/01/2007	5				6 (A)	7 (B)	7(C)	12 (D+E)					32
LO0959683	12/04/2008	5							8 (F)		20 (G+H+I)	6 (L)		34
LO1126545	04/08/2010	5							8 (M)	7 (M)	22 (N+O+P)			37
LO0749890	13/02/2004	7			17 (A+B+C)	13 (D+E)	4 (D)	6 (F)						40
LO0411881	15/03/2000	7	26 (Q+R+S)	2 (T)	14 (Q+U)	5(V)								46
LO1195088	03/07/2006	13							15 (A+B+C+D)	9 (E+F)	18 (H+I+L+M+N)	8 (O+P)		50
LO0844885	27/07/2007	9						49 (A+B+C+D+E+F)	7 (G)	10 (H+I)				66

ACC=accoppiamenti

Stessa lettera sulla stessa riga indica la stessa Fattrice

Nelle figure 5 e 6 vengono riportati graficamente gli ascendenti della fattrice COE e dello stallone GERRI, ovvero gli animali che hanno avuto più figli.

Figura 5 - Rappresentazione grafica di tutti gli ascendenti dello stallone Gerri.

GERRI
LO0844885

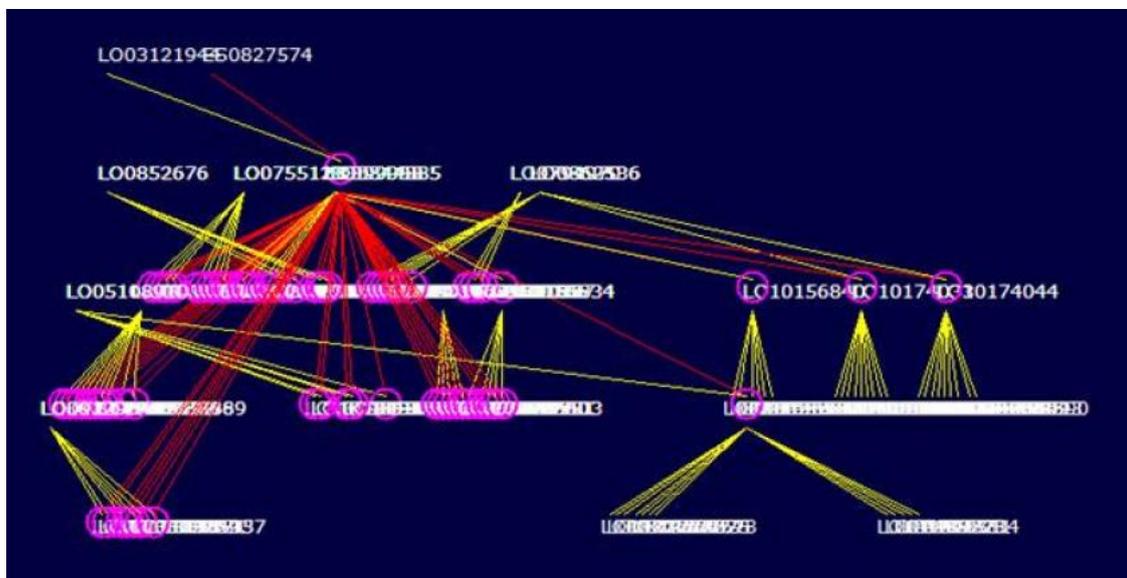
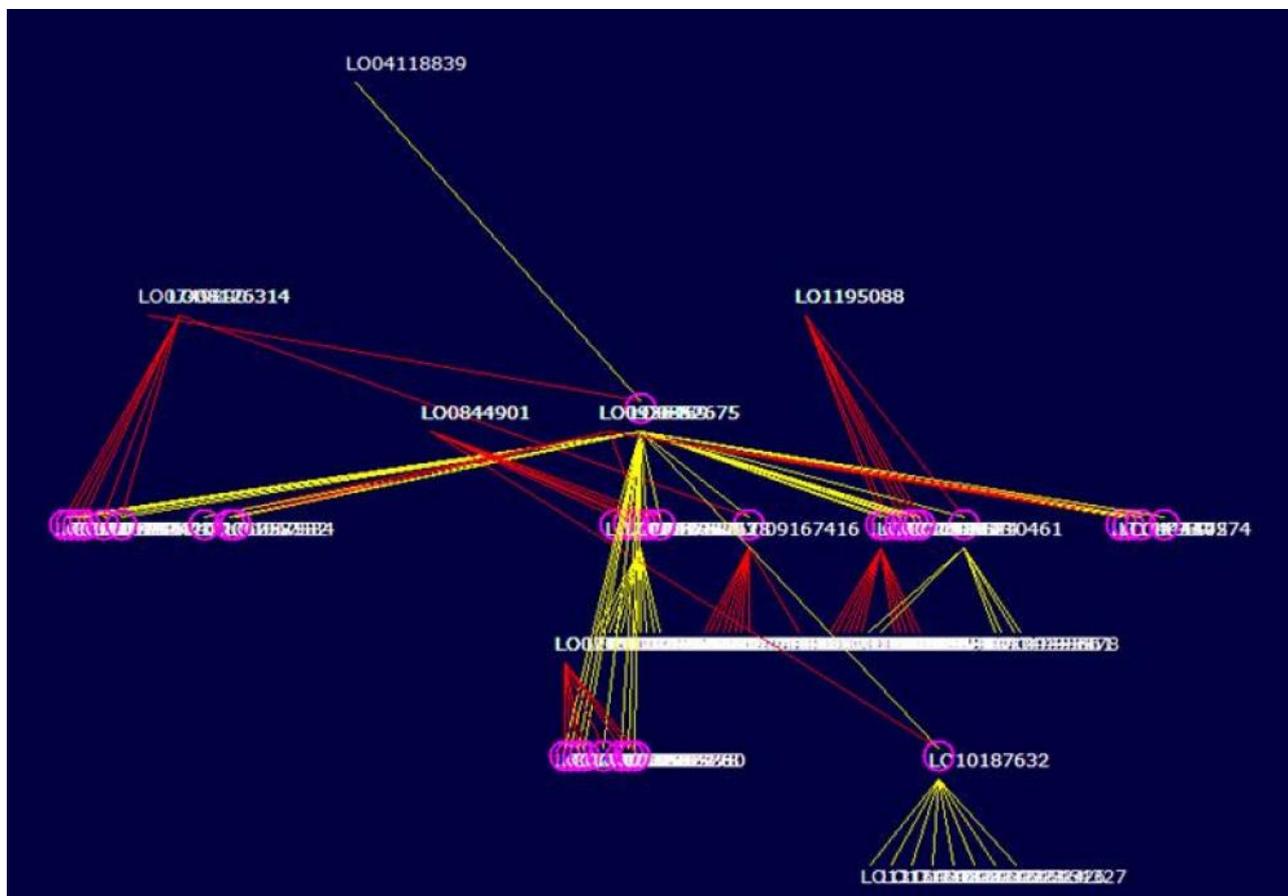


Figura 6 - Rappresentazione grafica di tutti gli ascendenti della Fattrice Coe.

LO0852675
COE

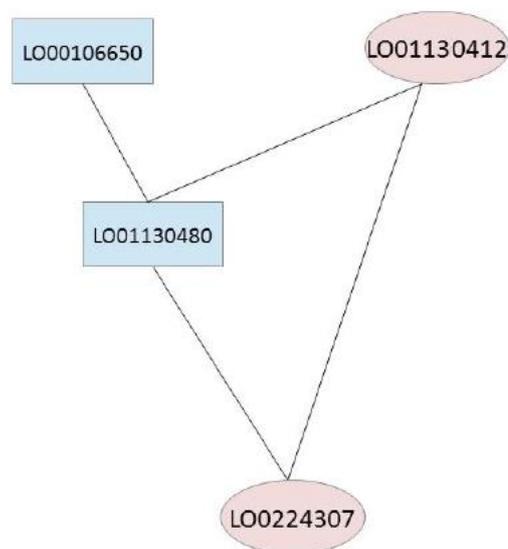


I coefficienti di parentela tra i principali riproduttori della razza sono riportati in tabella 10 e 11. Quattro stalloni e tre fattrici sono risultati consanguinei, e precisamente BOSQUU DU CLOS DE GAOU (LO1195088; $F=0,250$: il padre è stato accoppiato con una sua figlia), CROLL (LO0782569; $F= 0,016$), BRICK DELLE SURIE (LO0959683; $F= 0,036$) e FLASH DE CHANTOIZEAU (LO1126545; $F=0,008$) per gli stalloni e LUNA DI S. DONATO (LO0224307; $F= 0,273$: la madre è stata accoppiata con un suo figlio), ASIE DE TEBSEMA (LO0747443; $F= 0,016$) e COE (LO0852675; $F=0,008$) per le fattrici. I valori dei coefficienti di consanguineità pari a 0,250 e 0,273 sono molto alti.

Dalla tabella 10 si evince che tutti i riproduttori maschi siano parenti tra loro con un coefficiente di parentela compreso tra 0,008 (coppia LO04118811-LO0749890) e 0,148 (coppia LO04118811-LO0959683). Anche le fattrici sono tutte parenti tra loro, con coefficienti più alti rispetto ai precedenti, con un range che va da un minimo di 0,012 (coppia LO0852675-LO064181) ad un massimo di 0,773 (coppia LO01130412- LO0224307). Altri valori alti tra le femmine si osservano per la coppia LO01130412-LO064181 ($a_{ij}=0,500$) e per la coppia LO4118820-LO0224307($a_{ij}=0,637$). I coefficienti di 0,773 e di 0,637 sono valori più alti del coefficiente di parentela esistente tra padre e figlio ($a_{ij}=0,500$) o tra fratelli pieni ($a_{ij}=0,500$). Nella tabella 12 vengono riportati i coefficienti di parentela additiva comuni con relativi coefficienti.

Il valore di 0,773 scaturisce dal fatto che LO0224307 è la figlia di LO01130412 che è stata accoppiata con un suo figlio (LO01130480) (figura 7). Inoltre, vi è una quota di parentela imputabile a parenti più lontani che si è accumulata a quella più stretta.

Figura 7 – Schema della relazione di parentela tra le due fattrici LO0224307 e LO01130412.



Per quanto riguarda le parentele tra stalloni e fattrici (Tabella 11), tutti gli animali sono parenti tra loro fatta eccezione per lo stallone LO04118811 con le fattrici LO0747443, LO064181, LO0224307 e LO01130412 e per lo stallone LO1195088 con le fattrici LO0747443 e LO03145988. I coefficienti di parentela più stretti si osservano tra lo stallone LO749890 e la fattrice LO0852675 ($a_{ij}=0,508$; padre e figlia) e tra lo stallone LO04118811 e la fattrice LO04118820 ($a_{ij}=0,500$; padre e figlia).

Parentele tra i principali stalloni

	LO0782569	LO0959683	LO1126545	LO0749890	LO04118811	LO1195088	LO0844885
LO0782569	1,016						
LO0959683	0,080	1,036					
LO1126545	0,057	0,106	1,008				
LO0749890	0,055	0,124	0,070	1			
LO04118811	0,047	0,148	0,031	0,008	1		
LO1195088	0,033	0,034	0,016	0,016	0,008	1,250	
LO0844885	0,058	0,058	0,055	0,051	0,008	0,027	1

Parentele tra le principali fattrici

	LO0747443	LO03145988	LO064181	LO0224307	LO01130412	LO04118820	LO0852675
LO0747443	1,060						
LO03145988	0,047	1					
LO064181	0,016	0,016	1				
LO0224307	0,027	0,027	0,387	1,273			
LO01130412	0,031	0,031	0,500	0,773	1		
LO04118820	0,014	0,076	0,193	0,637	0,387	1	
LO0852675	0,035	0,023	0,012	0,033	0,023	0,05	1,008

Tabella 10 – Coefficienti di parentela tra i principali Stalloni e Fattrici della razza.

Fattrici							
	LO0747443	LO03145988	LO064181	LO0224307	LO01130412	LO04118820	LO0852675
<i>Stalloni</i>							
LO0782569	0,004	0,019	0,027	0,111	0,055	0,079	0,043
LO0959683	0,015	0,038	0,083	0,237	0,167	0,193	0,140
LO1126545	0,070	0,016	0,031	0,080	0,0625	0,056	0,160
LO0749890	0,070	0,047	0,023	0,066	0,047	0,037	0,508
LO04118811	0	0,125	0	0	0	0,500	0,066
LO1195088	0	0	0,047	0,076	0,094	0,042	0,016
LO0844885	0,008	0,008	0,023	0,0625	0,047	0,035	0,033

Tabella 11 – Coefficienti di parentela additiva tra i principali riproduttori della razza.

Parenti	Parentela
Soggetto non consanguineo con se stesso	1,000
Genitore-Figlio	0,500
Fratelli Pieni	0,500
Nonno-Nipote	0,250
Bisnonno-Bisnipote	0,125
Zio-Nipote pieno	0,250
Cugini pieni	0,125
Mezzi fratelli	0,250

Tabella 12 – Esempi di parentele (parentela additiva) comuni con relativi coefficienti.

2.2.4 Consanguineità e Parentela: Dati generali

Considerando tutto il database, il coefficiente di in incrocio (consanguineità) medio è risultato pari al 3,29%. Questo dato include anche i fondatori, il cui coefficiente di inincrocio è per definizione = 0.

Considerando quindi il database completo, sono risultati consanguinei 783 animali (il 63%) (392 maschi e 391 femmine).

Su 783 cani consanguinei, ben 511 hanno presentato un coefficiente di inincrocio accettabile, ovvero inferiore al 5% (65% dei consanguinei e 41% dell'intera popolazione), e soltanto 13 cani (1,04% del totale) hanno presentato un coefficiente di inincrocio superiore al 20% (Tabella 13).

Range	n°
0,00 < F < 0,05	511
0,05 < F < 0,10	141
0,10 < F < 0,15	67
0,15 < F < 0,20	51
0,20 < F < 0,25	3
0,25 < F < 0,30	10
0,30 < F < 0,35	0
0,35 < F < 0,40	0

Tabella 13 – Distribuzione dei coefficienti di consanguineità

Il coefficiente medio di inbreeding (F) e di parentela (AR) rilevato per tutta la popolazione (WP)

risultano essere rispettivamente del 3,29% e del 7,10% mentre i valori medi di F e AR nella Reference Population (RP) sono risultati rispettivamente pari al 4,35% e al 10,67%. 4,35% è un valore medio in confronto a quanto riportato sulle altre razze.

Molti studi, effettuati su razze o popolazioni diverse di cani, hanno calcolato la consanguineità e i loro risultati mostrano che il coefficiente medio di consanguineità può assumere valori diversi tra razze diverse e, all'interno della stessa razza, in popolazioni allevate in paesi diversi (Tabella 14). In particolare, il coefficiente medio di consanguineità osservato nella RP per il Bracco Francese è risultato simile a quello rilevato da Voges e Distl (2009) sulla razza Bavarian Mountain Hounds (4,5%).

Il nostro valore è risultato più piccolo di quello che è stato riportato da Nielen et al. (2001) sul cane di razza Kooiker (7,00%), da Cole et al. (2004) su una popolazione di cani guida Labrador Retriever (F = 22%) e su una popolazione di cani pastore tedesco utilizzati per la guida di persone non vedenti (26,2%) e da Glaewska (2008) per i cani di una piccola popolazione polacca nati nel periodo 1970 -2004 (F = 0,265-0,370). Valori più alti, inoltre sono stati osservati da Voges e Distl (2009) per il tirolese Hounds (9,5%), da Cecchi et al. (2013) per il Bracco Italiano (6,29%) e da Sabbioni et al. (2007) per il cane di razza bolognese (10,81%).

Per contro, il nostro valore è risultato superiore rispetto a quelli riportati per molte altre razze di cani.

Per esempio il coefficiente di consanguineità è stato dell'1,8% nella razza Golden Retriever (Nielen et al., 2001); in una popolazione italiana di Pit Bull Terrier, animali tutti imparentati tra loro, il coefficiente medio di consanguineità è risultato pari 3,73% (Ciampolini et al. 2013), mentre il coefficiente medio di consanguineità osservato nel Lagotto Romagnolo è stato 2,27% (Sabbioni et al., 2008). Valori di consanguineità minori dell'1% sono stati rilevati da Cecchi et al. (2009) in una colonia italiana di cani guida per ciechi (0,45% in cani da pastore tedesco, 0,38% nei cani Labrador e il 0,49% per i cani Golden Retriever) e da Zawieja et al. (2013) in cani di razza Hovawart (0,26-0,31%).

I coefficienti medi di inbreeding stimati da Martinez et al. (2011) per il cane di razza Cimarrón Uruguayo, ha raggiunto circa il 4-6%, mentre in uno studio su alcune razze allevate in Finlandia (Mäki et al., 2001), il coefficiente medio di consanguineità dei cani nati nel 1998 variava dal 2,3% nel pastore tedesco al 5,1% nella razza segugio finlandese. In uno studio sulle razze allevate in Francia (Leroy et al., 2006) il coefficiente medio di consanguineità variava dal 3,3% nel Bouledogue Français al 12,4% nel Barbet. Nella tabella seguente (tabella 14) vengono riportati i coefficienti di consanguineità di razza e/o popolazioni di cani con la fonte di riferimento.

Breed	F (%)	Source
Bavarian Mountain Hounds	4,50	Voges and Distl, 2009
Beagle	0,68	Gierdziewicz <i>et al.</i> , 2011
Bolognese	2,27-2,64	Sabbioni <i>et al.</i> , 2008
Bracco Italiano	4,10-6,29	Cecchi <i>et al.</i> , 2013
Cimarron Uruguayo	4,00-6,00	Martinez <i>et al.</i> , 2011
Finnish Hound	5,10	Maki <i>et al.</i> , 2001
German Shepherd dog	0,23-3,11	Drozd and Karpiński, 1977
German Shepherd dog	2,30	Maki <i>et al.</i> , 2001
German Shepherd dog	26,20	Cole <i>et al.</i> , 2004
German Shepherd dog	5,10-10,4	Coutts and Harley, 2009
German Shepherd dog	12,90	Kania-Gierdziewicz <i>et al.</i> , 2011
German Shepherd dog	0,45	Cecchi <i>et al.</i> , 2009
German Boxer	0,68-4,26	Drozd and Karpiński, 1977
Great Dane	0,61-8,79	Drozd and Karpiński, 1977
Golden Retriever	1,80	Nielen, 2001
Golden Retriever	0,49	Cecchi <i>et al.</i> , 2009
Hovawart	0,26-0,31	Zawieja <i>et al.</i> , 2013
Icelandic Sheep dog	21,00	Ólafsdóttie and Kristjansson, 2008
Karst Shepherd	27,00	Ceh and Dovc, 2014
Kooiker	7,00	Nielen, 2001
Labrador Retriever	22,00	Cole <i>et al.</i> , 2004
Labrador Retriever	0,38	Cecchi <i>et al.</i> , 2009
Lagotto Romagnolo	10,91	Sabbioni <i>et al.</i> , 2007
Lancashire Heeler	4,00-10,00	Mäki, 2010
Nova Scotia Duck Tolling Retriever	25,00-32,00	Mäki, 2010
Pitt Bull Terrier	3,73	Ciampolini <i>et al.</i> , 2013
Polish Hound	7,10-37,00	Głażewska, 2008
61 of dog breeds in France	0,20-8,80	Leroy <i>et al.</i> , 2009
32 of dog breeds in Australia	0-10,10	Shariflou <i>et al.</i> , 2011
Rottweiler	1,12-5,85	Drozd and Karpiński, 1977
Tatra Shepherd dog	1,06-6,44	Kalinowska <i>et al.</i> , 2010
Tyrolean Hounds	9,50	Voges and Distl, 2009
Tornjak	1,90	Ceh and Dovc, 2014

Tabella 14 - Inbreeding (F) in diverse razze canine.

2.2.5 Consanguineità Per Generazione Tracciata

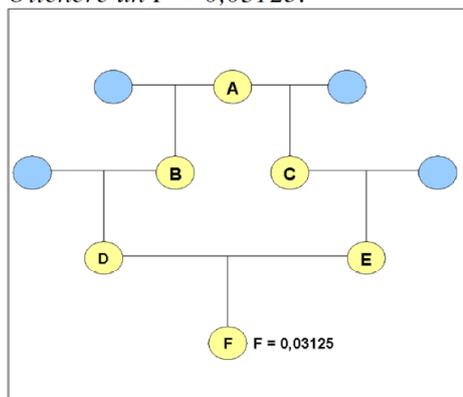
Il numero massimo di generazione tracciate è risultato 10 (Tabella 15).

Traced generation	N° dogs	Average F (%)	% Inbred	Average F for inbred (%)	Mean AR (%)
0	129	0,00	0	0	0
1	75	0,00	0	0	1,77
2	52	0,48	3,85	12,50	2,94
3	40	1,02	10,00	10,16	4,73
4	80	1,78	28,75	6,18	6,73
5	65	2,03	60,00	3,39	7,57
6	122	2,95	77,05	3,82	6,87
7	201	3,61	87,56	4,12	8,45
8	228	5,57	89,47	6,22	9,84
9	185	5,02	92,97	5,40	9,72
10	73	6,62	93,15	7,11	9,53

Tabella 15 – Inincrocio per generazione tracciata.

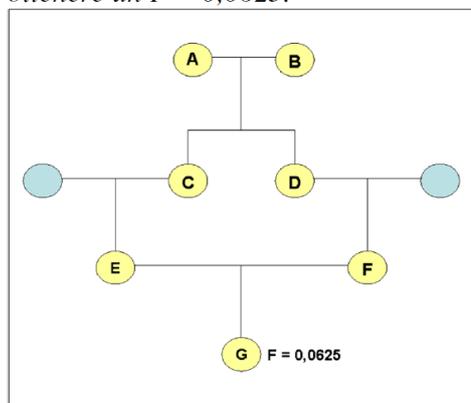
A partire dai soggetti con 7 generazioni tracciate, il coefficiente di inincrocio è più alto del valore del 3,125%, che risulterebbe dall'accoppiamento di due animali che condividono un singolo nonno (soggetti D e E con in comune il nonno A; figura 8).

Figura 8 – Schema di accoppiamento per Ottenere un $F = 0,03125$.



Il coefficiente di inincrocio assume il valore più alto per i 73 soggetti con 10 generazioni tracciate ($F=0,0662$); tale valore è più alto rispetto a quello ottenuto accoppiando due animali che condividono i due nonni (in termini umani due cugini: E con F con in comune i due nonni A e B; figura 9).

Figura 9 - Schema di accoppiamento per ottenere un $F = 0,0625$.



L'incremento di consanguineità per generazione è stato stimato essere pari 0,67% per l'intera popolazione ($N_e = 74,63$) e 1,18% per la Reference Population ($N_e = 42,42$). Tale incremento è simile a quanto rilevato sul Bracco Italiano (1,29% and $N_e=38.86$), è maggiore rispetto a quanto rilevato su altre razze italiane (Sabbioni et al., 2006, Lubas et al., 2008 etc) ed estere (Leroy et al. 2006), ma più basso rispetto a quanto osservato nel Bolognese (Sabbioni et al., 2008).

2.2.6 Trend Della Consanguineità Nel Corso Degli Anni

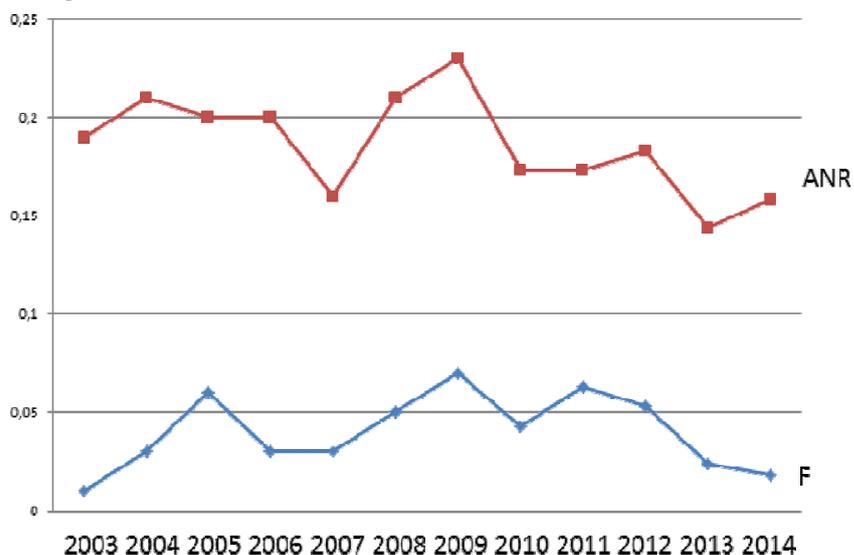
Nella tabella 16 e nella figura 10 è riportata l'evoluzione del coefficiente di inincrocio dei cani secondo il loro anno di nascita.

Come possiamo vedere, l'andamento dei dati non è lineare ma altalenante. Il valore massimo di consanguineità è stato osservato nel 2009 ($F=0,070$) ed i cani nati negli ultimi due anni hanno bassi valori di consanguineità ($F=0,024$ in 2013 and $0,018$ in 2014). Il tasso di consanguineità si è ridotto proprio in questo periodo in quanto, una volta che i cani importati dalla Francia sono stati registrati nel ROI italiano, i nuovi riproduttori sono stati utilizzati nella selezione del nostro Paese. Inoltre, il serio lavoro operato dal C.I.B.F. ha visto una migliore collaborazione da parte dei Soci allevatori, i quali seguendo i consigli del Club hanno prodotto cucciolate cercando di mantenere basso il tasso di consanguineità.

Tabella 16 – Numero consanguinei e dati sull'inincrocio per i nati dal 2003 al 2014.

	N° soggetti	N° Consanguinei	Consanguinei % anno	F medio	F medio consanguinei	F massimo	F minimo
Totale	1250	783	0,626	0,033	0,052	0,284	0,002
Base della Popolazione	329	11	0,033	0,003	0,090	0,273	0,031
Anno							
2003	27	13	0,481	0,010	0,020	0,062	0,0156
2004	55	30	0,545	0,030	0,057	0,125	0,0312
2005	30	25	0,833	0,060	0,076	0,164	0,008
2006	44	26	0,591	0,030	0,058	0,250	0,008
2007	62	46	0,742	0,030	0,040	0,097	0,008
2008	82	78	0,951	0,050	0,055	0,164	0,008
2009	87	81	0,931	0,070	0,076	0,284	0,06
2010	173	173	1,000	0,043	0,043	0,186	0,002
2011	91	78	0,857	0,063	0,073	0,174	0,008
2012	105	96	0,914	0,053	0,058	0,257	0,008
2013	104	95	0,913	0,024	0,026	0,100	0,004
2014	61	31	0,508	0,018	0,035	0,119	0,014

Figura 10 – Trend della consanguineità (F) e del coefficiente di parentela (ANR) per anno di nascita.



2.3 CONCLUSIONI

I risultati di questa ricerca indicano che l'inbreeding medio, osservato per tutto il database, è in linea con quanto osservato in altre razze. Un aspetto molto positivo è che il trend dell'inbreeding negli anni non è in crescita, bensì si sono registrati negli ultimi anni valori bassi del coefficiente. Questo è stato possibile non soltanto grazie alla C.I.B.F., che è rimasto sempre in contatto con il Club Francese, ma anche grazie ai membri allevatori che hanno seguito le direttive e le raccomandazioni del proprio Club. Da sottolineare quindi l'elevato livello culturale e la sensibilità degli allevatori nel comprendere l'importanza di contenere la consanguineità per la salvaguardia della razza.

La ricerca continuerà con l'analisi della variabilità genetica a livello molecolare, per validare la buona salute genetica della razza evidenziato dall'analisi genealogica. A partire dai risultati di questa ricerca, svolta in collaborazione con il C.I.B.F., sono stati presi accordi per il futuro al fine di monitorare costantemente la variabilità genetica della razza in modo da poter continuare la buona gestione del patrimonio genetico che la C.I.B.F. ha contribuito a creare e mantenere dal 2000 ad oggi.

2.4 BIBLIOGRAFIA

- Cecchi F, Bramante A, Mazzanti E, Ciampolini R. 2009. A colony of dog guides: analysis of the genetic variability assessed by pedigree data. *Italian Journal of Animal Science* **8**, 48-50.
- Cecchi F, Paci G, Spaterna A, Ciampolini R. 2013. Genetic variability in Bracco Italiano dog breed assessed by pedigree data. *Italian Journal of Animal Science* **12**, 348-352.
- Ceh E, Dovc P. 2014. Population structure and genetic differentiation of livestock guard dog breeds from the Western Balkans. *Animal Breeding and Genetics* **131**, 313-325.
- Ciampolini R, Cecchi F, Paci G, Policardo C, Spaterna A. 2013. Investigation on the Genetic Variability of the American Pit Bull Terrier dogs belonging to an Italian breeder using Microsatellite Markers and genealogical data. *Cytology and Genetics* **47**, 217-221.
- Cole JB, Franke DE, Leighton EA. 2004. Population Structure of a Colony of Dog Guides. *Journal of Animal Science* **82**, 2906-2912.
- Coutts NJ, Harley EH, 2009. Comparative population genetics of the German shepherd dog in South Africa. *South African Journal of Science* **105**, 132-135.
- Drozd L, Karpinski M. 1997. Inbred wybranych ras psów wpisanych do Polskiej Ksiegi Rodowodowej. *Universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin-Polonia, Sectio EE, Vol. XV*, 42.
- Gierdziewicz M, Kania-Gierdziewicz J, Kalinowska B. 2011. Analysis of genetic structure of the Beagle population in the area of Cracow Branch of the Polish Kennel Club. *Animal Science Papers and Reports* **29**, 359-367.
- Glazewska I. 2008. Genetic diversity in Polish hounds estimated by pedigree analysis. *Livestock Science* **113**, 296-301.
- Gutiérrez JP, Goyache F. 2005. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **122**, 172-176.
- JMP (2007). JMP 7.0. SAS Institute Inc.
- Kalinowska B, Gierdziewicz M, Gierdziewicz JK. 2010. Genetic structure analysis of Tatra Shepherd dog population in area of Krakow branch of Polish Kennel Club. I. Inbreeding and relationship coefficients. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* **13**, 3, 2. <http://www.ejpau.media.pl/volume13/issue3/art-02.html>
- Kania-Gierdziewicz J, Kalinowska B, Gierdziewicz M, 2011. Inbreeding and relationship in the German Shepherd dog population in area of Cracow Branch of Polish Kennel Club. *Roczniki*

Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego 721-29.

Kinghorn, B., Kinghorn, S. 2010. Pedigree Viewer version 6.5b (www.personel.une.edu.au/bkinghor/).

Leroy G, Rognon X, Varlet A, Joffrin C, Verrier E. 2006. Genetic variability in French dog breed assessed by pedigree data. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **123**, 1-9.

Leroy G, Terrier E, Mriaux JC, Rognon X. 2009. Genetic diversity of dog breeds: within-breed diversity comparing genealogical and molecular data. *Animal Genetics* **40**, 323-332.

Lubas G, Cecchi F, Carlini G, Ciampolini R, Presciuttini S. 2008. Analisi della struttura genetica dei principali allevamenti Italiani di cani di razza Basset Hound. Proc. LXII Congr. S.I.S.Vet, San Benedetto del Tronto, Italy, pp.461-462.

Martinez M, Armstrong E, Gagliardi R, Llambi YS. 2011. Estudio ógico del perro Cimarrón Uruguayo (Pedigree analysis of the canine breed Cimarrón Uruguayo). *Archivos de zootechnia* **60**, 1327-1330.

Mäki K, Groen Liinamo AF, Ojala M, 2001. Population structure, inbreeding trend and their association with hip and elbow dysplasia in dogs. *Animal Science* **73**, 217–228.

Mäki K. 2010. Population structure and genetic diversity of worldwide Nova Scotia Duck Tollier Retriever and Lancashire Heeler dog populations. *Animal breeding and Genetics* **127**, 318-326.

Nielen AL, van der Beek S, Ubbink GJ, Knol, BW. 2001. Population parameters to compare dog breeds: differences between five Dutch purebred populations. *Veterinary Quarterly* **23** 43–49.

Ólafsdóttir GA, Kristjánsson T. 2008. Correlated pedigree and molecular estimates of inbreeding and their ability to detect inbreeding depression in the Icelandic sheepdog, a recently bottlenecked population of domestic dogs. *Conservation Genetics* **9**, 1639-1641.

Sabbioni A, Beretti V, Vaccari Simonini F. 2007. Parametri demografici, variabilità genetica e struttura della popolazione nella razza canina “Lagotto Romagnolo”. Proc. LXI Congr. S.I.S.Vet, Salsomaggiore Terme, Italy, pp 409-410.

Sabbioni A, Beretti V, Vaccari Simonini F. 2008. Parametri demografici, variabilità genetica e struttura della popolazione nella razza canina Bolognese. Proc. LXII Congr. S.I.S.Vet, San Benedetto del Tronto, Italy, pp 467-468.

Sargolzaei M, Iwaisaki H, Colleau JJ. 2006. CFC (Contribution, Inbreeding (F), Coancestry, Release 1.0. A software package for pedigree analysis and monitoring genetic diversity. Proc. 8th World Cong. on Genetics Applied on Livestock Production, Belo Horizonte, Brazil, CDROM comm. N 27-28.

Shariflou MR, James JW, Nicholas FW, Wade CM, 2011. A genealogical survey of Australian registered dog breeds. *The veterinary Journal* **189**, 203-210.

Voges S, Distl O. 2009. Inbreeding trends and pedigree analysis of Bavarian mountain hounds, Hanoverian hounds and Tyrolean hounds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **126**, 357-365

Zawieja JR, Zdrojewska AN, Mucha M, Sobek Z, Stanislawski D, Gierdziewicz M, Gierdziewicz JK. 2013. Evaluation of inbreeding and relationship coefficients in Hovawart dogs and analysis of trends in coat colour changes. *Annals of Animal Science* **13**, 253-262.

3 STUDIO DELLA VARIABILITA' GENOMICA MEDIANTE IDENTIFICAZIONE DI ROH NELLA RAZZA BRACCO FRANCESE TIPO PIRENEI

Autori: Dr. Salvatore Mastrangelo; Dr. Filippo Biscarini; Prof. Roberta Ciampolini

La variabilità e la struttura genetica presenti all'interno delle razze canine dipendono in gran parte dalle decisioni e dalle pratiche selettive adottate dagli allevatori. Al fine di fissare determinate e precise caratteristiche fenotipiche imposte dagli standard di razza e desiderate dagli allevatori, di cui solo pochi stalloni e fattrici vincitori di gare di bellezza e di performances sono i migliori rappresentanti, si utilizza la pratica degli accoppiamenti in Consanguineità o Inbreeding.

Tuttavia, questa pratica di accoppiamento può portare a valori elevati di consanguineità ed ai rischi che ne derivano quali: i) maggiore frequenza di malattie a base genetica determinate da varianti alleliche recessive che si trovano più frequentemente in omozigosi, ii) depressione da Inbreeding etc., che rappresentano una seria minaccia soprattutto per le popolazioni di piccole dimensioni e per le popolazioni che presentano un ridotto numero di fondatori [1, 2]. Inoltre, un'intensa selezione direzionale per tipologie di animali altamente specializzate può portare ad una base genetica ridotta all'interno delle popolazioni, il che porta ad una drastica perdita di variabilità genetica, specialmente nei cani dove l'accoppiamento tra parenti stretti viene frequentemente utilizzato [3, 4].

I potenziali effetti della consanguineità e della conseguente ridotta variabilità genetica sulla salute, la funzionalità e il benessere degli animali all'interno delle razze canine, hanno portato alla necessità di un miglioramento delle pratiche di gestione genetica. La gestione della variabilità genetica è diventata un obiettivo principale per allevatori, i Club di Razza ed i Kennel Club [5]. Recenti studi hanno dimostrato che è in atto una perdita della quantità totale di variabilità genetica all'interno delle popolazioni canine moderne [6-8]. In particolare, diverse razze sono state intensamente selezionate ricorrendo, per alcune linee, a pratiche di accoppiamento in cui gli stalloni più popolari venivano ripetutamente usati per l'accoppiamento, con conseguente riduzione della variabilità genetica. Nelle razze canine, ai fini della valutazione della variabilità genetica sono stati tradizionalmente utilizzati i dati genealogici [3-5, 9, 10]. Tuttavia, l'uso di dati genealogici presenta delle limitazioni a causa dei dati relativi ai pedigree disponibili che possono risultare incompleti o inesatti. La genomica offre nuove applicazioni che presentano un grande potenziale nell'incrementare la nostra comprensione del genoma degli animali domestici e nel migliorare l'efficienza dei programmi di conservazione e selezione [11-13]. I marcatori molecolari STR (short tandem repeats) sono stati inizialmente utilizzati per stimare la variabilità genetica in assenza di registri genealogici [9, 10, 14, 15]. Più recentemente, la disponibilità di matrici di polimorfismi a singolo nucleotide ad alta densità (SNPs), ha aumentato l'accuratezza, il rendimento e l'economicità delle analisi genomiche adottate nella conservazione della variabilità genetica [16, 17]. Infatti, l'elevato numero di SNP presenti su tutto il genoma rende questi marcatori particolarmente adatti all'individuazione di regioni genomiche in cui si è verificata una riduzione dell'eterozigosi e offre nuove opportunità per migliorare l'accuratezza nelle stime della variabilità genetica.

Nel contesto del presente progetto di ricerca è stata effettuata la stima della variabilità genetica del Bracco Francese Tipo Pirenei mediante l'analisi dei dati genealogici definendone sia la condizione demografica che il livello di Inbreeding [18]. Vedi Capitolo 3 della presente relazione.

La grande quantità di dati genomici prodotti dalle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (Next generation sequencing, NGS) in forma, di pannelli di SNP (Single nucleotide polymorphisms marcatori genomici di ultima generazione) ad alta densità, rende questa nuova tipologia di marcatori genomici particolarmente adatti per il rilevamento di regioni genomiche in cui si viene a verificare una riduzione nell'eterozigosità ed offre nuove opportunità per migliorare l'accuratezza e la stima dei livelli di consanguineità.

Lo scopo di questa parte del progetto di ricerca è quello di studiare la variabilità genetica del Bracco Francese Tipo Pirenei a livello genomico mediante l'impiego di marcatori SNP utilizzando il "Dog microchip SNP Illumina ad alta densità contenente 173.662 SNPs.

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 Campionamento, Genotipizzazione e Controllo della Qualità

Il Club Italiano Bracco Francese (C.I.B.F.) ha reso possibile il campionamento di 48 cani non imparentati tra di loro (27 femmine, 21 maschi), provenienti da aree di allevamento diverse situate in regioni diverse del territorio Nazionale affinché potessero risultare rappresentativi della variabilità genetica presente all'interno della razza. I cani sono stati campionati in occasione dei raduni e delle prove di performances indette dal (C.I.B.F.) a livello Nazionale. Nel contesto dei campionamenti i proprietari hanno volontariamente permesso il prelievo del sangue dai cani scelti per il presente studio ed il Presidente del Club (C.I.B.F.) ne ha ottenuto il consenso informato. Nessun cane ha subito violenza. Il DNA genomico (gDNA) è stato estratto dai campioni di sangue mediante il QIAmp DNA Mini Kit QIAGEN. La concentrazione del DNA di ciascun campione è stata portata ad una concentrazione standard di 50 ng / μ L. Tutti i 48 cani campionati sono stati genotipizzati mediante l'Illumina CanineHD BeadChip, contenente 173.662 SNPs.

La genotipizzazione è stata effettuata nei laboratori del "*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali*", Università di Palermo. I dati SNP sono stati filtrati per escludere loci non mappati non assegnati a nessun cromosoma e loci localizzati sui cromosomi sessuali: sono stati considerati solo SNP localizzati sui 38 autosomi. Inoltre, gli SNP con call rate <95% e frequenza allelica minore (MAF) <5% sono stati rimossi dal set di dati, così come gli animali con oltre il 10% genotipi mancanti.

3.1.2 Analisi delle sequenze ROH

Un approccio alternativo per quantificare l'omozigosi individuale è basato sull'analisi delle sequenze di omozigosi (ROH). Le ROH si definiscono come sequenze di genotipi omozigoti adiacenti, che riflettono la trasmissione di aplotipi identici da parte di progenitori comuni [33]. Questi aplotipi, molto probabilmente risultano identici perché i genitori li ereditano da un antenato comune. Ad oggi, il coefficiente di consanguineità F stimato mediante le sequenze ROH è considerato uno dei metodi più efficaci per determinare l'effetto di consanguineità tra le diverse stime alternative, e permette inoltre di fare una distinzione tra consanguineità recente e più remota nel tempo [34]. Le sequenze ROH possono essere utilizzate per identificare le regioni genomiche che hanno un effetto negativo sul di un determinato fenotipo quando sono presenti allo stato omozigote, ma anche per determinare le possibili associazioni tra le caratteristiche fenotipiche o attitudinali di interesse e i geni presenti in queste regioni del genoma [35]. La presenza delle sequenze ROH nel genoma di un elevato numero di soggetti allo studio può essere indicativo di una pressione selettiva [36], la quale conduce alla fissazione di alleli favorevoli nella razza. Pertanto, l'identificazione di regioni genomiche che mostrano la riduzione o l'eliminazione di polimorfismi, può indicare tracce di una recente selezione e migliorare lo studio dei processi biologici legati ai caratteri selezionati. Le regioni genomiche sotto selezione mostreranno un aumento dei livelli delle sequenze ROH; comprendere come e dove la selezione ha plasmato i modelli di variabilità genetica rimane una delle tematiche più impegnative nel campo della genetica animale. Studi sulla distribuzione e l'analisi delle sequenze ROH sono stati condotti nell'uomo [33] ed in alcune specie di interesse zootecnico, come bovini [37] e [38] e suini [39]. L'obiettivo di questa parte del progetto di Ricerca è stato quello di studiare la distribuzione delle sequenze di omozigosi (ROH) nella razza Bracco Francese Tipo Pirenei, al fine di caratterizzarne i livelli di consanguineità e di identificare le regioni del genoma con la più elevata frequenza di sequenze ROH.

3.1.3 Parametri di Variabilità Genetica, Stima del Numero Effettivo ed analisi delle Sequenze Genomiche in Omozigosi (ROH)

Sono stati stimati gli indici di base per la variabilità genetica, tra cui:

- (i) Eterozigosi Osservata $(H_O = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L (\frac{n_{AB}}{N}))$
- (ii) Eterozigosi Attesa $(H_E = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L (1 - p_l^2 - q_l^2))$
- (iii) Coefficiente di Inbreeding basato sulla differenza tra genotipi omozigoti osservati ed attesi

$$(F_{IS} = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L (1 - \frac{H_{Ol}}{H_{El}})) \quad [19]$$

- (iv) Frequenza dell'Allele Minore $(MAF_l = \frac{n_{B_l}}{2N_l})$

Nelle formule sopra riportate

- L è il numero di loci SNP,
- n_{AB} è il numero di genotipi eterozigoti per ogni locus l
- N è il numero dei cani analizzati (dimensione del campionamento)
- p e q sono rispettivamente le frequenze di A (allele maggiore) e B (allele minore)

L'attuale Numero Effettivo della popolazione (N_e) è stato stimato in base al Linkage Disequilibrium (LD [20]). Per ridurre l'impatto dell'*ascertainment bias* derivante dalla possibile condizione di linkage esistente tra i loci, sono stati selezionati SNPs non in linkage in base ad un Variance Inflation Factor (VIF, è una misura di multicollinearità nella regressione multipla) con un valore inferiore a 2 in 50-SNP nella *sliding window* con 5-SNP per step. Al fine di evitare la rimozione di un numero troppo elevato di SNP si consiglia un valore del VIF inferiore a 2 per popolazioni campionate di ridotte dimensioni. (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/summary.shtml#prune>). *Runs of homozygosity* (ROH: segmenti del genoma omozigosità continua, [21]) sono state rilevate per ciascuno dei 48 cani analizzati cane utilizzando la metodica basata sulla *sliding window* descritta in [22, 23]. Al fine di scansionare l'intero genoma è stata utilizzata una *sliding window* lunga 50-SNP; la proporzione di *sliding window* omozigoti sovrapposte per definire un ROH era 0,05; in una run sono stati ammessi al massimo 2 due SNP mancati ed un eterozigote; è stato calcolato, come proposto da Lencz et al. [24], il numero minimo di SNP per definire un ROH (s) e per ridurre al minimo il numero di ROH falsi positivi:

$$s = \frac{\ln \frac{\alpha}{N \cdot L}}{\ln(1 - \overline{H_O})} \quad \text{dove } \alpha \text{ è la percentuale tollerata di ROH falsi positivi (0,05 nel presente studio);}$$

N e L sono rispettivamente la dimensione del campione e il numero di loci SNP;

$\overline{H_O}$ è l'eterozigosità media tra individui e SNP.

La lunghezza minima di una ROH è stata impostata su 1 MB per escludere una ROH breve che si verifica in conseguenza di una condizione di linkage disequilibrium (LD) [5].

Inoltre, per definire una ROH è risultata necessaria una densità di uno SNP compresa tra un minimo di 50 kB e un massimo di 100 kB tra SNP consecutivi. Per ciascuno dei 48 cani è stato calcolato il

coefficiente di Inbreeding basato sulla RHO (F_{ROH}) e definito come il rapporto tra la sommatoria della lunghezza di tutte le ROH $\sum L_{ROH}$ e la lunghezza totale del genoma degli autosomi coperto dagli SNP sul microchip ($L_{AUTO} = 2268,83$ MB).

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

3.1.4 Software

Il filtraggio per il controllo di qualità dei dati genotipici, il rilevamento delle ROH e la stima dei parametri genetici sono stati eseguiti utilizzando il pacchetto software PLINK [22].

N_e è stato stimato usando Ne Estimator v.2 [25], selezionando gli SNP non in linkage mediante il software PLINK.

Per il trattamento dei dati, le statistiche riassuntive, e la preparazione delle tabelle e delle figure è stato utilizzato l'*R programming environment for statistical computing* v.3.2.3 [26].

Le specifiche linee guida di PLINK sono dettagliate nel file aggiuntivo 1 scaricabile dalla versione PDF del seguente articolo Scientifico

Mastrangelo et al. *BMC Res Notes* (2018) 11:13
<https://doi.org/10.1186/s13104-017-3112-9>

BMC Research Notes

RESEARCH NOTE

Open Access



Genome-wide diversity and runs of homozygosity in the “Braque Français, type Pyrénées” dog breed

Salvatore Mastrangelo^{1†}, Filippo Biscarini^{2*†} , Barbara Auzino⁶, Marco Ragatzu³, Andrea Spaterna^{4,5} and Roberta Ciampolini^{5,6}

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

Conseguentemente al filtraggio ai fini della qualità delle genotipizzazioni (call-rate, per individuo e per marcatore) il numero finale degli SNP ritenuti idonei per le successive analisi è risultato 94.065. Tutti i 48 cani allo studio presentavano una genotipizzazione di alta qualità e sono stati inclusi nelle analisi.

I valori medi dell'eterozigosità osservata (HO) ed attesa (HE) risultano rispettivamente pari a 0,371 ($\pm 0,142$) e 0,359 ($\pm 0,124$); il valore medio di Frequenza dell'Allele Minore MAF medio è pari a 0,269 ($\pm 0,132$). I valori HO e HE riportati risultano paragonabili a quelli ottenuti in precedenti studi condotti sull'analisi della variabilità genetica nel cane: Pollinger et al. [27] e Pilot et al. [12] hanno stimato nelle razze canine moderne un valore medio per HO compreso tra 0,2 e 0,3 [12, 27]. Pertoldi et al. [6] hanno riportato nella stima dell'eterozigosità attesa per cinque razze canine danesi valori simili al valore di HE che si evidenzia per il Bracco Francese Tipo Pirenei. Anche il valore della MAF individuato risulta coerente con il range trovato in letteratura [11, 28]. Recentemente, Stronnet al. [29] hanno riportato valori inferiori di variabilità genetica nella razza a rischio Lundehund Norvegese (ad esempio HO = 0,038) rispetto ad altre tre razze di riferimento. Nella

stessa razza, è stato stimato un valore della MAF molto basso (0,033) [7]. In confronto, i livelli di variabilità genetica individuati per il Bracco Francese Tipo Pirenei sembrano indicare che questa razza non sia a rischio di estinzione. In questo studio i 5560 SNPs situati sui cromosomi sessuali non sono stati utilizzati, a causa della call SNP potenzialmente ambigua per gli SNPs che si trovavano allo stato eterozigote nei soggetti di sesso maschile. A titolo indicativo, riportiamo statistiche descrittive di base SNP condotte su maschi e femmine. Gli SNP monomorfici sui cromosomi sessuali erano del 41,2% e del 37,3% rispettivamente nei maschi e nelle femmine, con un valore della MAF rispettivamente di 0,145 e 0,151 e con tasso mancante rispettivamente di 0,0301 e 0,0293. Il Numero Effettivo stimato della popolazione attuale (N_e) nel Bracco Francese Tipo Pirenei è (51); questo valore indica un potenziale rischio di consanguineità e di riduzione della variabilità genetica. In un recente studio condotto sulla razza Bullmastiff è stato stimato un valore N_e simile (29.1) utilizzando lo stesso metodo di analisi [5]. Gli stessi autori hanno riferito che un ridotto valore del Numero effettivo (N_e) rispecchia la dimensione della popolazione, ed evidenzia come nei piani di selezione siano stati utilizzati prevalentemente solo alcuni riproduttori e come il contributo genetico dei fondatori della razza sia stato non equilibrato ma piuttosto sbilanciato solo su alcuni stalloni e fattrici.

Sono state identificate in totale 5635 ROH con una media di 117,38 ROH per cane analizzato (range tra 52 e 230 ROH per cane). La tabella 1 riporta il numero di sequenze ROH e la loro lunghezza media per classe di lunghezza (1-2, 2-4, 4-8, 8-16 MB).

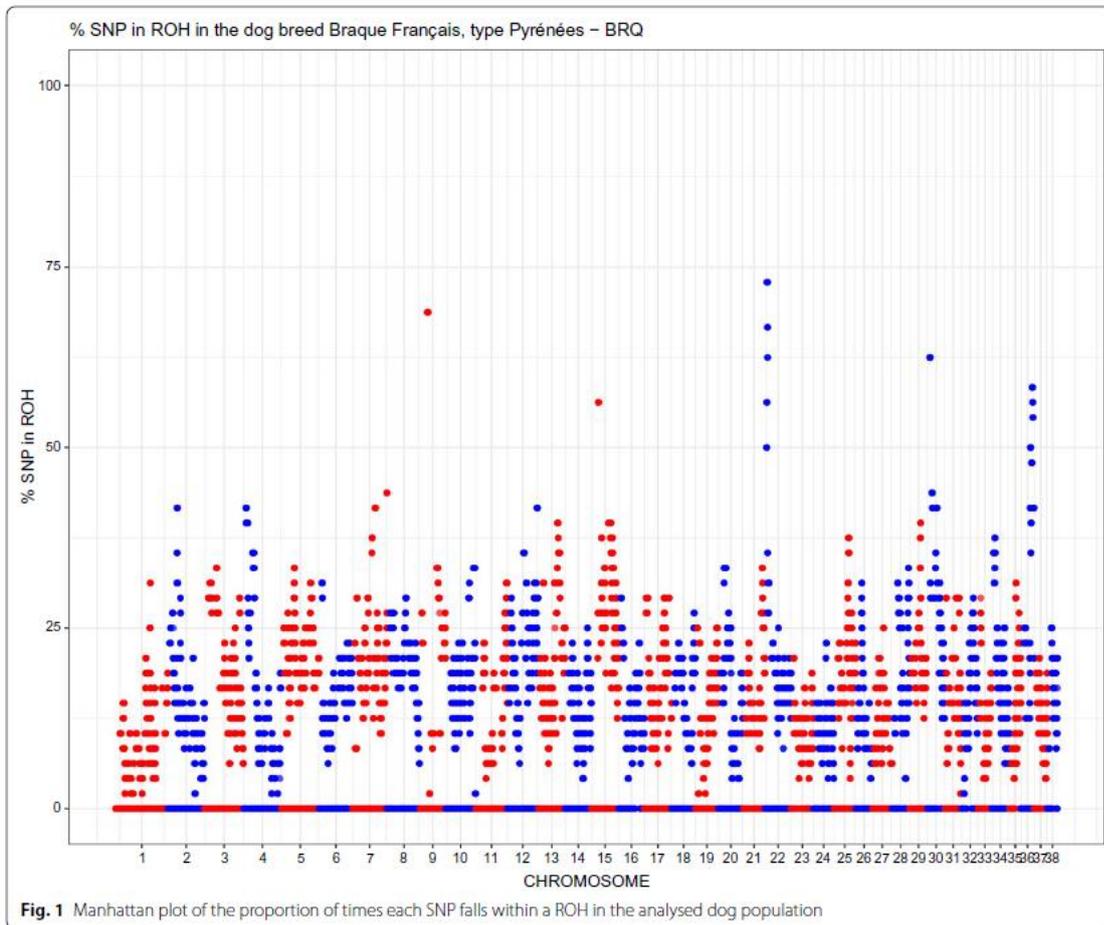
Table 1 ROH counts and average length per class (MBps)

	Class (MBps)	Group	nRuns	Avg length (MBps)
1	1–2	BRQ	3390	1.43
2	2–4	BRQ	1752	2.67
3	4–8	BRQ	463	5.16
4	8–16	BRQ	29	9.22

BRQ Braque Français, type Pyrénées

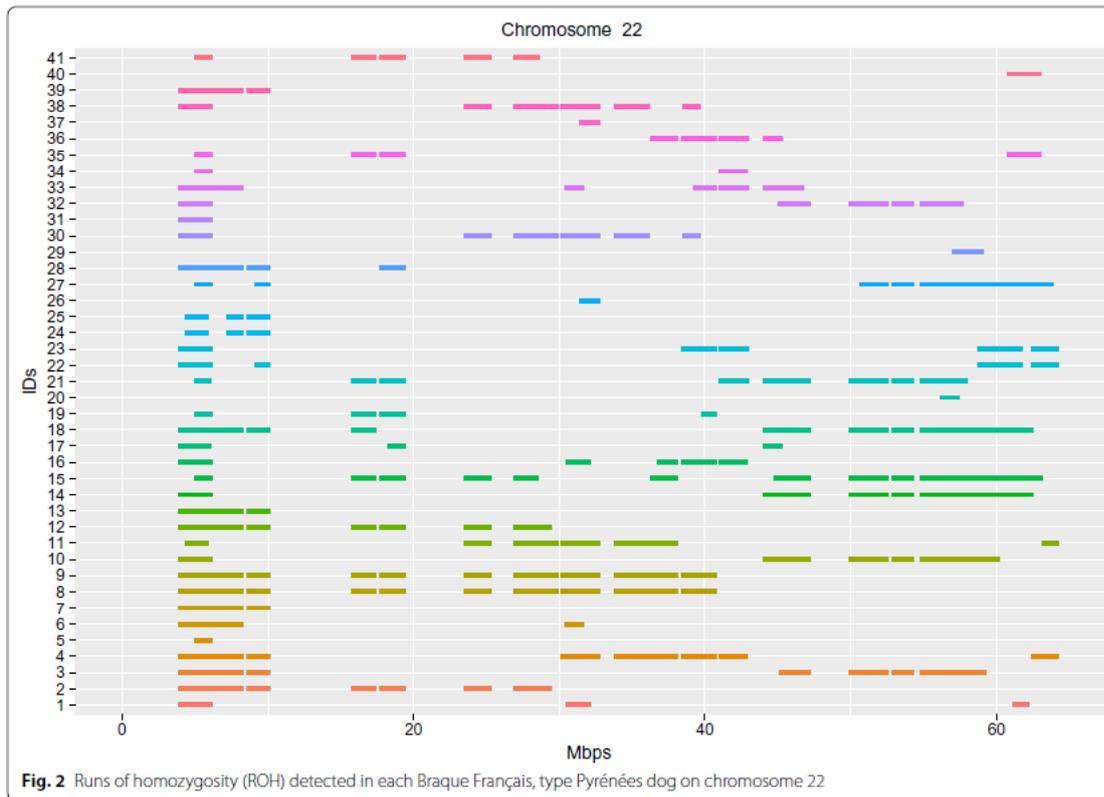
Il numero medio di sequenze ROH nelle razze canine mediterranee variava da 12 (Mastino Abruzzese) a 114 (San Bernardo) [30]: questo posiziona il Bracco Francese Tip Pirenei nella parte più alta della gamma. La ROH più lunga (12,5 MB) è stata individuata sul cromosoma 16.

La Figura 1 mostra la proporzione di volte (cani) in cui ogni SNP viene a situarsi all'interno di una ROH, evidenziando la posizione che il marcatore SNP occupa all'interno del genoma del cane.



Nel Bracco Francese Tipo Pirenei, un certo numero di loci SNP sembrano posizionarsi relativamente spesso all'interno di una ROH localizzata sul cromosoma 22.

In (Fig. 2). infatti, all'inizio del cromosoma 22 (5-10 MB), si evidenzia un frammento di una ROH che risulta presente nella maggior parte dei 48 cani analizzati.



I valori dei coefficienti di consanguineità come F_{IS} , stimati mediante i marcatori SNP, risultano compresi nell'intervallo $[-0,127, 0,172]$: sono stati ottenuti anche alcuni valori negativi, che corrispondenti a cani con un livello di omozigosi inferiore alla media. La consanguineità stimata a partire dalle ROH (F_{ROH}) presenta una media di $0,112 (\pm 0,023)$, con un intervallo tra $0,0526$ e $0,225$. In studi condotti sul Pastore Tedesco sono stati riportati valori F_{ROH} simili [8]. Per un insieme di razze canine sono stati stimati valori di F_{ROH} che vanno da $0,061$ per la razza Jack Russell Terrier a $0,151$ per la razza Bulldog [5]. Il valore della correlazione lineare di Pearson tra le due misure di inbreeding molecolare (F_{IS} e F_{ROH}) è di $0,91$.

In uno studio precedente [31], condotto a partire dai dati genealogici, è stato stimato un coefficiente di inbreeding genealogico medio (F) del $4,3\%$ [18].

3.3 CONCLUSIONI

L'insieme dei risultati presentati costituiscono la prima caratterizzazione genomica della razza Bracco Francese Tipo Pirenei e forniscono un interessante esempio dell'uso di marcatori molecolari per comprendere il background genetico e la storia della razza.

Per la prima volta, la variabilità genetica della razza è stata indagata mediante l'impiego di marcatori genomici di ultima generazione SNPs ed attraverso metodiche analitiche innovative che permettono di scansionare l'intero genoma della razza. Rispetto alle analisi della variabilità genetica condotte sui dati genealogici a partire dai pedigree (vedi capitolo 3), questo nuovo approccio di studio, condotto direttamente sul DNA, permette di rilevare la reale variabilità genetica esistente in all'interno del campione allo studio costituito da 48 cani maschi e femmine e rappresentativo dell'intera razza Bracco Francese Tipo Pirenei. Inoltre, i dati genomici possono essere utilizzati per migliorare l'accuratezza delle registrazioni genealogiche contenute ne pedigree, consentendo confronti più significativi tra i valori dell'inbreeding genealogico e molecolare.

Un interessante risultato è costituito dal forte segnale ROH rilevato nel cromosoma 22 (Fig. 1) Si può ipotizzare che tale segnale possa essere associato a particolari attitudini venatorie oppure a caratteristiche morfologiche che nel tempo sono state selezionate. Inoltre, se questo segnale verrà confermato da ulteriori indagini future, potrà consentire di mappare sul cromosoma 22 un'area che potrà costituire l'oggetto di mirati piani di selezione assistita da marcatori o MAS Marker Assisted Selection ed addirittura selezione assistita dai genotipi che potranno essere evidenziati nel genoma di alcuni riproduttori maschi e femmine Genotype Assisted Selection.

Dai risultati sopra illustrati, anche in comparazione con quelli prodotti da studi condotti su altre razze canine, si evidenzia come i livelli di consanguineità stimati a partire dalle analisi ROH, risultino comparabili con quelli presenti nelle altre razze canine e anche relativamente contenuti.

Dai parametri che stimano la variabilità genetica a livello genomico, si evidenzia come questa risulti sufficientemente ampia. Tale importante risultato permette di poter affermare che la variabilità genetica potrà essere non solo conservata ed ampliata ma anche miratamente utilizzata se verrà accuratamente gestita nel contesto dei futuri piani di selezione.

3.4 BIBLIOGRAFIA

1. Taberlet P, Valentini A, Rezaei H, Naderi S, Pompanon F, Negrini R, Ajmone- Marsan P. Are cattle, sheep, and goats endangered species? *Mol Ecol*. 2008;17(1):275–84.
2. Kristensen TN, Sørensen AC. Inbreeding-lessons from animal breeding, evolutionary biology and conservation genetics. *Anim Sci*. 2005;80(2):121–33.
3. Leroy G, Rognon X, Varlet A, Joffrin C, Verrier E. Genetic variability in french dog breeds assessed by pedigree data. *J Anim Breed Genet*. 2006;123(1):1–9.
4. Cecchi F, Paci G, Spaterna A, Ciampolini R. Genetic variability in bracco italiano dog breed assessed by pedigree data. *Ital J Anim Sci*. 2013;12(3):54.
5. Mortlock S-A, Khatkar MS, Williamson P. Comparative analysis of genome diversity in bullmastiff dogs. *PLoS ONE*. 2016;11(1):0147941.
6. Pertoldi C, Kristensen TN, Loeschcke V, Berg P, Praebel A, Stronen AV, Proschowsky HF, Fredholm M. Characterization of the genetic profile of five danish dog breeds. *J Anim Sci*. 2013;91(11):5122–7.
7. Pfahler S, Distl O. A massive reduction of the genetic diversity in the lundehund. *Anim Genet*. 2014;45(1):154.
8. Mortlock S-A, Booth R, Mazrier H, Khatkar MS, Williamson P. Visualization of genome diversity in german shepherd dogs. *Bioinform Biol Insights*. 2015;9(Suppl 2):37.
9. Leroy G, Verrier E, Meriaux J, Rognon X. Genetic diversity of dog breeds: within-breed diversity comparing genealogical and molecular data. *Anim Genet*. 2009;40(3):323–32.
10. Ciampolini R, Cecchi F, Paci G, Policardo C, Spaterna A. Investigation on the genetic variability of the american pit bull terrier dogs belonging to an italian breeder using microsatellite markers and genealogical data. *Cytol Genet*. 2013;47(4):217–21.
11. Vaysse A, Ratnakumar A, Derrien T, Axelsson E, Pielberg GR, Sigurdsson S, Fall T, Seppälä EH, Hansen MS, Lawley CT, et al. Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS Genet*. 2011;7(10):1002316.
12. Pilot M, Malewski T, Moura AE, Grzybowski T, Oleński K, Kamiński S, Fadel FR, Alagaili AN, Mohammed OB, Bogdanowicz W. Diversifying selection between pure-breed and free-breeding dogs inferred from genomewide snp analysis. *Genes Genomes Genet*. 2016;6(8):2285–98.
13. Dreger DL, Rimbault M, Davis BW, Bhatnagar A, Parker HG, Ostrander EA.

- Whole genome sequence, snp chips and pedigree structure: building demographic profiles in domestic dog breeds to optimize genetic trait mapping. *Dis Models Mech*. 2016. <https://doi.org/10.1242/dmm.027037>.
14. Ciampolini R, Cecchi F, Bramante A, Casetti F, Presciuttini S. Genetic variability of the bracco italiano dog breed based on microsatellite polymorphism. *Ital J Anim Sci*. 2011;10(4):59.
 15. Bigi D, Marelli S, Randi E, Polli M. Genetic characterization of four native italian shepherd dog breeds and analysis of their relationship to cosmopolitan dog breeds using microsatellite markers. *Animal*. 2015;9(12):1921–8.
 16. Allendorf FW, Hohenlohe PA, Luikart G. Genomics and the future of conservation genetics. *Nat Rev Genet*. 2010;11(10):697.
 17. Bruford MW, Ginja C, Hoffmann I, Joost S, Orozco-terWengel P, Alberto FJ, Amaral AJ, Barbato M, Biscarini F, Colli L, et al. Prospects and challenges for the conservation of farm animal genomic resources, 2015–2025. *Front Genet*. 2015;6:314.
 18. Cecchi F, Paci G, Spaterna A, Ragatzu M, Ciampolini R. Demographic approach on the study of genetic parameters in the dog Braque Français type Pyrénées italian population. *Ital J Anim Sci*. 2016;15(1):30–6.
 19. Wright S. The interpretation of population structure by f-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 1965;19(3):395–420.
 20. Jones A, Ovenden J, Wang Y. Improved confidence intervals for the linkage disequilibrium method for estimating effective population size. *Heredity*. 2016;117(4):217–23.
 21. McQuillan R, Leutenegger A-L, Abdel-Rahman R, Franklin CS, Pericic M, Barac-Lauc L, Smolej-Narancic N, Janicijevic B, Polasek O, Tenesa A, et al. Runs of homozygosity in European populations. *Am J Hum Genet*. 2008;83(3):359–72.
 22. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, De Bakker PI, Daly MJ, et al. Plink: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007;81(3):559–75.
 23. Bjelland D, Weigel K, Vukasinovic N, Nkrumah J. Evaluation of inbreeding depression in holstein cattle using whole-genome snp markers and alternative measures of genomic inbreeding. *J Dairy Sci*. 2013;96(7):4697–706.
 24. Lencz T, Lambert C, DeRosse P, Burdick KE, Morgan TV, Kane JM, Kucherlapati R, Malhotra AK. Runs of homozygosity reveal highly penetrant recessive loci in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(50):19942–7.
 25. Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth G, Tillett BJ, Ovenden JR. Neestimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (n_e) from genetic data. *Mol Ecol Resour*. 2014;14(1):209–14.
 26. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2017. <https://www.Rproject.org/>.
 27. Pollinger JP, Lohmueller KE, Han E, Parker HG, Quignon P, Degenhardt JD, Boyko AR, Earl DA, Auton A, Reynolds A, et al. Genome-wide snp and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*. 2010;464(7290):898.
 28. Parker HG, Dreger DL, Rimbault M, Davis BW, Mullen AB, Carpintero-Ramirez G, Ostrander EA. Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration, and hybridization on modern dog breed development. *Cell Rep*. 2017;19(4):697–708.
 29. Stronen AV, Salmela E, Baldursdóttir BK, Berg P, Espelien IS, Järvi K, Jensen H, Kristensen TN, Melis C, Manenti T, et al. Genetic rescue of an endangered domestic animal through outcrossing with closely related breeds: a case study of the norwegian lundehund. *PLoS ONE*. 2017;12(6):0177429.
 30. Dreger DL, Davis BW, Cocco R, Sechi S, Di Cerbo A, Parker HG, Polli M, Marelli SP, Crepaldi P, Ostrander EA. Studies of the Fonni's dogs from sardinia show commonalities between development of pure breeds and population isolates. *Genetics*. 2016;204:737–55.
 31. Wright S. Coefficients of inbreeding and relationship. *Am Nat*. 1922;56(645):330–8.

32. Biscarini F, Biffani S, Stella A. Más allá del gwas: alternativas para localizar qtls. arXiv preprint arXiv:1504.03802. 2015.
33. Gibson J, Morton N, Collins A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet.* 2006;15:789–95.
34. Keller MC, Visscher PM, Goddard ME. Quantification of inbreeding due to distant ancestors and its detection using dense single nucleotide polymorphism data. *Genetics.* 2011;189:237–49.
35. Szmatoła T, Gurgul A, Ropka-Molik K, Jasielczuck I, Zabek T, Bugno-Poniewierska M. Characteristics of runs of homozygosity in selected cattle breeds maintained in Poland. *Livest Sci.* 2016;72-88.
36. Zavarez LB, Utsunomiya YT, Carmo AS, Neves HH, Carvalheiro R, Ferencaković M, et al. Assessment of autozygosity in Nellore cows (*Bos indicus*) through high-density SNP genotypes. *Front Genet.* 2015;6:5.
37. Marras G, Gaspa G, Sorbolini S, Dimauro C, Ajmone-Marsam P, Valentini A, et al. Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy. *Anim Genet.* 2014;46:110–21.
38. Mastrangelo S, Tolone M, Di Gerlando R, Fontanesi L, Sardina MT, Portolano B. Genomic inbreeding estimation in small populations: evaluation of runs of homozygosity in three local dairy cattle breeds. *Animal.* 2016;10:746-54.
39. Silió L, Rodríguez MC, Fernández A, Barragán C, Benítez R, Óvilo C et al. Measuring inbreeding and inbreeding depression on pig growth from pedigree or SNP-derived metrics. *J Anim Breed Genet.* 2013;130:349–60.

4 LA CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DEL BRACCO FRANCESE TIPO PIRENEI E LE RELAZIONI GENOMICHE CON LE RAZZE CANINE FCI

Autori: Dr. Salvatore Mastrangelo; Dr. Filippo Biscarini; Prof. Roberta Ciampolini

Le moderne razze canine discendono dal lupo grigio (*Canis lupus*), e attraverso l'addomesticamento e la selezione artificiale si sono diversificate in una vasta collezione di sottopopolazioni, o razze, con caratteristiche morfologiche ed attitudinali ben definite [1]. Sin dall'antichità sono state osservate popolazioni canine distinte ma la costituzione delle razze chiuse moderne è avvenuta durante il XIX secolo ed insieme alla selezione, per specifiche caratteristiche morfologiche, ha portato ad un aumento della differenziazione tra le razze [2]. Il processo di formazione della razza è stato associato a gravi riduzioni della variabilità genetica e a un notevole aumento del linkage disequilibrium (LD) [3]. I cani di razza dimostrano un'alta incidenza dell'effetto "fondatore" ovvero la riduzione della variabilità genetica in sottopopolazioni che si sono originate da un esiguo numero di antenati la quale determina un'estensione linkage disequilibrium LD [4]. Quantificare l'entità del LD è importante, poiché è probabile che abbia un impatto sul successo degli studi di mappatura genetica [5, 6]. La variabilità genetica e la struttura della popolazione nelle razze canine dipendono in larga misura dalle decisioni e dalle pratiche degli allevatori. L'effettiva dimensione della popolazione (Numero effettivo N_e) costituisce un altro parametro importante per la valutazione della variabilità genetica esistente all'interno delle razze, per il suo mantenimento nel tempo. Per una gestione efficace delle razze canine è necessaria una conoscenza approfondita della variabilità genetica sia per poterla mantenere che ove possibile incrementare [7]. Tale caratterizzazione genetica rappresenta il punto di partenza per la messa a punto di programmi di conservazione e selezione. Con il completamento della sequenza del genoma canino [3], la tecnologia NGS (next-generation sequencing) fornisce un grande potenziale per aumentare la nostra comprensione della base genomica della variabilità genetica della specie canina, per facilitare l'individuazione delle basi genetiche di caratteri a base poligenica attraverso studi di associazione, e per migliorare l'efficienza dei programmi di selezione e conservazione [8-10]. La stima dei parametri di LD, N_e , Inbreeding basata sulle moderne metodiche analitiche (ad ed analisi delle sequenze RHO), può quindi essere oggi effettuata con un'elevatissima precisione. Recentemente sono stati pubblicati numerosi studi sulla struttura e la variabilità genetica condotti a livello genomico sia all'interno di singole razze che tra diverse razze canine. [8, 10-12]. Come illustrato nel capitolo precedente, la variabilità genetica della razza Bracco Francese Tipo Pirenei è stata esaminata per la prima volta mediante l'impiego di marcatori molecolari di ultima generazione SNPs [14]. Con le ulteriori analisi che vengono riportate in questo capitolo intendiamo fornire una rappresentazione ad alta risoluzione della variabilità genetica presente a livello genomico per stabilirne la strutturazione all'interno della razza in modo da poter monitorare la presenza di eventuali "bottle neck" (restrizioni drastiche della variabilità genetica conseguenti ad eventi selettivi recenti). Inoltre, i polimorfismi dei marcatori genomici SNPs sono stati confrontati con quelli 48 razze di canine FCI e con il lupo al fine di poterne determinare le relazioni genetiche.

4.1 MATERIALI E METODI

4.1.1 Campionamento, Genotipizzazione e Controllo della Qualità

Il Club Italiano Bracco Francese (C.I.B.F.) ha reso possibile il campionamento di 48 cani non imparentati tra di loro (27 femmine, 21 maschi), provenienti da aree di allevamento diverse situate in regioni diverse del territorio Nazionale affinché potessero risultare rappresentativi della variabilità genetica presente all'interno della razza. I cani sono stati campionati in occasione dei raduni e delle prove di performances indette dal (C.I.B.F.) a livello Nazionale. Nel contesto dei campionamenti i proprietari hanno volontariamente permesso il prelievo del sangue dai cani scelti per il presente studio ed il Presidente del Club (C.I.B.F.) ne ha ottenuto il consenso informato. Nessun cane ha subito violenza. Il DNA genomico (gDNA) è stato estratto dai campioni di sangue mediante il QIAmp DNA Mini Kit QIAGEN. La concentrazione del DNA di ciascun campione è stata portata ad una concentrazione standard di 50 ng / μ L. Tutti i 48 cani campionati sono stati genotipizzati mediante l'Illumina CanineHD BeadChip, contenente 173.662 SNP.

La genotipizzazione è stata effettuata nei laboratori del "*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali*", Università di Palermo. Sono stati utilizzati anche dati genotipici di 49 razze canine e campioni di Lupo Grigio ottenuti dal progetto LUPA ([8]: ottenuti da <http://dogs.genouest.org/SWEEP.dir/Supplemental.html>) che li rende di dominio pubblico.

(Tabella 1).

Table 1

Summary of canine breeds used in this study: Braque Français and breeds from the LUPA project.

Sample size, estimated effective population size (N_e) thirteen generations ago, and average inbreeding estimated from ROH (F_{ROH}).

Breed	Abbreviation	N	N_{e13}	F_{ROH}
Braque Français	BRA	48	51	0.18
Australian Shepherd	ASH	1		
Beagle	BGL	10	34	0.21
Belgian Tervuren	BET	12	32	0.20
Bernese Mountain Dog	BMD	12	32	0.30
Border Collie	BOC	16	50	0.15
Border Terrier	BOT	25	43	0.33
Boxer	BOX	8		
Brittany Spaniel	BRS	12	49	0.17
Cavalier King Charles Spaniel	CKC	5		
Chihuahua	CHI	2		
Cocker Spaniel	COS	14	44	0.22
Czechoslovakian Wolf Dog	CWD	3		
Dachshund	DAC	12	51	0.15
Dalmatian	DAL	7		
Doberman Pinscher	DOB	25	43	0.37
Elkhound	ELK	12	41	0.17
English Bull Terrier	EBT	8		
English Bulldog	EBD	13	39	0.36
English Cocker Spaniel	ECS	2		
English Setter	EST	12	43	0.20
English Springer Spaniel	ESS	3		
Eurasian	EUR	12	31	0.18
Finnish Spitz	FSP	12	34	0.25

Flatcoated Retriever	FCR	2		
German Shepherd	GSH	12	36	0.31
Golden Retriever	GRE	14	43	0.21
Gordon Setter	GOS	25	65	0.18
Greenland Sledge Dog	GSL	12	53	0.23
Greyhound	GRY	11	33	0.30
Irish Wolfhound	IRW	11	30	0.34
Jack Russell Terrier	JRT	12	52	0.08
Labrador Retriever	LRE	14	50	0.18
Large Munsterlander	LMU	1		
Mops	MOP	2		
Newfoundland	NFD	25	58	0.21
Nova Scotia Duck Tolling Retriever	NSD	23	36	0.24
Rottweiler	RTW	12	36	0.29
Poodles	PDL	17	48	0.18
Samoyed	SAM	2		
Saarloos	SAR	2		
Schipperke	SCI	25	52	0.17
Schnauzer	SCN	3		
Shar Pei	SHP	11	40	0.11
Siberian Husky	HUS	2		
Standard Poodle	STP	12	37	0.17
Terrier	TER	6		
Yorkshire Terrier	TYO	12	51	0.14
Weimaraner	WEI	26	36	0.33
Wolf	WLF	13	49	0.13
<i>Total</i>		593		

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208548.t001>

doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208548.t001>

Da questo database Sono state escluse razze con meno di 10 individui, rimanendo disponibili per le analisi 521 cani appartenenti a 32 razze (BRA inclusi) e 13 lupi per 154151 SNP comuni su entrambi i set di dati

Il Pannello delle razze BRA e LUPA è stato filtrato come segue:

- i) sono stati esclusi i marcatori su contigs non mappati;
- ii) sono stati conservati solo SNPs su 38 autosomi per ulteriori analisi;
- iii) SNP con call rate <95% e iv) ed un valore di Frequenza dell'Allele Minore (MAF) <1% sono stati rimossi.

Infine, sono stati rimossi dal database i cani con più del 10% di genotipi mancanti.

Ciò ha portato a un primo dataset composto da 534 cani, appartenenti a 33 razze (inclusa una popolazione di lupi grigi) tutti genotipizzati complessivamente con 132.281 SNP. Il dataset è stato utilizzato per stimare le analisi delle sequenze ROH, il Numero effettivo della popolazione (N_e) ed il Linkage Disequilibrium (LD).

Inoltre gli SNPs con il valore di Frequenza dell'Allele Minore MAF inferiore al 5% sono stati rimossi ma utilizzando tutte le razze disponibili (non limitandoci alle razze con almeno 10 individui), ottenendo così un set di dati di 593 animali, 50 razze e 123.666 SNP utilizzati per il' analisi (MDS) delle distanze genetiche, il clustering e l' analisi di Neighbor Joining (NJ).

Per l'analisi interna al BRA, sono stati rimossi dal dataset SNP che presentavano un call rate <95% e minor frequenza allelica (MAF) <5%, oltre ad animali con oltre il 10% di genotipi mancanti (48 cani e 94.065 SNPs rimanenti).

Non sono stati condotti studi sperimentali sugli animali. I registri BRA sono stati forniti da "ENCI" (Ente Nazionale Cinofilia Italiana), l'ente che gestisce ufficialmente i dati per tutte le razze canine

registrate in Italia. I dati di genotipizzazione per tutte le altre 49 razze di cani sono stati ottenuti dal progetto LUPA (<https://eurolupa.org>) che rendeva pubblici i loro dati.

4.1.2 Analisi delle sequenze ROH

Un approccio alternativo per quantificare l'omozigosi individuale è basato sull'analisi delle sequenze di omozigosi (ROH). Le ROH si definiscono come sequenze di genotipi omozigoti adiacenti, che riflettono la trasmissione di aplotipi identici da parte di progenitori comuni [48]. Questi aplotipi, molto probabilmente risultano identici perché i genitori li ereditano da un comune antenato. Ad oggi, il coefficiente di consanguineità F stimato mediante le sequenze ROH è considerato uno dei metodi più efficaci per determinare l'effetto di consanguineità tra le diverse stime alternative, e permette inoltre di fare una distinzione tra consanguineità recente ed antica [49]. Le sequenze ROH possono essere utilizzate per identificare le regioni genomiche che hanno un effetto negativo sul di un determinato fenotipo quando sono presenti allo stato omozigote, ma anche per determinare le possibili associazioni tra i caratteristiche fenotipiche o attitudinali di interesse e i geni presenti in queste regioni del genoma [50]. La presenza delle sequenze ROH nel genoma di un elevato numero di soggetti allo studio può essere indicativa di una pressione selettiva [51], la quale conduce alla fissazione di alleli favorevoli nella razza.

Pertanto, l'identificazione di regioni genomiche che mostrano la riduzione o l'eliminazione di polimorfismi, può indicare tracce di una recente selezione e migliorare lo studio dei processi biologici legati ai caratteri selezionati. Le regioni genomiche sotto selezione mostreranno un aumento dei livelli delle sequenze ROH; comprendere come e dove la selezione ha plasmato i modelli di variabilità genetica rimane una delle tematiche più impegnative nel campo della genetica animale. Studi sulla distribuzione e l'analisi delle sequenze ROH sono stati condotti nell'uomo [48] ed in alcune specie di interesse zootecnico, come bovini [52] e [53] e suini [54]. L'obiettivo è stato quello di studiare la distribuzione delle sequenze di omozigosi (ROH) nella razza Bracco Francese Tipo Pirenei, al fine di caratterizzarne i livelli di consanguineità e di identificare le regioni del genoma con la più elevata frequenza di sequenze ROH.

4.1.3 Analisi Genealogiche

Le genealogie dei 48 cani scelti per le analisi genomiche di questa ricerca, sono state fornite nel 2017 in formato elettronico da "ENCI" (Ente Nazionale Cinofilia Italiana) su richiesta ufficiale del Presidente del Club Bracco Francese

Il file relativo ai dati genealogici dei 48 cani comprendeva 333 cani (143 maschi, 175 femmine), con una profondità media di 3,6 generazioni.

La matrice di parentela additiva (A) relativa alla parentela genetica additiva esistente tra i cani allo studio tra cani è stata stimata dai dati genealogici contenuti nei pedigree forniti da ENCI [15]; gli elementi diagonali della matrice A sono $1 + F_i$, dove F_i sono i coefficienti di inbreeding (probabilità di alleli identici per discesa IBD in un determinato locus), con $i \in [1, \text{numero di animali}]$ [16]. Per le analisi relative ai dati genealogici è stato utilizzato il pacchetto informatico R genealogici [17].

4.1.4 Stima dei parametri genetici

Per la caratterizzazione genetica della razza di cane BRA, sono stati stimati i seguenti parametri molecolari:

- i) linkage disequilibrium (LD),
- ii) dimensioni effettive della popolazione (N_e),
- iii) analisi delle sequenze (ROH)
- iv) Stima del valore di inbreeding a livello molecolare.

Il LD tra coppie sintetiche di SNPs è stato stimato come r^2 [18]. I valori LD sono stati raggruppati in bin in base alla distanza della coppia base tra gli SNP dalla mappa fisica. Il LD medio per bin in funzione della distanza della coppia base è stato quindi utilizzato per stimare il decadimento LD nei cani BRA e nelle altre razze canine. N_e recenti e storici sono stati stimati sulla base della relazione tra LD (r^2), (N_e) e il tasso di ricombinazione, come illustrato da Sved [19]. (N_e) è stato stimato separatamente per ogni razza, e (N_e) storico e recente sono stati differenziati in base alla distanza tra i loci. Le sequenze di omozigosi (ROH) sono state rilevate in ciascun animale sulla base di una scansione a intervalli nel genoma [20]. Non è stata eseguita alcuna eliminazione esplicita basata su LD, ma è stata impostata una lunghezza ROH minima per escludere il ROH breve derivante da LD. Sono stati utilizzati i seguenti criteri per definire le ROH: finestre genomiche lunghe 50-SNPs con un massimo di due SNP eterozigoti e due mancanti; le ROH presentavano una lunghezza minima di 50 SNP e 1000 kb, una densità minima di 1 SNP ogni 50 kb e una distanza massima tra SNP consecutivi di 100 kb. Sulla base delle ROH, l'inbreeding molecolare (FROH) è stato stimato per ciascun cane in base al rapporto tra la somma totale delle lunghezze di ROH e la dimensione totale del genoma autosomico [21].

4.1.5 Parentela Genomica e Struttura della Popolazione

Parentela Genomica e Distanze Genetiche

Parentele Genomiche inter-razza

La stima delle parentele genomiche tra le razze del dataset si è basata sui genotipi SNP ed è stata calcolata come descritto da Yang et al [22]: in breve, le parentele genetiche additive sono stimate tra ogni coppia di singoli individui, scalando per le frequenze alleliche locus per locus (a differenza del metodo di Van Raden, che scala la matrice di parentela additiva sulla base di un fattore costante dato dal doppio della somma delle frequenze alleliche [23]).

Le distanze genetiche tra razze sono state stimate come complemento di uno dei valori IBS (identità per stato) a coppie (proporzione di alleli non IBS tra due campioni).

Struttura della popolazione

Il grado di sottostruttura della popolazione è stato valutato tramite l'algoritmo di clustering basato su modello implementato in ADMIXTURE [24]. È stato costruito un albero *unweighted neighbor-joining* (NJ) basato sulla matrice di distanza genetica stimata dai dati molecolari.

4.1.6 Software

Il controllo della qualità e il filtraggio dei dati genotipici, la stima del LD, il rilevamento delle sequenze ROH, la stima delle relazioni genomiche intra razza e tra le razze del dataset sono stati eseguiti usando il software PLINK v. 1.9 [25].

Il software S_{NEP} è stato utilizzato per stimare le dimensioni effettive della popolazione (N_e) [26]. Per la gestione e l'elaborazione dei dati molecolari è stato utilizzato il software statistico R [27]. Per creare le figure è stato utilizzato il software (ggplot2 [28]) e per costruire e visualizzare l'albero NJ il software (ape [29]).

4.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

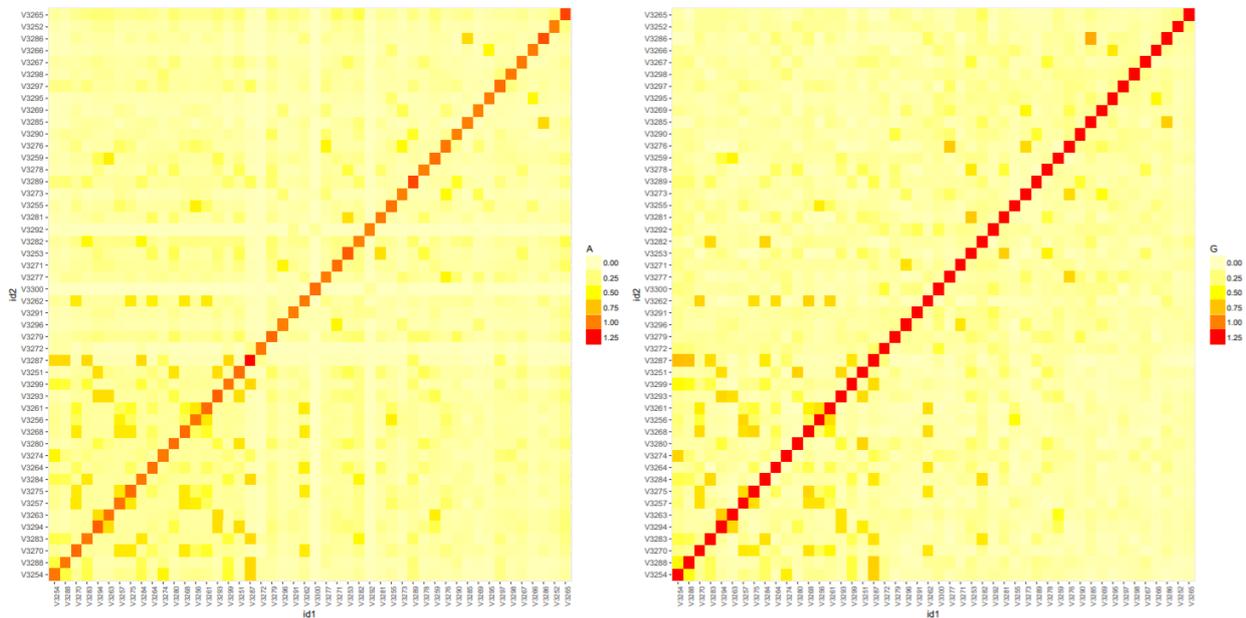
Lo scopo di questo lavoro è stato in primo luogo, quello di approfondire le indagini sulla variabilità genetica e la sua strutturazione all'interno della razza Bracco Francese Tipo utilizzando sia dati genealogici che molecolari; ed in secondo luogo, quello di collocare la razza nel contesto mondiale delle razze canine, confrontando i polimorfismi genomici SNPs del Bracco Francese Tipo Pirenei con quelli delle principali razze canine FCI ed un gruppo di lupi grigi.

4.2.1 Parentele Genealogiche e Genomiche

Le parentele genetiche additive esistenti tra i cani allo studio sono state stimate a partire dai dati genealogici. Il coefficiente di inbreeding medio (\bar{F}_i) in BRA è risultato 0,049 (4,9%), con una deviazione standard di 0,051. Risultati simili sono stati riportati da Mortlock et al. [11], che evidenziava un valore di inbreeding medio di 0,047 utilizzando le informazioni genealogiche di 188 cani Bulmastiff. Un precedente studio su 32 razze australiane ha riportato un coefficiente di inbreeding genealogico medio compreso tra 0 e 0.101 [30], mentre valori più elevati in un intervallo compreso tra 0,19 - 0,23 sono stati riscontrati nella razza Cane Lupo Cecoslovacco [31]. Nei nostri dati, 41 su 48 cani avevano $F_i > 0$, passando da un minimo di 0,036 (3,6%) a un massimo di 0,25 (25%). Il valore di Inbreeding medio per generazione presenta un andamento piuttosto irregolare, passando da un valore di 0,06 nella quarta generazione presente nei pedigree fino ad un valore di 0,05 nella generazione più profonda registrata dai pedigree, con un valore massimo di 0,12 (12%) stimato per la sesta generazione, senza una chiara tendenza.

Le parentele genomiche stimate a partire dai genotipi di SNP dei 48 cani allo studio sono risultate molto simili alle parentele stimate a partire dai dati genealogici, con una correlazione di Pearson di 0,92 (come evidenziato nelle "heatmaps" delle due matrici di parentela in **(Fig S1)**).

Fig S1: matrici di parentela genetica e molecolare per i 48 Bracco Francese Tipo Pirenei. Matrice di parentela Heatmaps basata su dati di pedigree (a sinistra) e dati molecolari marcatori genomici SNP (a destra)



Nonostante i diversi approcci metodologici utilizzati nel calcolo dei 2 coefficienti: 1) F a partire dai dati dei pedigree e 2) F_{ROH} a partire dai dati molecolari [32], le stime dei livelli di inbreeding calcolati a partire dai dati genomici sono risultate mediamente comparabili con quelle calcolate a partire dai dati dei pedigree. La correlazione tra i valori dell'indice di inbreeding stimato dai dati pedigree e da quello stimato dai dati molecolari (F_{ROH}) è risultata di 0,48. Wiener et al. [33] hanno riportato un coefficiente di correlazione di Pearson tra F dai dati dei pedigree e F_{ROH} dai dati molecolari di 0,78.

Alcuni studi condotti sulle specie animali da reddito hanno evidenziato correlazioni più basse tra i due coefficienti di inbreeding; ad esempio, 0,015 nei suini Landrace brasiliani e 0,24 nei maiali brasiliani di grandi dimensioni [34]; 0,47 nei bovini di razza Jersey danese e 0,49 nei bovini di razza Rossa danese [35]. Le modeste correlazioni riportate in questa ricerca potrebbero essere state influenzate dalla qualità delle stime basate sui pedigree e dalla profondità del pedigree disponibile per BRA. Inoltre, le stime basate sui pedigree presuppongono che non vi sia inbreeding nella popolazione di base e visto che in BRA (\bar{F}_i) ha un valore del (4,9%), questo contribuisce alla bassa correlazione tra i 2 indici F ed F_{ROH} [34]. Inoltre, l'uso di dati genomici consente di stimare gli effetti dovuti al campionamento mendeliano in modo più accurato e quindi migliora la stima dell'inbreeding [36]. L'uso delle sequenze di omozigosi ROH per stimare la consanguineità è stato applicato per alcuni anni a diverse specie da reddito, ad es. [37, 38], e più recentemente alle razze canine [11, 14, 33]. E' stata evidenziata da diversi autori una forte correlazione tra l' F da pedigree e F_{ROH} da dato molecolare - in bibliografia sono riportati esempi per i bovini [21, 39] -, suggerendo che l'analisi delle sequenze di omozigosi ROH può essere utilizzata efficacemente per dedurre aspetti della storia recente della popolazione anche analizzando il genoma di un numero relativamente ridotto di cani.

4.2.2 L'analisi delle sequenze di omozigosi ROH, Numero Effettivo della popolazione (Ne) e Linkage Disequilibrium (LD)

Una ridotta variabilità genetica può essere determinata da fenomeni quali: la riproduzione selettiva effettuata mediante la pratica degli accoppiamenti in inbreeding, gli effetti del fondatore dovuti ad un ridotto numero di stalloni e fattrici che hanno dato origine alla razza o l'effetto Bottle Neck dovuto all'utilizzo frequente di pochi stalloni in un ridotto periodo di tempo; la variabilità genetica risulta dunque di fondamentale importanza per la conservazione della salute genetica di una razza e per ridurre la frequenza delle malattie a base genetica [40]. Abbiamo analizzato le sequenze di omozigosi ROH, stimato il Ne ed il LD sia per la razza BRA che per tutte le razze canine del database LUPA con più di 10 individui genotipizzati, al fine di valutare i rispettivi livelli di inbreeding e per confrontarne i parametri genetici con BRA.

La copertura delle sequenze di omozigosi ROH del genoma differisce notevolmente tra le razze (Figura 1).

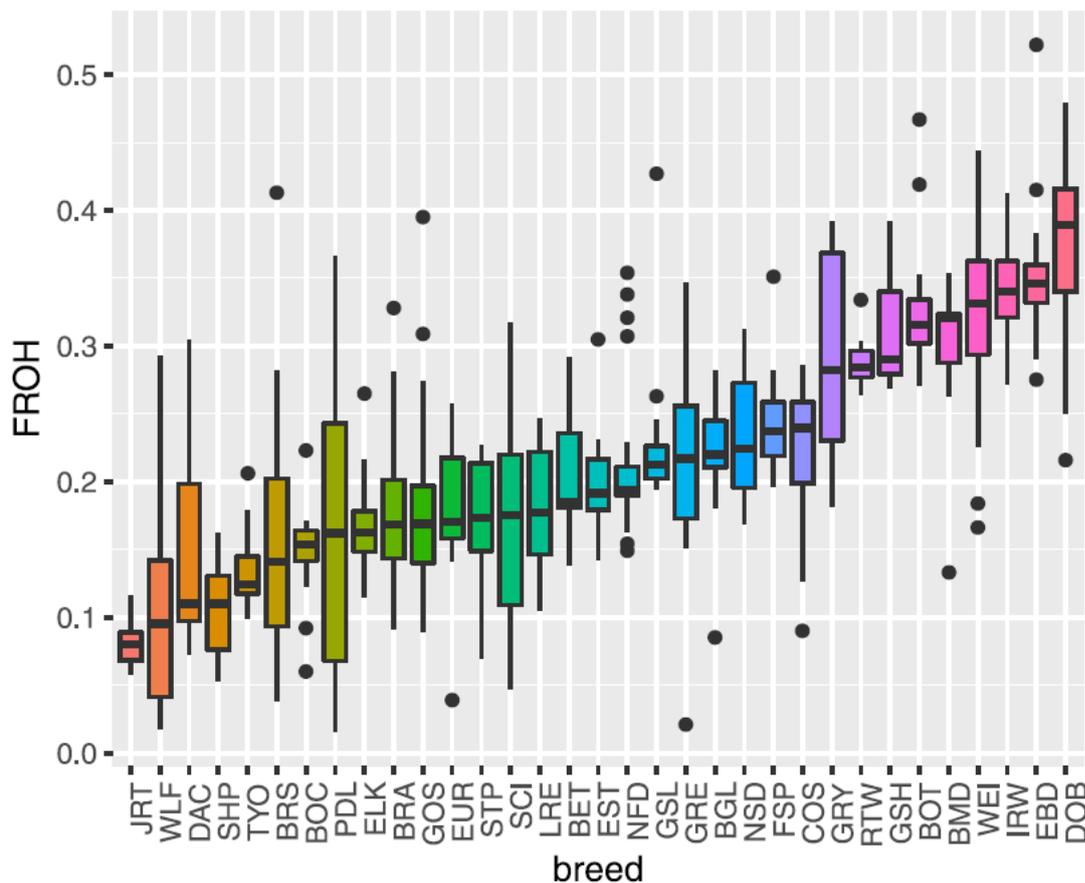


Figura 1: Distribuzione di F_{ROH} . Boxplot dei singoli valori F_{ROH} per tutte le razze canine con dimensione del campione ≥ 10 , ordinati per i valori delle mediane F_{ROH} crescenti.

Il valore della mediana di F_{ROH} più elevato tra tutte le razze è stato osservato per le razze Doberman Pinscher (DOB) (0,371) e Bulldog Inglese (EBD) (0,357). Le altre razze hanno generalmente evidenziato valori moderati di F_{ROH} , come ad es. il BRA (0,176 \pm 0,049), in un intervallo compreso tra 0,091 e 0,328. Recentemente, valori medi simili (0,17 \pm 0,02) sono stati segnalati per la razza Cane Lupo Cecoslovacco [31]. Le razze che hanno mostrato i livelli più bassi di consanguineità

includono Jack Russell Terrier (JRT) (0,080) e Shar Pei (SHP) (0,106). Mortlok et al. [11] riportano valori di F_{ROH} che variano da 0,061 in Jack Russell Terrier a 0,151 in Bulldogs, mentre Dreger et al. [10] riportano un valore di F_{ROH} medio massimo pari a 0,39 nella razza Pharaoh Hounds e valori di F_{ROH} minimo = 0,03 nella razza Mastino Abruzzese. La razza Bracco Francese Tipo Pirenei (BRA) mostra quindi livelli di consanguineità ben compresi nell'intervallo rilevato per le altre razze di canine. Come dettagliato in precedenza [41], (N_e) è un indicatore generale del rischio di erosione genetica. Il parametro indica la discrepanza tra il numero di individui di una popolazione e l'effettivo numero di individui che possono apportare variabilità genetica. Il coefficiente (N_e) può quindi fornirci una conoscenza del livello di Inbreeding nelle popolazioni per le quali i dati pedigree sono incompleti o non disponibili. (N_e) è un parametro importante in genetica di popolazione, aiuta a spiegare come si siano evolute le popolazioni, e può essere utilizzato per migliorare la comprensione e la modellizzazione dell'architettura genetica esistente all'interno di una razza alla base di caratteri complessi [42]. L'approccio genomico alla stima di (N_e) risulta molto promettente, specialmente in situazioni in cui la profondità dei dati disponibili nei pedigree è ridotta e le stime della variabilità genetica basate a partire sul pedigree risultano quindi, a causa di questa limitazione, probabilmente inaccurate. Il valore di (N_e) stimato di ciascuna delle due generazioni $(t) \in T$ in passato ($T = [13, 995]$) sono riportati in Fig 2.

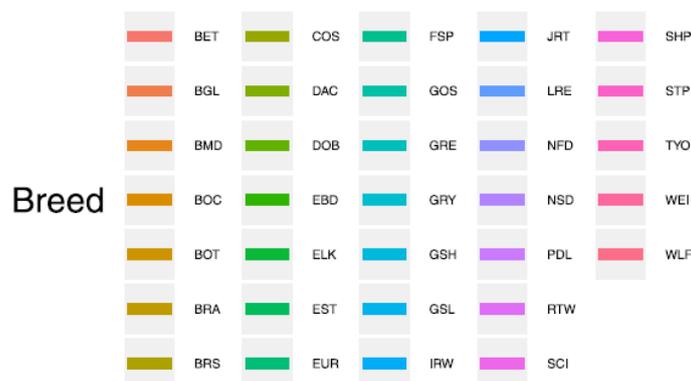
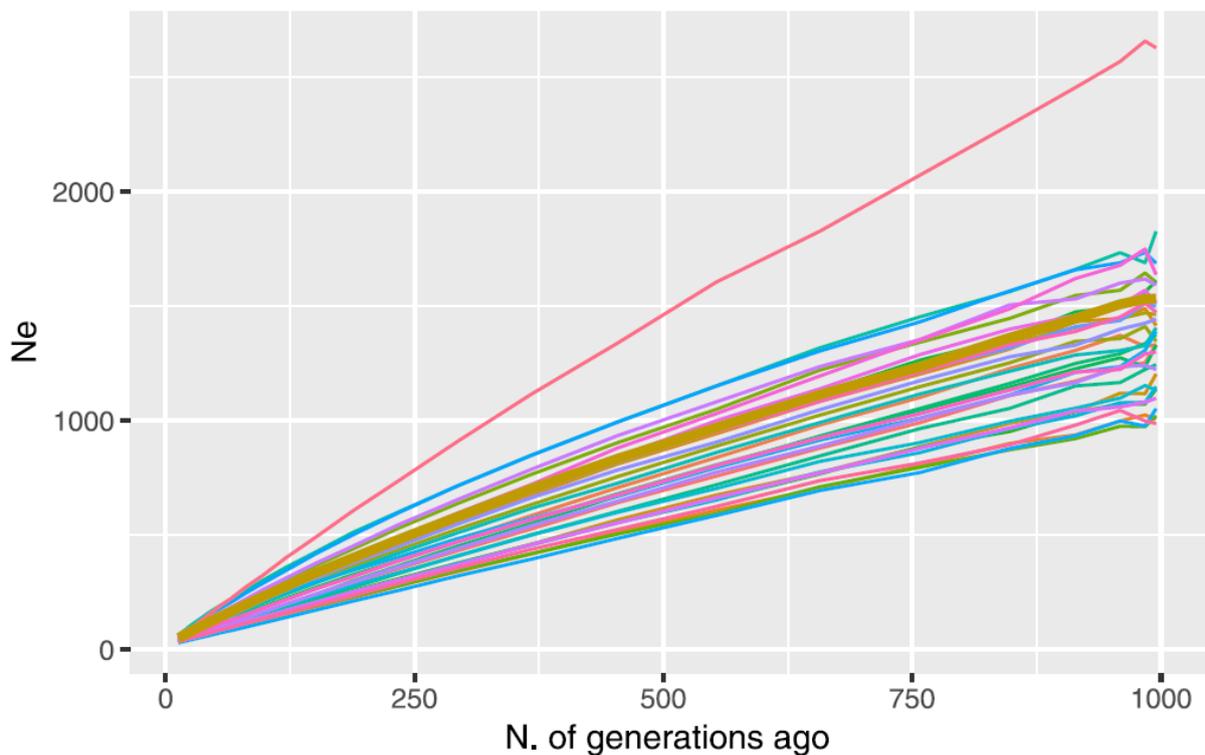


Fig 2. Media stimata del valore di Ne nel tempo. Valori (Ne) stimati per razza in funzione del numero di generazioni passate (da sinistra a destra). La linea con maggior spessore rappresenta la razza BRA Bracco Francese Tipo Pirenei.

Come atteso, è stata osservata una diminuzione progressiva del valore di (Ne) nell'arco delle diverse generazioni. La tendenza decrescente del valore di Ne è probabilmente dovuta alla selezione progressivamente sempre più stringente ed al sempre più frequente utilizzo degli stessi riproduttori scelti dai selezionatori tra quelli che presentavano le caratteristiche più ideali e che avevano le migliori prestazioni nelle gare di performance. Le stime di (Ne) hanno dimostrato che 13 generazioni fa la dimensione effettiva della popolazione era <70 per tutte le razze. Stime differenti sono state riportate da Dreger et al. [10] con valori (Ne) recenti che vanno da 71 (razza Mastino Napoletano) a 303 (razza Saluki). Gli antenati del lupo contemporaneo (WLF) hanno mostrato valori (Ne) considerevolmente più elevati in quanto non sottoposti a selezione attuata dall'uomo. Nel presente studio, per la razza BRA il valore di (Ne) recente (13 generazioni fa) e remoto (995 generazioni fa) è stato stimato essere rispettivamente di 51 e ~ 1530 . Le razze che mostravano il valore (Ne) recente più basso erano Irish Wolfhound (IRW) ($Ne = 30$) ed Eurasian (EUR) ($Ne = 31$). Quando il valore di (Ne) diminuisce, aumenta del rischio di accoppiamenti tra individui geneticamente correlati tra di loro.

Una popolazione con un valore di (Ne) inferiore a 50 può essere considerata a rischio per la sua sopravvivenza a causa degli effetti negativi della depressione da inbreeding [43]. Ciò può essere particolarmente vero nel caso di una popolazione selvatica in cui gli accoppiamenti sono casuali, ma potrebbe non essere vero nel caso in cui gli accoppiamenti sono scelti dall'uomo.

Ad esempio, il Condor della California si è ridotto 23 esemplari in tutto il mondo mantenuti in vita in cattività nei giardini zoologici fino al 1982 e successivamente è stato salvato dall'estinzione proprio grazie al mantenimento in cattività (ma con un enorme costo finanziario e una gestione molto rigorosa dell'habitat [44]). Diverse altre specie che erano ridotte a numeri ancora più bassi sono state salvate in cattività [45]. Pertanto, il valore di (Ne) stimato per la razza BRA, sebbene vicino alla soglia critica teorica di $(Ne) = 50$, può anche voler dire che la vitalità della razza non sia stata del tutto compromessa se i piani di accoppiamento futuri saranno ben gestiti evitando di accoppiare soggetti imparentati, di utilizzare frequentemente sempre gli stessi riproduttori maschi e cercando di promuovere ogni gestione della razza che possa ampliarne la variabilità genetica.

Inoltre, mentre le stime qualitative di (Ne) (spessore e modello di (Ne) nelle varie generazioni) tendono a essere piuttosto robuste, questo non è vero per le stime quantitative di (Ne).

Le stime di (Ne) risultano molto sensibili a parametri quali, la dimensione del campione, l'estensione e la metrica LD e il sistema di binning (distanze tra i locus) ed i loro valori possono cambiare drasticamente in studi diversi, soprattutto per il calcolo di (Ne) effettuato per più di 4 generazioni passate [26].

Per predire l'estensione di LD Linkage Disequilibrium è stata scelta la statistica r^2 rispetto alla stima D' . La Stime di D' tende a risultare sovrastimata nel caso di una popolazione di piccole dimensioni o con basse frequenze aploipiche [46]. Generalmente si ritiene che la statistica r^2 sia la misura più adatta di LD nel caso di marcatori biallelici e per evitare l'influenza di piccole dimensioni del campione [47]. Il decadimento LD (stimato mediante la statistica di r^2) sull'insieme di tutti e 38 gli autosomi per ciascuna delle razze del database LUPA è visualizzato in Fig. 3.

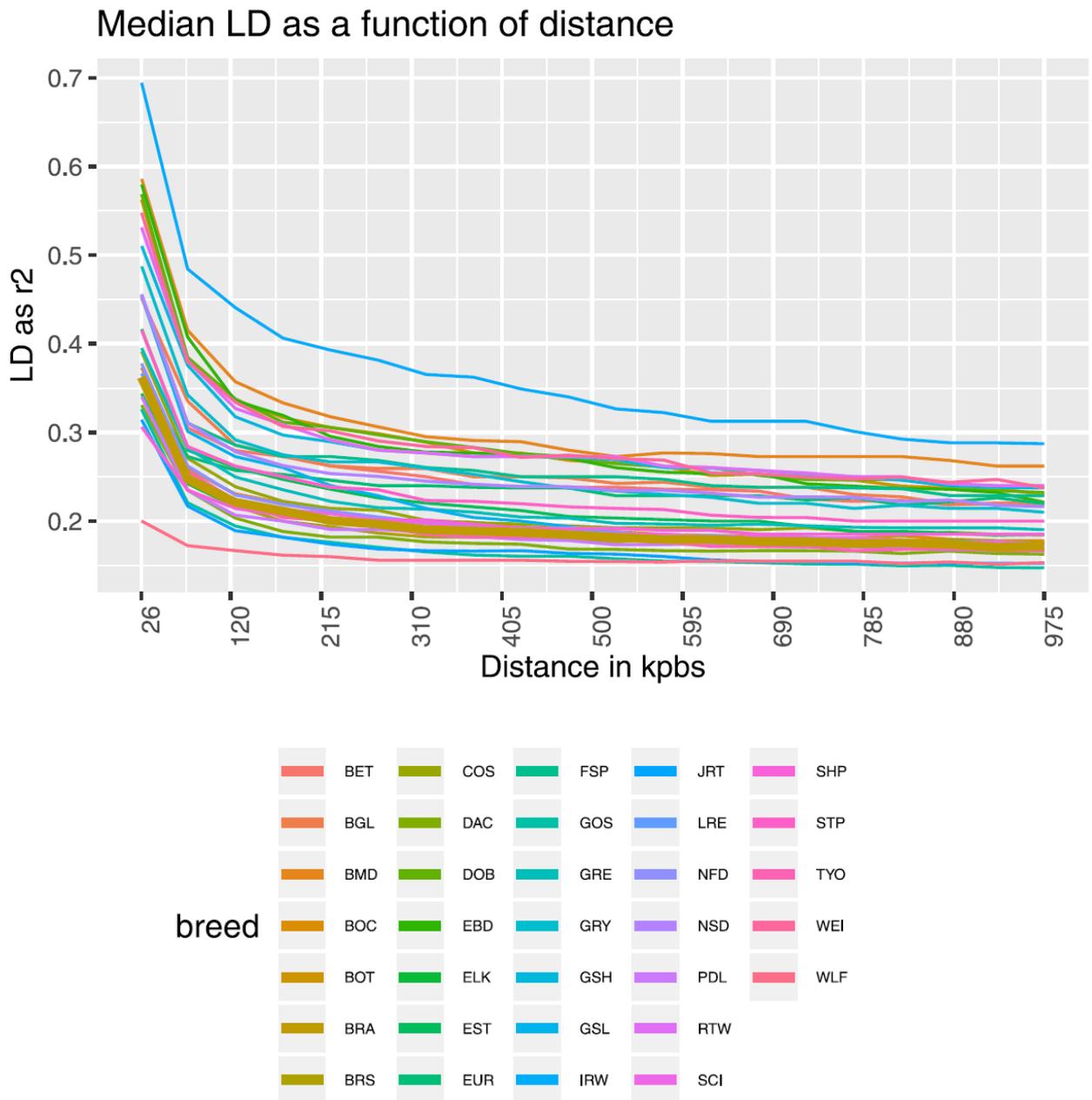


Fig 3a. Decadimento LD in funzione della distanza bps (paia di basi).

Decadimento LD per razza (rilevato mediante la statistica r^2) in funzione della distanza tra marker SNPs espressa in bps (paia di basi).

La linea più spessa rappresenta la razza BRA Bracco Francese Tipo Pirenei. Il LD genomico medio diminuisce all'aumentare della distanza genomica per tutte le razze. Sono state osservate grandi differenze tra le razze. Il LD più persistente stimato per la distanza tra marker SNPs è stato osservato nella razza Irish Wolfhound (IRW). Le popolazioni di Lupo (WLF) presentano il decadimento LD più veloce, come previsto anche per un gruppo di razze antiche [9] con valori di (N_e) elevati. In ogni caso, per i marker SNPs distanti tra di loro (650-1000 kb) il valore di LD si estende più a lungo nei lupi (WLF) rispetto alla razza Setter Gordon (GOS). Come schema generale, le differenze esistenti tra le razze diminuiscono all'aumentare della distanza tra i marker SNPs. La razza BRA ha evidenziato un decadimento LD intermedio, con una media di r^2 inferiore a 0,20 dopo 220 kb. Stern et al. [6] hanno identificato diverse distanze tra i marcatori per le quali la media r^2 è scesa al di sotto di 0,25 per tre razze canine: da 100-200 kbps nella razza Terranova, a 200-500 kbps per la razza Golden Retriever, e 0,5-1 Mb per la razza Rottweiler. La media di $r^2 < 0,1$

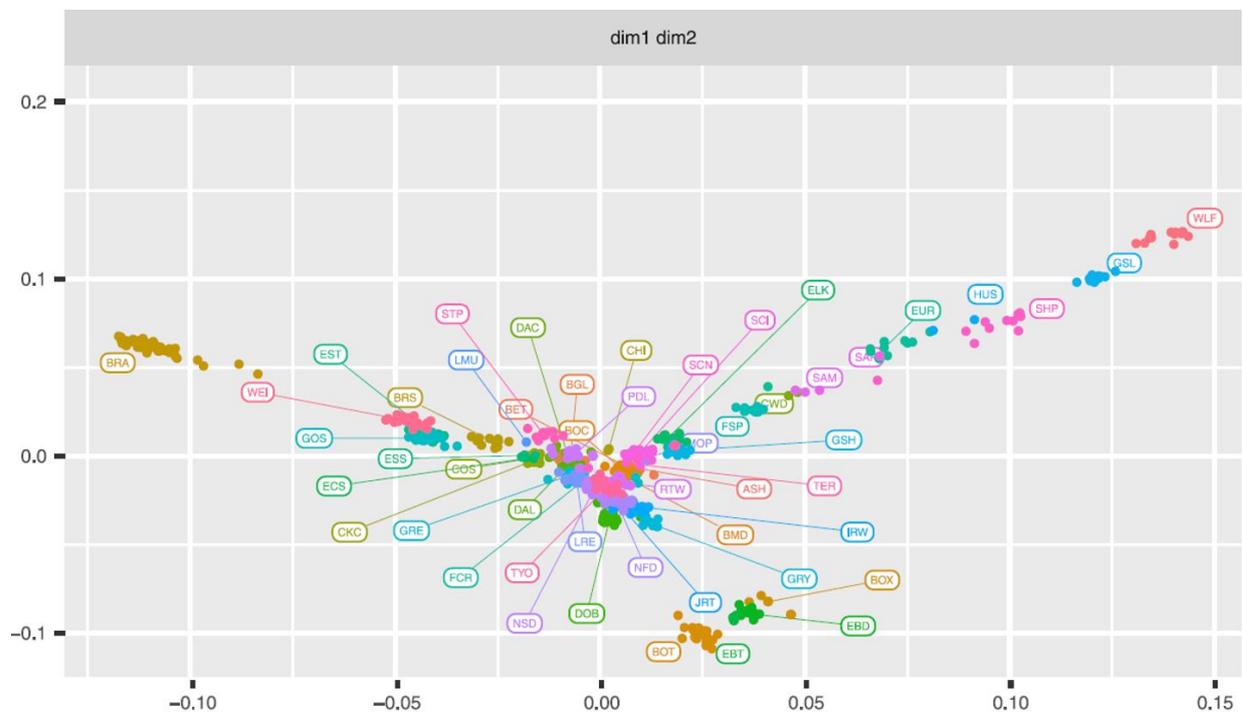
per marcatori SNPs distanti oltre 820 kbps è stata segnalata a parte nel Regno Unito per la razza Labrador Retriever [33]. La variabilità osservata nel nostro studio conferma che anche le razze di dimensioni simili e con un'architettura genetica simile effettivamente non presentano un'identica estensione del LD.

4.2.3 Relazioni Genetiche Esistenti tra Le Razze Canine FCI ed il Bracco Francese Tipo Pirenei e Struttura Genetica delle Singole Razze

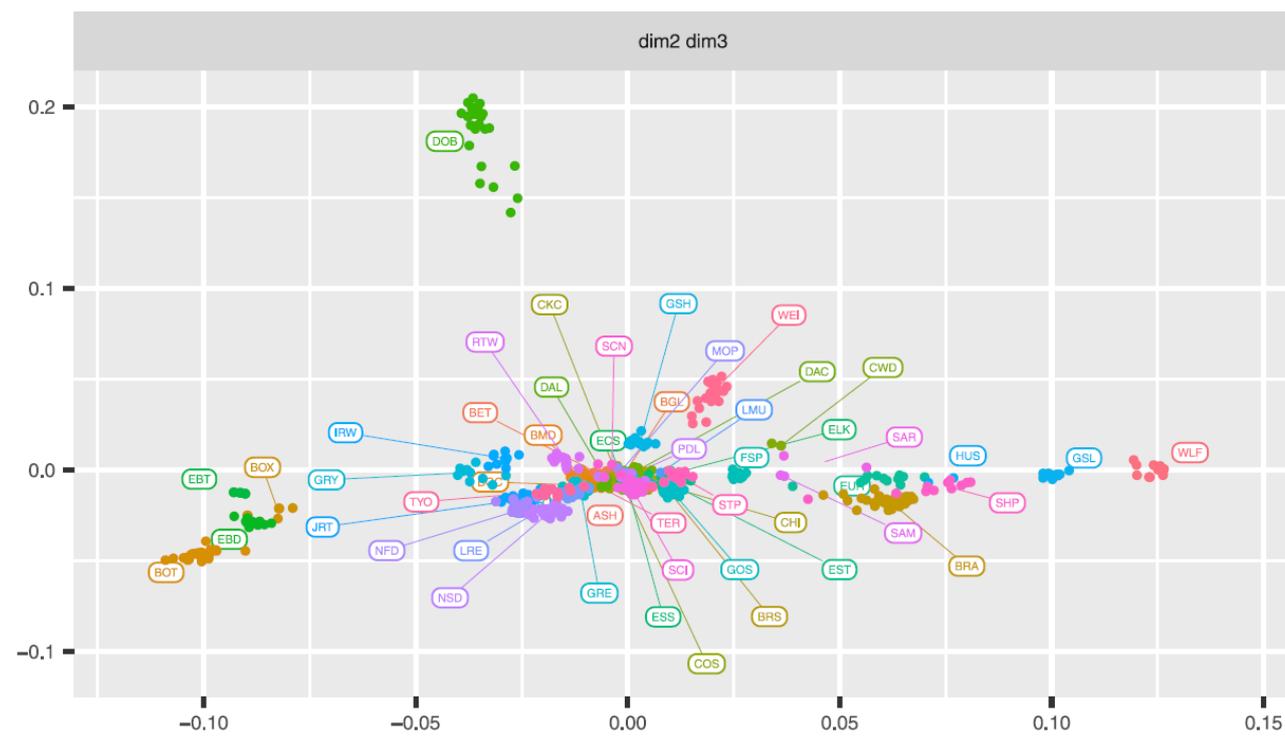
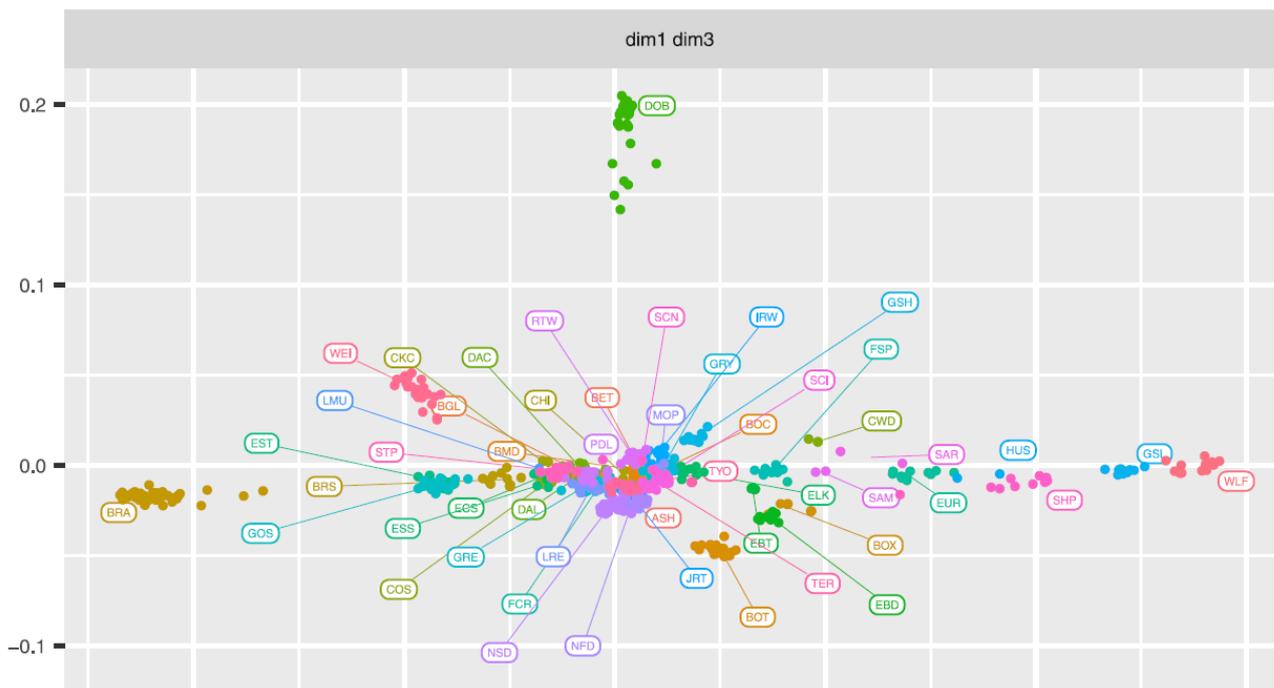
L'analisi della struttura della variabilità genetica esistente all'interno di una popolazione e le relazioni genetiche tra gli individui si sono dimostrate molto utili nelle pratiche di conservazione e gestione della variabilità genetica. Le analisi Multi Dimensionale Scaling (MDS), Il modello Bayesiano basato sulla cluster analisi, ed il Neighbor Joining sono metodiche utilizzate in questo studio per visualizzare ed esplorare le relazioni genetiche esistenti tra le razze del database LUPA ed il Bracco Francese Tipo Pirenei. Nel complesso, il BRA appare geneticamente diverso dalle altre razze canine FCI. Si ritiene che il BRA sia strettamente correlato a un certo numero di razze da ferma Inglesi e Continentali Europee. L'unica razza continentale appartenente al raggruppamento dei "Braccoidi" ovvero appartenete al Gruppo 7 "Gruppo di cani da ferma e Setter" Federation Cynologique Internationale" (FCI <http://www.fci.be/en/>) presente nella Database LUPA è il Weimaraner (WEI). Il BRA si ritiene che sia strettamente correlato al WEI con cui condivide le caratteristiche strutturali ed attitudinali per la caccia alla selvaggina da penna. Questo è supportato dalle prime due dimensioni del grafico MDS (Fig 4 a).

Fig 4 Diagramma multidimensionale di scaling (MDS) delle distanze genetiche basate sui marcatori SNPs tra le 49 razze del database LUPA ed il Bracco Francese Tipo Pirenei Le prime tre dimensioni di MDS sono mostrate in grafici a coppie. Le abbreviazioni dei nomi delle razze sono come quelle presenti in Tabella 1

(Fig 4 a)



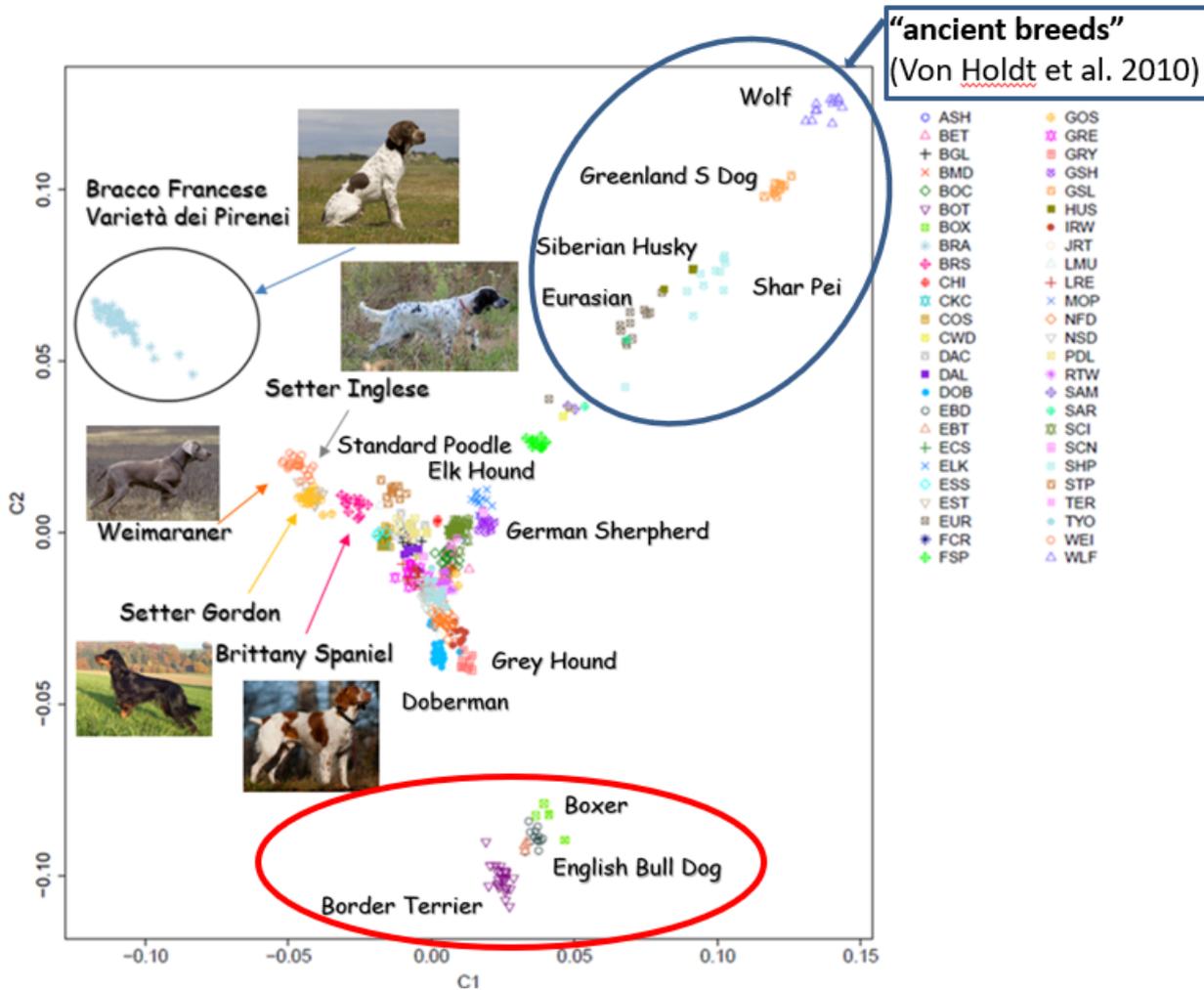
(Fig 4 b)



(Fig 4 c)

Fig 4d. Dettaglio del Diagramma Multidimensional Scaling delle distanze genetiche basate sui marcatori SNPs tra le razze FCI del database LUPA ed il Bracco Francese Tipo Pirenei.

Prime 2 dimensioni del grafico



Tuttavia, l'albero NJ ha reso evidenti relazioni strette tra BRA, Setter inglese (EST), Brittany Spaniel (BRS) e Gordon Setter (GOS), e una relazione più debole tra BRA e WEI (Fig. 5). Inizialmente, questi risultati appaiono più chiari quando si osservano dimensioni aggiuntive dal grafico MDS (Fig. 4b e figura 4 c): nell'iperspazio multidimensionale (3-D qui), BRA e WEI si raggruppavano più lontano l'uno dall'altro, mentre EST, GOS e BRS erano ancora relativamente vicini al BRA. Pur avendo una struttura anatomica completamente diversa, queste ultime razze condividono l'attitudine e le modalità di caccia con il BRA.

Si può ipotizzare che la selezione per comportamenti di caccia simili, anche in razze di diversa origine geografica e con caratteristiche anatomiche diverse, abbia contribuito alla formazione di un background genetico simile. Questi risultati sono coerenti con studi precedenti che hanno dimostrato che le razze canine con simili caratteristiche attitudinali alla caccia, come setter e spaniel, tendono a raggrupparsi geneticamente [8, 11]. Come per le altre razze FCI del dataset LUPA, l'analisi del grafico MDS (primi due assi) ha rivelato tre gruppi principali. (Fig. 4 d) In particolare, la maggior parte delle razze canine europee "moderne" risultano raggruppate insieme al centro del grafico tanto da non poter essere facilmente distinte l'una dall'altra, suggerendo un flusso genico relativamente elevato tra di loro. Le razze dell'Asia orientale (Shar-Pei (SHP), Razze

dell'Artico (GSL), Siberian Husky (HUS) e Samoiedo (SAM), insieme al Cane Lupo Cecoslovacco (CWD), Eurasian (EUR), Saarloos (SAR) e la razza Spitz finlandese (FSP) costituivano un gruppo distinto dalla maggior parte delle razze europee. Alcune di queste razze divergenti (SHF e HUS) sono state individuate e definite collettivamente "razze antiche" (Fig. 4 d) [1]. Ancora, la (Fig. 4 d) evidenzia anche come queste razze sembrano essere più vicine ai lupi, che si raggruppano indipendentemente, in accordo con i risultati precedenti [8-10]. Di fatto, la mancanza osservata di mescolanza con i lupi è coerente con i rigidi schemi selettivi delle razze canine, poiché le razze moderne sono il prodotto di pratiche di allevamento altamente controllate [1]. Inoltre, il secondo asse MDS sembra separare Border Terrier (BOT), Boxer (BOX), English Bull Terrier (EBT) e English Bulldog (EBD) da altre razze europee. Come già sottolineato in precedenti studi basati su chip SNPs a media densità [1], è stata osservata la mancanza di un gradiente geografico chiaro nella variabilità genetica molecolare. Tutti i cani sono stati assegnati con la più alta probabilità alla razza da cui sono stati campionati: come riportato da Vaysse et al. [8] questo dimostra che le razze moderne costituiscono essenzialmente un pool genico chiuso e che si sono originate da riduzioni drastiche della variabilità genetica o Bottle Neck verificatisi nelle popolazioni canine ancestrali.

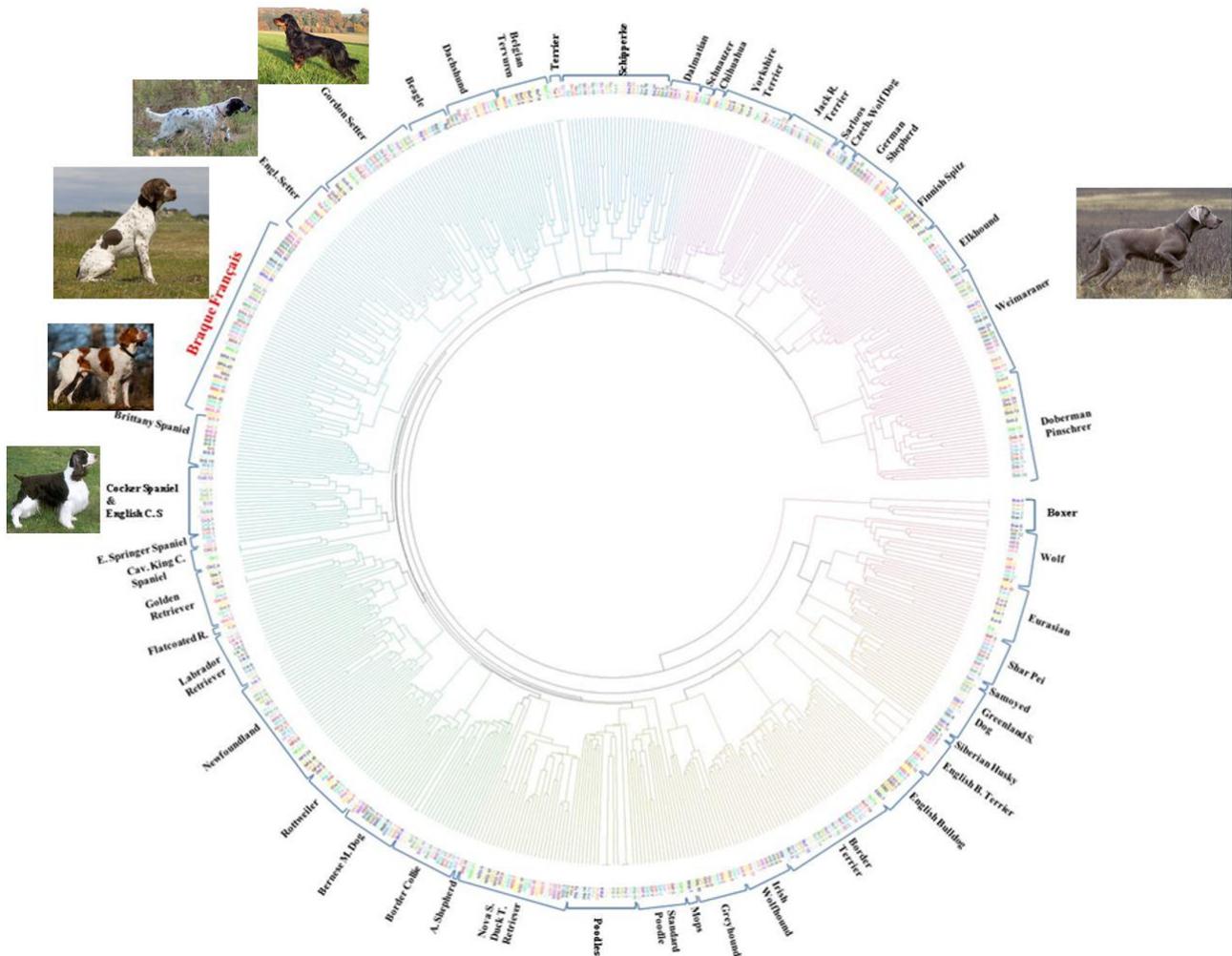


Fig. 5. Albero Neighbor-joining (NJ). Visualizzazione delle distanze genetiche basate sui marcatori SNPs tra le razze del database LUPA ed il Bracco Francese Tipo Pirenei.

La struttura della variabilità genetica delle razze canine allo studio è stata ulteriormente esaminata variando il numero di antenati (K) in un algoritmo di clustering bayesiano (Fig. 6).

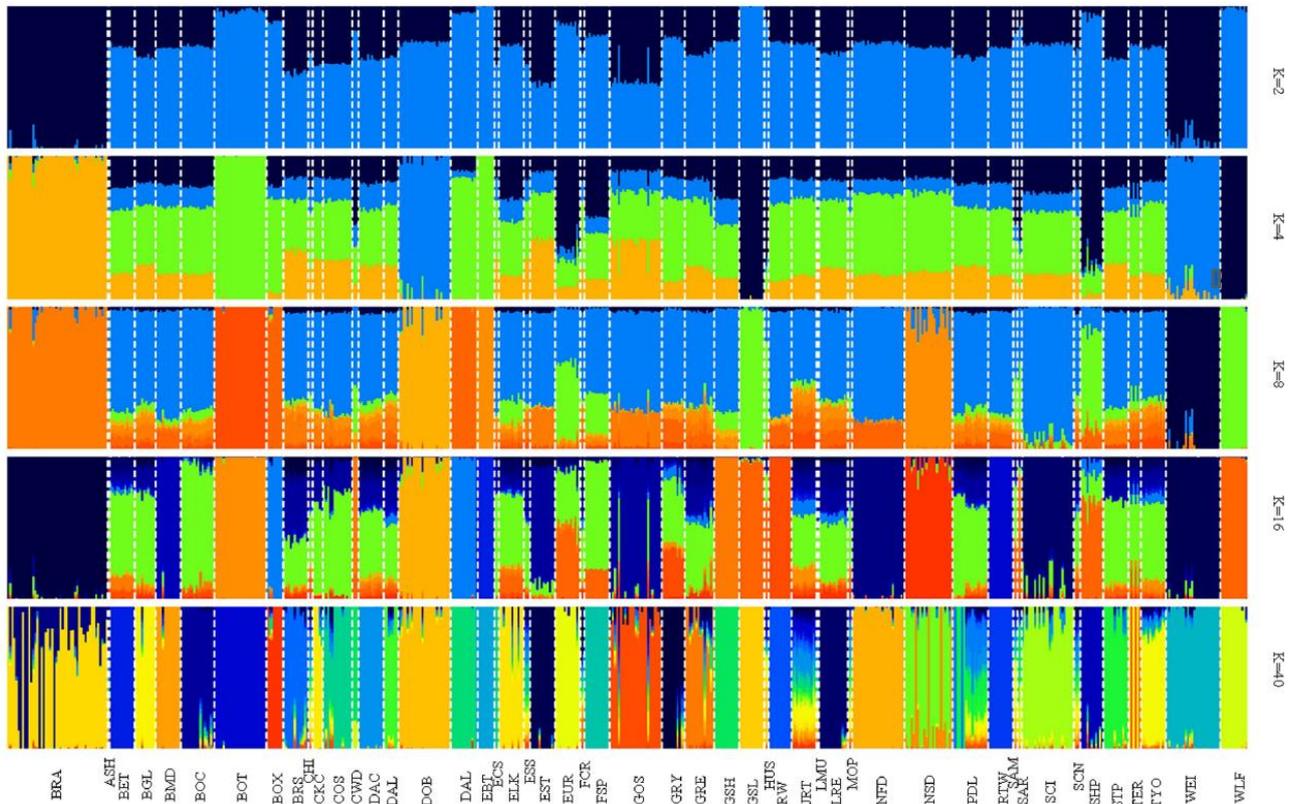


Fig 6. Struttura della variabilità genetica delle razze canine BRA Bracco Francese Tipo Pirenei e delle 49 razze canine LUPA. Cluster bayesiano da ADMIXTURE con valori variabili per il parametro K ($K \in 2, 4, 8, 16, 40$).

Il primo cluster ($K = 2$) riflette la separazione del Lupo (WLF) dalle razze di cane domestico. Al cluster 4 $K = 4$, abbiamo osservato una forte differenziazione genetica tra BRA e le altre razze di cane e questo è stato evidenziato anche a valori K superiori. Con lo stesso valore K, le razze Border Terrier (BOT), English Bull Terrier (EBT) e Groenlandia Sledge Dog (GSL) si differenziano rispetto alle altre razze. Il numero più probabile di popolazioni presenti nel campione totale, come suggerito dalla procedura di convalida incrociata di ADMIXTURE è $K = 40$. A questo valore K, generalmente si osserva un cluster distinto per ogni razza canina, sebbene con alcune differenze. In effetti, alcune razze quali (Jack Russell Terrier (JRT), Poodles (PDL)) insieme a BRA hanno reso evidenti cluster meno distinti. Questo risultato è in linea con le informazioni storiche disponibili su BRA, suggerendo che questa razza potrebbe scaturire da un mix di popolazioni ancestrali canine europee con attitudine alla ferma europea “Chiens d’oiseaux ou epagneuls” Livre de Chasse. Mano a mano che K aumenta, le razze vengono progressivamente assegnate a gruppi separati e ben distinti. In generale, l’analisi di ADMIXTURE riproduce le distanze tra le razze trovate nel grafico MDS e nell’albero NJ. Il BRA risulta altamente differenziato e presenta solo bassi livelli di mescolanza con altre razze. Quanto osservato potrebbe essere correlato ad una combinazione di 2 fattori: a) è una razza di piccole dimensioni rispetto ad altre quali ad es. il Setter Inglese, b) è una razza geneticamente isolata dalle altre razze.

Il motivo esatto per cui il BRA è così divergente da tutte le altre razze FCI del database LUPA non è ancora chiaro. Sulla base dei risultati ottenuti da questo progetto di ricerca, nessuna delle principali razze canine sembra aver avuto un ruolo importante nella costituzione della razza BRA.

Questa condizione contribuisce a sostenere l'ipotesi secondo la quale la razza Bracco Francese Tipo Pirenei possa aver avuto origine da popolazioni di cani da ferma originarie molti secoli fa delle regioni a sud ovest dell'attuale territorio nazionale francese. Ulteriori studi che includano altre razze appartenenti al raggruppamento dei "Braccoidi", ed in particolare il Bracco Francese Tipo Gascogne, sarebbero di fondamentale importanza per svelare l'origine del BRA Tipo Pirenei. Nondimeno, la caratterizzazione della variabilità genetica condotta sull'intero genoma effettuata con la presente ricerca fornisce una visione completa ed approfondita della variabilità genomica della razza Bracco Francese Tipo Pirenei.

4.3 CONCLUSIONI

Questo progetto di ricerca costituisce il primo studio della struttura genetica della razza Bracco Francese Tipo Pirenei a livello genomico.

Esaminando la variabilità genetica all'interno della razza, il BRA, rispetto alle altre razze canine FCI considerate nello studio, si evidenzia un inbreeding stimato a livello molecolare e un'estensione del Linkage Disequilibrium inferiori rispetto alla media ed una dimensione del (N_e) superiore alla media.

Analizzando la variabilità genetica tra le diverse razze il BRA ha dimostrato una chiara differenziazione genetica, rispetto a tutte le altre razze del Database LUPA confermando in tal modo le informazioni storiche disponibili che suggeriscono come il BRA sia originato da antiche popolazioni di cani da ferma provenienti dal sud ovest dell'attuale Francia.

Monitorare l'inbreeding e la variabilità genetica è importante per ridurre l'incidenza di malattie ereditarie e mantenere la salute genetica generale della razza. Pertanto, considerando che la variabilità genetica è un fattore intrinseco che influenza la capacità adattativa e la resilienza delle popolazioni, gli approcci genomici delineati rappresentano strumenti utili per l'implementazione di strategie di accoppiamento e selezione attentamente pianificate all'interno delle razze stesse.

Questi risultati hanno inoltre suggerito che l'uso combinato di dati genomici e di pedigree possano costituire una valida opzione per la selezione di linee che minimizzino il tasso di inbreeding per generazione. Gli allevatori devono essere consapevoli dei rischi associati all'eccesso di inbreeding (consanguineità) e delle opportunità offerte dalla genomica, per poter progettare piani di accoppiamento che favoriscano e mantengano la variabilità genetica nella razza Bracco Francese Tipo Pirenei.

5.4 BIBLIOGRAFIA

1. Pollinger JP, Lohmueller KE, Han E, Parker HG, Quignon P, Degenhardt JD, et al. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*. 2010; 464 (7290):898. <https://doi.org/10.1038/nature08837> PMID: 20237475
2. Clutton-Brock J. A natural history of domesticated mammals. Cambridge University Press; 1999.
3. Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 2005; 438(7069):803. <https://doi.org/10.1038/nature04338> PMID: 16341006
4. Parker HG. Genomic analyses of modern dog breeds. *Mammalian genome*. 2012; 23(1-2):19–27. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9387-6> PMID: 22231497
5. Meadows JR, Chan EK, Kijas JW. Linkage disequilibrium compared between five populations of domestic sheep. *BMC genetics*. 2008; 9(1):61. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-61> PMID: 18826649
6. Stern JA, White SN, Meurs KM. Extent of linkage disequilibrium in large-breed dogs: chromosomal and breed variation. *Mammalian genome*. 2013; 24(9-10):409–415. <https://doi.org/10.1007/s00335-013-9474-y> PMID: 24062056
7. Groeneveld L, Lenstra J, Eding H, Toro M, Scherf B, Pilling D, et al. Genetic diversity in farm animals—a review. *Animal Genetics*. 2010; 41:6–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02038.x> PMID: 20500753
8. Vaysse A, Ratnakumar A, Derrien T, Axelsson E, Pielberg GR, Sigurdsson S, et al. Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS genetics*. 2011; 7(10):e1002316. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002316> PMID: 22022279
9. Pilot M, Malewski T, Moura AE, Grzybowski T, Oleński K, Ruśc A, et al. On the origin of mongrels: evolutionary history of free-breeding dogs in Eurasia. *Proc R Soc B*. 2015; 282(1820):20152189. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2189> PMID: 26631564
10. Dreger DL, Davis BW, Cocco R, Sechi S, Di Cerbo A, Parker HG, et al. Commonalities in development of pure breeds and population isolates revealed in the genome of the sardinian Fonnì's Dog. *Genetics*. 2016; 204(2):737–755. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.192427> PMID: 27519604
11. Mortlock SA, Khatkar MS, Williamson P. Comparative analysis of genome diversity in bullmastiff dogs. *PLoS One*. 2016; 11(1):e0147941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147941> PMID: 26824579
12. Parker HG, Dreger DL, Rimbault M, Davis BW, Mullen AB, Carpintero-Ramirez G, et al. Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration, and hybridization on modern dog breed development. *Cell reports*. 2017; 19(4):697–708. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.079> PMID: 28445722
13. ANTHENAISE Cd, LONGEVIALLE Cd. *Le Livre de Chasse de Gaston Phe'bus*. Bibliothe'que de l'image, Paris; 2002.
14. Mastrangelo S, Biscarini F, Auzino B, Ragatzu M, Spaterna A, Ciampolini R. Genome-wide diversity and runs of homozygosity in the “Braque Franc,ais, type Pyre'ne'es” dog breed. *BMC research notes*. 2018; 11(1):13. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3112-9> PMID: 29316964
15. Mrode RA. *Linear models for the prediction of animal breeding values*. Cabi; 2014.
16. Wright S. Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist*. 1922; 56(645):330–338. <https://doi.org/10.1086/279872>
17. Coster A. pedigree: Pedigree functions; 2013. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=pedigree> = pedigree.

18. VanLiere JM, Rosenberg NA. Mathematical properties of the r^2 measure of linkage disequilibrium. *Theoretical population biology*. 2008; 74(1):130–137. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2008.05.006> PMID: 18572214
19. Sved J. Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theoretical population biology*. 1971; 2(2):125–141. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(71\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0040-5809(71)90011-6) PMID: 5170716
20. Bjelland D, Weigel K, Vukasinovic N, Nkrumah J. Evaluation of inbreeding depression in Holstein cattle using whole-genome SNP markers and alternative measures of genomic inbreeding. *Journal of Dairy Science*. 2013; 96(7):4697–4706. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6435> PMID: 23684028
21. Purfield DC, Berry DP, McParland S, Bradley DG. Runs of homozygosity and population history in cattle. *Bmc Genetics*. 2012; 13(1):70. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-70> PMID: 22888858
22. Yang J, Lee SH, Goddard ME, Visscher PM. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *The American Journal of Human Genetics*. 2011; 88(1):76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.011> PMID: 21167468
23. VanRaden PM. Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of dairy science*. 2008; 91 (11):4414–4423. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980> PMID: 18946147
24. Alexander DH, Lange K. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC bioinformatics*. 2011; 12(1):246. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-246> PMID:21682921
25. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*. 2015; 4(1):7. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8> PMID: 25722852
26. Barbato M, Orozco-terWengel P, Tapio M, Bruford MW. SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. *Frontiers in genetics*. 2015; 6:109. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00109> PMID: 25852748
27. Team RC, et al. R: A language and environment for statistical computing. 2013;.
28. Wickham H. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer; 2016.
29. Paradis E, Claude J, Strimmer K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 2004; 20(2):289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412> PMID: 14734327
30. Shariflou MR, James JW, Nicholas FW, Wade CM. A genealogical survey of Australian registered dog breeds. *The Veterinary Journal*. 2011; 189(2):203–210. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.06.020> PMID: 21741282
31. Caniglia R, Fabbri E, Hulva P, Bolfi'kova' BČ, Jindřichova' M, Stronen AV, et al. Wolf outside, dog inside? The genomic make-up of the Czechoslovakian Wolfdog. *BMC genomics*. 2018; 19(1):533. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4916-2> PMID: 30005602
32. Kardos M, Luikart G, Allendorf F. Measuring individual inbreeding in the age of genomics: markerbased measures are better than pedigrees. *Heredity*. 2015; 115(1):63. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.17> PMID: 26059970
33. Wiener P, Sa'nchez-Molano E, Clements DN, Woolliams JA, Haskell MJ, Blott SC. Genomic data illuminates demography, genetic structure and selection of a popular dog breed. *BMC genomics*. 2017; 18 (1):609. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3933-x> PMID: 28806925
34. Zanella R, Peixoto JO, Cardoso FF, Cardoso LL, Biegelmeier P, Cantão ME, et al. Genetic diversity analysis of two commercial breeds of pigs using genomic and pedigree data. *Genetics Selection Evolution*. 2016; 48(1):24. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0203-3>
35. Zhang Q, Calus MP, Guldbandsen B, Lund MS, Sahana G. Estimation of inbreeding using pedigree, 50k SNP chip genotypes and full sequence data in three cattle breeds. *BMC genetics*. 2015; 16(1):88. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0227-7> PMID: 26195126

36. Daetwyler HD, Villanueva B, Bijma P, Woolliams JA. Inbreeding in genome-wide selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2007; 124(6):369–376. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2007.00693.x> PMID: 18076474
37. Bosse M, Megens HJ, Madsen O, Crooijmans RP, Ryder OA, Austerlitz F, et al. Using genome-wide measures of coancestry to maintain diversity and fitness in endangered and domestic pig populations. *Genome Research*. 2015;. <https://doi.org/10.1101/gr.187039.114> PMID: 26063737
38. Mastrangelo S, Tolone M, Sardina MT, Sottile G, Sutura AM, Di Gerlando R, et al. Genome-wide scan for runs of homozygosity identifies potential candidate genes associated with local adaptation in Valle del Belice sheep. *Genetics Selection Evolution*. 2017; 49(1):84. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0360-z>
39. Ferenčaković M, Hamzić E, Gredler B, Solberg T, Klemetsdal G, Curik I, et al. Estimates of autozygosity derived from runs of homozygosity: empirical evidence from selected cattle populations. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2013; 130(4):286–293. <https://doi.org/10.1111/jbg.12012> PMID: 23855630
40. Mortlock SA, Booth R, Mazrier H, Khatkar MS, Williamson P. Visualization of genome diversity in german shepherd dogs. *Bioinformatics and Biology insights*. 2015; 9:BBI–S30524.
41. Makina SO, Taylor JF, van Marle-Koester E, Muchadeyi FC, Makgahlela ML, MacNeil MD, et al. Extent of linkage disequilibrium and effective population size in four South African Sanga cattle breeds. *Frontiers in genetics*. 2015; 6:337. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00337> PMID: 26648975
42. Hayes BJ, Visscher PM, McPartlan HC, Goddard ME. Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome research*. 2003; 13(4):635–643. <https://doi.org/10.1101/gr.387103> PMID: 12654718
43. Jamieson IG, Allendorf FW. How does the 50/500 rule apply to MVPs? *Trends in Ecology & Evolution*. 2012; 27(10):578–584. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.001>
44. Ralls K, Ballou JD. Genetic status and management of California condors. *The Condor*. 2004; 106 (2):215–228. <https://doi.org/10.1650/7348>
45. Frankham R. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular ecology*. 2008; 17(1):325–333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03399.x> PMID: 18173504
46. McRae A, McEwan J, Dodds K, Wilson T, Crawford A, Slate J. Linkage disequilibrium in domestic sheep. *Genetics*. 2002; 160(3):1113–1122. PMID: 11901127
47. Khatkar MS, Nicholas FW, Collins AR, Zenger KR, Cavanagh JA, Barris W, et al. Extent of genomewide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC genomics*. 2008; 9(1):187. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-187> PMID: 18435834
48. Gibson J, Morton N, Collins A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet*. 2006;15:789–95.
49. Keller MC, Visscher PM, Goddard ME. Quantification of inbreeding due to distant ancestors and its detection using dense single nucleotide polymorphism data. *Genetics*. 2011;189:237–49.
50. Szmatała T, Gurgul A, Ropka-Molik K, Jasielczuck I, Zabek T, Bugno-Poniewierska M. Characteristics of runs of homozygosity in selected cattle breeds maintained in Poland. *Livest Sci*. 2016;72-88.
51. Zavarez LB, Utsunomiya YT, Carmo AS, Neves HH, Carvalheiro R, Ferenčaković M, et al. Assessment of autozygosity in Nellore cows (*Bos indicus*) through high-density SNP genotypes. *Front Genet*. 2015;6:5.
52. Marras G, Gaspa G, Sorbolini S, Dimauro C, Ajmone-Marsam P, Valentini A, et al. Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy. *Anim Genet*. 2014;46:110–21.

53. Mastrangelo S, Tolone M, Di Gerlando R, Fontanesi L, Sardina MT, Portolano B. Genomic inbreeding estimation in small populations: evaluation of runs of homozygosity in three local dairy cattle breeds. *Animal*. 2016;10:746-54.
54. Silió L, Rodríguez MC, Fernández A, Barragán C, Benítez R, Óvilo C et al. Measuring inbreeding and inbreeding depression on pig growth from pedigree or SNP-derived metrics. *J Anim Breed Genet*. 2013;130:349–60.

5 RILEVAMENTO NELL'INTERO GENOMA DEL BRACCO FRANCESE TIPO PIRENEI DELLE COPY NUMBER VARIATIONS UTILIZZANDO GLI ARRAY DI GENOTIPIZZAZIONE SNP

Autori: Dr. Rosalia Di Gerlando, Dr. Salvatore Mastrangelo, Dr. Maria Teresa Sardina, Prof. Baldassare Portolano, Dr. Filippo Biscarini, Prof. Roberta Ciampolini

L'addomesticamento del cane è iniziato circa 15.000 anni fa [1] ed ha determinato a una straordinaria quantità di morfologie e funzioni. La specie canina, con la grande variabilità biologica che la contraddistingue, costituisce un modello per affrontare studi sulla genetica di popolazione e sull'analisi della variabilità genetica alla base della variabilità fenotipica, con particolare attenzione, alle malattie a base genetica, molte delle quali risultano simili alle malattie umane [2]. Con il completamento dell'assemblaggio del genoma canino, le tecnologie di sequenziamento e la genotipizzazione ad alto rendimento hanno offerto un grande potenziale per aumentare la nostra comprensione della variabilità genetica alla base della variabilità fenotipica del cane. I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) sono stati utilizzati per studiare i modelli di variabilità genetica all'interno e tra le razze, per esaminare la correlazione tra le razze ed identificare le impronte impresse sul genoma dalla selezione "*selection signatures*" [3]. Oltre ai marcatori genomici SNP, esistono altri componenti della variabilità genomica canina, come le *variazioni del numero di copie* (CNV). Queste costituiscono importanti fonti di variabilità genetica e fenotipica nelle specie appartenenti al raggruppamento dei mammiferi. I CNV sono stati identificati nel genoma umano [4] e nei genomi di diverse specie da reddito, come ad es. bovini [5-6], pecore [7], maiali [8]. Numerosi studi sono stati condotti anche sul cane [2,9,10,11] e alcuni hanno dimostrato l'utilità dell'array Canine HD nel rilevamento di CNV [12]. Tuttavia, molte razze canine rimangono ancora non caratterizzate, poiché la distribuzione dei CNV non è stata ancora analizzata nel loro genoma, come ad esempio nel Bracco Francese Tipo Pirenei (BRA). I BRA sono cani intelligenti, agili con un buon carattere, selezionati per la cerca, la ferma ed il riporto della selvaggina. Sull'origine del BRA notizie storiche avvalorano l'ipotesi che questa razza è stata costituita prima che iniziassero le registrazioni dei pedigree negli Stud Books alla metà del 1800[13-14]. I BRA sono noti per essere eccellenti cani da caccia particolarmente abili nella caccia alla beccaccia (Figura 1). Nel tentativo di indagarne più a fondo il genoma mediante CNV, abbiamo usato un array genome-wide ad alta densità (170K) per rilevare CNV già noti e nuovi per il Bracco Francese Tipo Pirenei.

5.1 MATERIALI E METODI

5.1.1 Campionamento e Genotipizzazione

Il Club Italiano Bracco Francese (C.I.B.F.) ha reso possibile il campionamento di 48 cani non imparentati tra di loro (27 femmine, 21 maschi), provenienti da aree di allevamento diverse situate in regioni diverse del territorio Nazionale affinché potessero risultare rappresentativi della variabilità genetica presente all'interno della razza. I cani sono stati campionati in occasione dei raduni e delle prove di performances indette dal (C.I.B.F.) a livello Nazionale. Nel contesto dei campionamenti i proprietari hanno volontariamente permesso il prelievo del sangue dai cani scelti per il presente studio ed il Presidente del Club (C.I.B.F.) ne ha ottenuto il consenso informato. Nessun cane ha subito violenza. Il DNA genomico (gDNA) è stato estratto dai campioni di sangue mediante il QIAmp DNA Mini Kit QIAGEN. La concentrazione del DNA di ciascun campione è stata portata ad una concentrazione standard di 50 ng / μ L. Tutti i 48 cani campionati sono stati genotipizzati mediante l'Illumina CanineHD BeadChip, contenente 173.662 SNP. La genotipizzazione è stata effettuata nei laboratori del "*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali*", Università di Palermo.

5.1.2 Individuazione delle Copy Number Variation

I CNV sono stati rilevati dai dati HD SNP utilizzando gli algoritmi implementati in PennCNV e nel Copy Number Number Module (CNAM) di SVS 8.7.0. Software. Questi algoritmi sono stati sviluppati per l'analisi CNV dai dati dell'array SNP [6,15,16]. Per maggiori dettagli sui criteri di qualità utilizzati nel rilevare i CNV con i due algoritmi, vedi Di Gerlando et al., [6]. Le regioni CNV (CNVR) sono state determinate aggregando i CNV sovrapposti identificati in tutti i campioni [4]. Le regioni sovrapposte sono state calcolate utilizzando BEDTools [17]. I CNVR ottenuti da PennCNV e SVS sono stati determinati intersecando i set di dati ed inferendo i CNVR sovrapposti utilizzando l'approccio descritto da Wain et al., [18], che identifica i CNVR che si sovrappongono completamente. La localizzazione genomica degli SNPs sui cromosomi è stata ottenuta a partire dall'assemblaggio delle sequenze genomiche CanFam3.1. Dopo l'esclusione degli SNPs che risultavano mappati sugli Autosomi, per lo studio si è utilizzato un totale di 167.183 markers SNPs.

5.1.3 Contenuti Genici ed Annotazioni Funzionali

Il contenuto genico dei CNVR è stato valutato sulla base di CanFam 3.1 nel browser del genoma di Genome Data Viewer dal database del Centro nazionale per le informazioni sulle biotecnologie (NCBI) degli Stati Uniti (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=genome&acc=GCF_000002285.3). E' stato utilizzato il software g: GOST di g dal Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/index.cgi>) per le analisi di Gene Ontology (GO), mentre l'analisi del pathway si è basata sul database delle annotazioni KEGG. I risultati sono stati corretti per test multipli usando g: FDR.

5.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

5.2.1 Individuazione delle Copy Number Variation e delle Copy Number Variation Regions

Dopo aver utilizzato filtri di qualità rigorosi, sono state condotte analisi CNV su tutto il genoma su 26 campioni di BRA. In questo modo abbiamo filtrato la maggior parte dei dati che potenzialmente avrebbero determinato un rumore di fondo e ridotto l'affidabilità dei CNV destinati allo studio [19]. Tuttavia, il numero finale di campioni di BRA è risultato comunque più elevato rispetto al numero di campioni utilizzati in altri studi [12]. Utilizzando PennCNV, è stato rilevato un totale di 1.047 CNV (Tabella Supplementare S1: CNVs_Penn), presentanti una lunghezza media di 107.123 kb e un numero medio di 40.3 CNV per cane analizzato. La segmentazione univariata della CNS della SVS ha identificato 1.638 CNV (tabella supplementare S1: CNVs_SVS) con una lunghezza media di 110,41 kb e un numero medio di 63 CNV per campione. Aggregando i CNV sovrapposti da PennCNV, sono stati identificati un totale di 181 CNVR (Supplementary Table S1: CNVRs_Penn). La copertura totale autosomica di CNVR è di 15,75 Mb, corrispondente allo 0,7% del genoma autosomico canino. I CNV identificati con SVS sono stati aggregati in 280 CNVR (Supplementary Table S1: CNVR_SVS), che coprono 24.11 Mb, corrispondenti all'1,1% del genoma autosomico canino. Le differenze nel numero di CNV e CNVR rilevate dai due algoritmi erano probabilmente attribuibili all'identificazione di CNV più lunghi con l'approccio SVS univariato [19]. Intersecando i due dataset CNVR (ottenuti dai due software PennCNV e SVS) sono stati ottenuti un totale di 45 CNVR (Supplementary Table S1: CNVR_Penn_vs_SVS), distribuiti sui 38 autosomi. I CNVR di PennCNV che non si sovrapponevano completamente ai risultati SVS sono stati esclusi e viceversa. Tale strategia, in cui l'elenco finale dei CNVR stringenti viene ottenuta da entrambi gli algoritmi, è stata raccomandata in studi precedenti per ridurre il tasso di false individuazioni di CNVR [20]. Tra i CNVR scelti con rigore, 42 CNVR sono stati definiti come delezioni pure e solo 3 come perdita / guadagno, il che significa che sono state osservate sia le cancellazioni che le duplicazioni. La lunghezza di questi CNVR varia da 3,5 kb a 458,716 kb con una dimensione media di 87,92 kb. In particolare, il 49% dei CNVR presentano dimensioni inferiori a 50 kb, il 18% nell'intervallo 50-100 kb e il 33% risulta maggiore di 100 kb. Molin et al. utilizzando l'array CanineHD per 26 razze canine, riportano valori diversi, [12] individuando una percentuale più alta di CNVR (64%) nel range di taglia compreso tra 100 kb - 1 Mb.

5.2.2 Comparazione con le Copy Number Variation Regions pubblicate

Per una corretta interpretazione, i nostri risultati sono stati confrontati con i CNVR canini presenti nella letteratura disponibile. A tal fine, abbiamo convertito le posizioni della mappa di 45 CNVRs nella versione precedente del genoma canino (CamFam 2.0). Confrontando i CNVR in BRA con i CNVR precedentemente identificati nel cane, abbiamo rilevato il 64% (29/45) di regioni sovrapposte (Tabella 1). Il più alto numero di CNVR sovrapposti (27/45) è stato trovato nello studio di Axelsson et al., [21], in cui il rilevamento del CNV è stato eseguito utilizzando il ri-sequenziamento dell'intero genoma. Solo un CNVR, CNVR36 sul cromosoma 27, è stato rilevato in tutti i precedenti studi considerati [10-12, 21]. Cinque CNVR si sovrapponevano a quelle riportate da Nicholas et al., [10]. I nostri risultati hanno rivelato 16 nuovi CNVR. Poiché il presente studio è stato condotto su una razza mai analizzata per CNV in precedenza, la possibilità di identificare nuovi CNVR specifici della razza era piuttosto elevata. La presenza di CNVR specifici di razza è stata anche descritta in altri studi su cani [11-12]. Questi CNVR tipici per una singola razza sono di particolare interesse se sono fissati o presentano una maggiore frequenza nella razza, poiché potrebbero essere coinvolti in caratteristiche specifiche di razza [12]. Sfortunatamente, nel nostro studio, così come in altri lavori precedenti [11-12], non sono stati rilevati CNVR fissati all'interno della razza, e quindi questi non sono spesso coinvolti nelle caratteristiche specifiche della razza Bracco Francese Tipo Pirenei. Tuttavia, considerando i numerosi esempi sul coinvolgimento dei

CNV nel modellare il fenotipo del cane [22], questi risultati sottolineano la necessità di scoprire nuovi CNV in razze che non sono ancora state caratterizzate. Questo è particolarmente vero per la specie canina, per la quale lo studio di CNV ha ricevuto meno attenzione.

Tabella 1 Elenco delle regioni (CNVR) rilevate in questo studio che si sono sovrapposte a quelle riportate in letteratura.

CNVRs	Chromosomes	Start	End	Nicholas <i>et al.</i> (2011)	Berglund <i>et al.</i> (2012)	Axelsson <i>et al.</i> (2013)	Molin <i>et al.</i> (2014)
		Position (bp)	Position (bp)				
1	chr1	11200412	11215077			*	
4	chr4	33991898	34067769			*	
5	chr6	39482383	39941098			*	
6	chr6	40137436	40261501			*	
9	chr7	790325	836217			*	
10	chr7	846445	871741			*	
12	chr9	615993	795784			*	
13	chr9	660066	909141			*	
14	chr9	916372	997748			*	
17	chr10	16943758	17055639			*	
18	chr10	17172641	17284700			*	
20	chr10	18100399	18220792	*		*	
25	chr14	853721	1000647			*	
26	chr15	8373335	8384052			*	
27	chr16	383954	442252			*	
28	chr17	749155	818590			*	
29	chr17	39880141	39905486			*	
30	chr18	25644344	25740090			*	
32	chr23	52156177	52159756	*		*	
33	chr25	48611803	48662322			*	
34	chr25	50314369	50482865			*	
35	chr27	2869179	2886074			*	
36	chr27	25695551	25810881	*	*	*	*
37	chr28	40299547	40325378			*	
38	chr28	40715077	40730141			*	
40	chr30	39280736	39318243			*	
41	chr36	13722385	13742102	*			
42	chr37	30065232	30112232			*	
43	chr38	4831886	4885582	*			

5.2.3 Copy Number Variation Regions: Contenuto Genico ed Annotazioni funzionali

Nella nostra lista finale, 37 CNVR si sovrappongono a 159 geni annotati (Supplementary Table S1: Genes). Alcuni di questi geni sono associati a caratteristiche fenotipiche ben note nella specie canina. Il gene **Sox8** è coinvolto nella determinazione del sesso [23]. Il gene **SLC38A2** è stato descritto come potenzialmente coinvolto nell'adattamento all'ipossia, da uno studio sull'adattamento in alta quota nei mastini tibetani [24]. **MYOG** è un importante fattore regolatore miogenico necessario per la differenziazione dei miociti e lo sviluppo funzionale del muscolo scheletrico [25-26]. In uno studio sull'esposizione cronica allo stress condotto sul cane, Luo et al. [27] hanno indicato che il gene **ADORA** potrebbe essere importante per spiegare la variabilità della tolleranza allo stress. Le annotazioni **KEGG** hanno mostrato che la resistenza endocrina, le vie del segnale **Notch** e la via del segnale **Wnt** risultavano significativamente arricchite. I geni rilevati, risultano coinvolti in un ampio spettro di processi biologici e componenti cellulari. I processi biologici più significativi sono stati lo sviluppo della struttura muscolare (**GO: 0061061**), la differenziazione delle cellule muscolari (**GO: 0042692**) e la differenziazione delle cellule muscolari striate (**GO: 0051146**). Il componente cellulare più significativo è risultato l'actina filamentosa (**GO: 0031941**). Questi sono risultati interessanti considerando che il Bracco Francese Tipo Pirenei (BRA) è una razza selezionata per la cerca la ferma il riporto ed ha un temperamento nevriale [14]. Cani robusti, forti, adeguatamente muscolosi con una morfologia leggera. Dai risultati ottenuti, possiamo ipotizzare che la selezione per una tale attitudine venatoria, per la quale sono richieste particolari caratteristiche anatomiche, potrebbe aver modellato, almeno in parte, il background genetico di questa razza e, di conseguenza, la frequenza / presenza dei CNVR rilevati nei suddetti geni.

5.3 CONCLUSIONI

Allo stato attuale, sono disponibili conoscenze limitate sulle CNV rilevate dall'array HD del cane. Questo è il primo studio delle CNV nella razza Bracco Francese Tipo Pirenei. L'uso dei dati dell'array Canine HD SNP e di due diversi algoritmi per l'identificazione delle CNV rende i nostri risultati molto robusti e con bassa probabilità di falsi positivi. Considerando i molti esempi del coinvolgimento delle CNV nel modellare i fenotipi del cane, questi risultati sottolineano la necessità di scoprire nuove CNV in razze fino ad oggi non caratterizzate. Inoltre, poiché i dati di array SNP ad alta densità sono sempre più disponibili, l'analisi dei CNV combinata a quella del polimorfismo dei marcatori SNPs può risultare di grande interesse per indagare le possibili associazioni esistenti tra la variabilità genomica e la variabilità fenotipica.

5.4 BIBLIOGRAFIA

1. Savolainen, P.; Zhang, Y.P.; Luo, J.; Lundeberg, J.; Leitner, T. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* 2002, 298, 1610–1613
2. Nicholas, T.J.; Cheng, Z.; Ventura, M.; Mealey, K.; Eichler, E.E.; Akey, J.M. The genomic architecture of segmental duplications and associated copy number variants in dogs. *Genome Res.* 2009, 19, 491-499.
3. Vaysse, A.; Ratnakumar, A.; Derrien, T.; Axelsson, E.; Pielberg, G.R.; Sigurdsson, S.; Fall, T.; Seppälä, E.H.; Hansen, M.S.T.; Lawley, C.T.; Karlsson, E.K.; The LUPA Consortium, Bannasch, D.; Vilà, C.; Lohi, H.; Galibert, F.; Fredholm, M.; Häggström, J.; Hedhammar, Å.; André, C.; Lindblad-Toh, K.; Hitte, C.; Webster, M.T. Identification of genomic regions associated with

- phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS Genet.* 2011, 7(10), e1002316.
4. Redon, R.; Ishikawa, S.; Fitch, K.R.; et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006, 444, 444-454.
 5. Jiang, L.; Jiang, J.; Yang, J.; Liu, X.; Wang, J.; Wang, H.; Fing, X.; Liu, J.; Zhang, Q. Genome-wide detection of copy number variations using high-density SNP genotyping platforms in Holsteins. *BMC Genomics* 2013, 14, 131.
 6. Di Gerlando, R.; Sardina, M.T.; Tolone, M.; Sutera, A.M.; Mastrangelo, S.; Portolano, B. Genome-wide detection of copy-number variations in local cattle breeds. *Anim. Prod. Sci.* 2018, doi: 10.1071/AN17603.
 7. Zhu, C.; Fan, H.; Yuan, Z.; Hu, S.; Ma, X.; Xuan, J.; Wang, H.; Zhang, L.; Wei, C.; Zhang, Q.; Zhao, F.; Du, L. Genome-wide detection of CNVs in Chinese indigenous sheep with different types of tails using ovine high-density 600K SNP arrays. *Sci. Rep.* 2016, 6, 27822.
 8. Paudel, Y.; Madsen, O.; Megens, H.J.; Frantz, L.A.; Bosse, M.; Bastiaansen, J.W.; Crooijmans, R. P.M.A.; Groenen, M.A.M. Evolutionary dynamics of copy number variation in pig genomes in the context of adaptation and domestication. *BMC Genomics* 2013, 14, 449.
 9. Chen, W.K.; Swartz, J.D.; Rush, L.J.; Alvarez, C.E. Mapping DNA structural variation in dogs. *Genome Res.* 2009, 19, 500-509.
 10. Nicholas, T.J.; Baker, C.; Eichler, E.E.; Akey, J.M. A high-resolution integrated map of copy number polymorphisms within and between breeds of the modern domesticated dog. *BMC Genomics* 2011, 12, 414.
 11. Berglund, J.; Nevalainen, E.M.; Molin, A.M.; Perloski, M.; The LUPA Consortium; André, C.; Zody, M.C.; Sharpe, T.; Hitte, C.; Lindblad-Toh, K.; Lohi, H.; Webster, M.T. Novel origins of copy number variation in the dog genome. *Genome Biol.* 2012, 13(8), R73.
 12. Molin, A.M.; Berglund, J.; Webster, M.T.; Lindblad-Toh, K. Genome-wide copy number variant discovery in dogs using the CanineHD genotyping array. *BMC Genomics* 2014, 15(1), 210.
 13. Mastrangelo, S.; Biscarini, F.; Auzino, B.; Ragatzu, M.; Spaterna, A.; Ciampolini, R. Genome-wide diversity and runs of homozygosity in the “Braque Français, type Pyrénées” dog breed. *BMC Research* 2018, Notes 11(1), 13.
 14. Mastrangelo, S.; Biscarini, F.; Tolone, M.; Auzino, B.; Ragatzu, M.; Spaterna, A.; Ciampolini, R. Genomic characterisation of the Braque Français type Pyrénées dog and relationship with other breeds. *Plon One* 2018, In press.
 15. Prinsen, R.T.M.M.; Strillacci, M.G.; Schiavini, F.; Santus, E.; Rossoni, A.; Maurer, V.; Bieber, A.; Gredler, B.; Dolezal, M.; Bagnato, A. A genome-wide scan of copy number variants using high-density SNPs in Brown Swiss dairy cattle. *Livest. Sci.* 2016, 191, 153-160.
 16. Strillacci, M.G.; Gorla, E.; Cozzi, M.C.; Vevey, M.; Genova, F.; Scienski, K.; Longeri, M.; Bagnato, A. A copy number variant scan in the autochthonous Valdostana Red Pied cattle breed and comparison with specialized dairy populations. *PloS one* 2018, 13(9), e0204669.
 17. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 2010, 26, 841-842.
 18. Wain, L.V.; Armour, J.A.; Tobin, M.D. Genomic copy number variation, human health, and disease. *Lancet* 2009, 374, 340–350.
 19. Bagnato, A., Strillacci, M.G.; Pellegrino, L.; Schiavini, F.; Frigo, E.; Rossoni, A.; Fontanesi, L.; Maltecca, C.; Prinsen, R.T.M.M.; Dolezal, M.A. Identification and validation of copy number variants in Italian Brown Swiss Dairy cattle using Illumina Bovine SNP50 BeadChip. *Italian J. Animal Sci.* 2015, 14, 552-558.
 20. Winchester, L.; Yau, C.; Ragoussis, J. Comparing CNV detection methods for SNP arrays. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 2009, 8 (5), 353-366.
 21. Axelsson, E.; Ratnakumar, A.; Arendt, M.L.; Maqbool, K.; Webster, M.T.; Perloski, M.; Liberg O.; Arnemo, J.M.; Hedhammar, A.; Lindblad-Toh, K. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 2013, 495(7441), 360.

22. Alvarez, C.E.; Akey, J.M. Copy number variation in the domestic dog. *Mamm. Genome* 2012, 23(1-2), 144-163.
23. Chaboissier, M.C.; Kobayashi, A.; Vidal, V.I.; Lützkendorf, S.; van de Kant, H.J.; Wegner, M.; de Rooij, D.G.; Richard, R.; Behringer, R.R.; Schedl, A. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 2004, 131(9), 1891-1901.
24. Li, Y.; Wu, D.D.; Boyko, A.R.; Wang, G.D.; Wu, S.F.; Irwin, D.M.; Zhang, Y.P. Population variation revealed high-altitude adaptation of Tibetan mastiffs. *Mol. Biol. Evol.* 2014, 31(5), 1200-1205.
25. Lin, X.; Yang, X.; Li, Q.; Ma, Y.; Cui, S.; He, D.; Chang, J. Protein tyrosine phosphatase-like A regulates myoblast proliferation and differentiation through MyoG and the cell cycling signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2012, 32(2), 297-308.
26. Tong, H.L.; Jiang, R.Y.; Zhang, W.W.; Yan, Y.Q. MiR-2425-5p targets RAD9A and MYOG to regulate the proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle-derived satellite cells. *Sci. Rep.* 2017, 7(1), 418.
27. Luo, W.; Fang, M.; Xu, H.; Xing, H.; Nie, Q. Transcriptome comparison in the pituitary–adrenal axis between Beagle and Chinese Field dogs after chronic stress exposure. *Animal Genet.* 2015, 46(5), 522-534



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

6 GENOME WIDE ASSOCIATION SCAN

AUTORI: Dr. Filippo Biscarini, Dr. Salvatore Mastrangelo, Prof. Roberta Ciampolini

Il Genome -Wide Association Scan (GWAS), o “Studio di Associazione Genome-Wide”, è una metodica di indagine che consente di esaminare l'intero genoma mediante l'analisi del polimorfismo a singolo nucleotide dei marcatori genomici (SNPs) con l'impiego di Microchip SNP ad alta densità. La metodica è finalizzata all'individuazione ed al successivo studio di eventuali associazioni “genome-wide” tra particolari aplotipi SNPs e caratteri a base genetica semplice e complessa. Nella specie canina in particolar modo, la selezione applicata dall'uomo, soprattutto negli ultimi 200 anni, ha adottato stringenti criteri che a partire da un patrimonio di variabilità genetica ancestrale comune, hanno portato in un relativamente ridotto periodo di tempo in termini evolutivi, alla costituzione delle attuali 250 razze oggi riconosciute, molto diverse tra di loro sia per caratteristiche morfologiche ed attitudinali che per la grande variabilità genetica che le differenzia tra di loro e la ridotta variabilità genetica al loro interno che viene condivisa da tutti i soggetti che le compongono. Questa condizione fa del cane una specie di grande interesse di studio per i gentisti in quanto, proprio a causa degli effetti della selezione sulla variabilità genetica, offre un modello ideale per individuare la predisposizione agli stati patologici o addirittura le basi genetiche di malattie mono e multifattoriali anche condivise con la specie umana.

Nel Cane l'indagine GWAS ha permesso di individuare le basi genetiche di alcuni disturbi del comportamento [1], della suscettibilità ad alcuni tumori [2] e di cominciare a studiare le aree del genoma contenenti i molteplici geni che sottintendono patologie a base genetica complessa quali: displasia dell'anca, displasia del gomito, epilessia idiopatica, linfoma, tumore mastocitario e colite granulomatosa. L'approccio di studio ha permesso anche di indagare caratteri quantitativi che influenzano le dimensioni del corpo, e di individuare i geni che determinano la lunghezza e la perdita del pelo [3].

Il Genome -Wide Association Scan (GWAS), adottato nel presente progetto di ricerca, ha per obiettivo l'individuazione di associazioni tra marcatori SNPs e precise Caratteristiche Fenotipiche sia Morfologiche che Attitudinali Venatorie del Bracco Francese Tipo Pirenei.

Il compito è arduo in quanto per affrontare un'analisi di (GWAS) che fornisca risultati statisticamente solidi e definitivi, sono necessarie centinaia se non migliaia di cani analizzati.

I risultati che abbiamo ottenuto mediante l'analisi di (GWAS) effettuata su 48 cani che presentiamo in questo capitolo, forniscono indicazioni preliminari riguardo a dove possano essere localizzate sul genoma della razza le basi genetiche delle caratteristiche selezionate dal Club C.I.B.F. lasciandoci intuire, a livello genomico, verso quale direzione la selezione effettuata abbia condotto la razza fino ad oggi.

Nonostante il Presente Progetto, oggetto della Convenzione stipulata tra il Club C.I.B.F. ed il Centro Inter Ateneo Pisa Camerino, si sia concluso in base ad accordi prestabiliti, il nostro lavoro di approfondimento e consolidazione dei risultati ottenuti con le analisi di (GWAS) sta andando avanti. Stiamo applicando ai risultati ottenuti ulteriori e complesse metodologie di analisi. Questo lavoro prenderà ancora qualche tempo ma ci permetterà di rendere più solidi e di confermare i risultati ottenuti fino ad oggi ed illustrati in questo capitolo.

6.1 MATERIALI E METODI

6.1.1 Campionamento e Genotipizzazione

Il Club Italiano Bracco Francese (C.I.B.F.) ha reso possibile il campionamento di 48 cani non imparentati tra di loro (27 femmine, 21 maschi), provenienti da aree di allevamento diverse situate in regioni diverse del territorio Nazionale affinché potessero risultare rappresentativi della variabilità genetica presente all'interno della razza. I cani sono stati campionati in occasione dei raduni e delle prove di performances indette dal (C.I.B.F.) a livello Nazionale. Nel contesto dei campionamenti i proprietari hanno volontariamente permesso il prelievo del sangue dai cani scelti per il presente studio ed il Presidente del Club (C.I.B.F.) ne ha ottenuto il consenso informato. Nessun cane ha subito violenza. Il DNA genomico (gDNA) è stato estratto dai campioni di sangue mediante il QIAmp DNA Mini Kit QIAGEN. La concentrazione del DNA di ciascun campione è stata portata ad una concentrazione standard di 50 ng / μ L. Tutti i 48 cani campionati sono stati genotipizzati mediante l'Illumina CanineHD BeadChip, contenente 173.662 SNP.

La genotipizzazione è stata effettuata nei laboratori del "*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali*", Università di Palermo.

6.1.2 Analisi delle caratteristiche Morfologiche e Funzionali

Su indicazione del Presidente del Club Bracco Francese, il progetto di ricerca ha affrontato sui 48 cani allo studio un'analisi preliminare di Genome-Wide Association Scan (GWAS) utilizzando i Polimorfismi dei marcatori genomici SNPs per la ricerca di possibili associazioni tra particolari aplotipi SNPs e le caratteristiche morfologiche previste dallo standard di razza ed attitudinali da sempre selezionate dagli allevatori.

Il Presidente del Club Bracco Francese, su nostra indicazione, ha costruito per i 48 cani allo studio una griglia di valutazione riguardante le più importanti caratteristiche Morfologiche e Venatorio Attitudinali.

Per le suddette caratteristiche sono stati assegnati punteggi che vanno da 1 (il più scadente) a 6 (il migliore). Questo allo scopo di definire precisi parametri di valutazione per ciascuna caratteristica categorizzata. Senza una tale categorizzazione risulta impossibile poter avviare un'analisi GWAS per tentare di andare alla ricerca delle basi genetiche delle suddette caratteristiche a livello genomico.

Tabella Punteggi Caratteristiche morfologiche

Punteggi	Non accettabile 1	Accettabile 2	Abbastanza buono 3	Buono 4	Molto buono 5	Eccellente 6
Rapporto Cranio/Muso	canna nasale esageratamente lunga		canna nasale uguale al cranio 1:1			rapporto cranio/muso 3:2
Direzione assi cranio/facciali	convergenti			divergente e tendente al parallelismo		paralleli
forma e posizione dell'occhio	rotondo e frontale		Non eccessivamente rotondo e semi laterale			forma a mandorla e semi laterale evidente dimorfismo
Valutazione generale testa	testa fuori tipo superiore a 58 maschi o 56 femmine / inferiore a 47	cenni di linfatismo sul limite massimo e minimo	orecchio attaccato basso occhio rotondo e semi laterale Da 56 a 58 maschi e da 54 a 56 femmine	buoni i rapporti divergenza minima orecchio non sempre ben portato occhio buone per forma e posizione	testa suff. asciutta. Occhio buono per forma e posizione, orecchio bene inserito e ben portato rapporti rispettati	sessuale, occhio buono per forma e posizione come l'occhio, rapporti ideali e parallelismo – sguardo sereno Maschio 53 femmina 50
Altezza al garrese					Maschio 54 F 53	
Aspetto generale	Pesante – linfatismo			muscoloso leggerezza ai limiti linea inferiore accettabile		leggero e muscoloso

Tabella Punteggi Attitudini Venatorie

Punteggi	Non accettabile 1	Accettabile 2	Abbastanza buono 3	Buono 4	Molto buono 5	Eccellente 6
Velocità	poca propensione al galoppo	trotto/galoppo	galoppo lento	galoppo con portamento di testa sulla linea superiore	galoppo veloce/portamento di testa accettabile	galoppo veloce e buon portamento di testa
Desiderio a reperire selvatico	disinteressato alla selvaggina	interesse a reperire poco evidente	interessato a reperire in presenza di input	sufficiente desiderio a reperire collabora ma in presenza del selvatico consente a comando collegato in ambienti molto aperti con richiami accettabili	evidente desiderio a reperire	molto interessato alla selvaggina
Collaborazione con compagno	non collabora-succube o ostile con il compagno	non disturba ma risente della presenza del compagno	non risente del compagno ne disturba consente a comando	collabora ma in presenza del selvatico consente a comando collegato in ambienti molto aperti con richiami accettabili	non disturba e consente spontaneo	collaborazione fattiva e consenso spontaneo
Collegamento al conduttore	indipendente sordo ai richiami	collegamento su ripetuti richiami	collegato con richiami accettabili	aperti con richiami accettabili	collegato con limitati richiami abbocca senza incertezza e riporta ai piedi ripartendo autonomamente in cerca	sempre in collegamento senza richiami abbocca e celermente riporta alla mano in attesa di comando a lasciare
Riporto	non abbocca- non riporta	abbocca con incertezza e riporta pochi metri	abbocca e riporta pochi metri	abbocca con incertezza e riporta ai piedi entra deciso, nuota con incertezza e riporta alla riva	entra deciso, nuota bene e riporta alla riva	entra deciso nuota bene e riporta alla mano del conduttore
Acquaticità	non entra in acqua – paura	entra con incertezza, nuota a fatica e riporta alla riva	entra con incertezza, nuota bene e lascia alla riva	entra deciso, nuota con incertezza e riporta alla riva	entra deciso, nuota bene e riporta alla riva	entra deciso nuota bene e riporta alla mano del conduttore

6.1.3 Messa a punto di un modello per l'analisi GWAS

Il primo passaggio è stato la messa a punto del modello statistico per analizzare i 12 caratteri oggetto di questo studio. A tal fine, il carattere “tipo” è stato utilizzato per sviluppare il modello, e riportato qui a fini illustrativi. Il primo approccio è stato un semplice modello di regressione lineare sui genotipi SNP, della forma:

Equazione 1

$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^m z_{ij} SNP_j + e_i$$

Dove (y_i) è lo score per il carattere fenotipico analizzato per il cane (i), (μ) è la media generale, SNP_j è l'effetto del marcatore SNP_j , e (z_{ij}) una variabile indicatore che specifica per ogni cane (i) il genotipo allo SNP_j (0, 1, 2, a seconda del numero di copie dell'allele minore); (e_i) è il residuo del modello.

Il nostro modello di regressione lineare semplice (Equazione 1), è stato applicato ad ogni SNP separatamente (regressione lineare semplice).

Setting up a model for GWAS

F. Biscarini

July 12, 2016

```
## Loading required package: MASS
```

```
## Loading required package: GenABEL.data
```

A glimpse of the genetic and phenotypic data imported into GenABEL (just to make sure ...)

```
##           Chromosome Position Strand A1 A2 NoMeasured CallRate
## BICF2G630707908      1  3273096      +  G  A           44         1
## BICF2P563564         1  3307151      +  A  C           44         1
## BICF2P574107         1  3319643      +  G  A           44         1
## BICF2G630707918      1  3347798      +  T  C           44         1
## BICF2P391650         1  3398480      +  T  C           44         1
## BICF2G630707932      1  3419624      +  G  A           44         1
##           Q.2 P.11 P.12 P.22 P.exact Fmax Plrt
## BICF2G630707908 0.30681818 21 19 4 1.0000000 -0.01517911 0.9196527
## BICF2P563564     0.45454545 15 18 11 0.2392093 0.17500000 0.2448895
## BICF2P574107     0.45454545 15 18 11 0.2392093 0.17500000 0.2448895
## BICF2G630707918 0.09090909 36 8 0 1.0000000 -0.10000000 0.3706934
## BICF2P391650     0.45454545 15 18 11 0.2392093 0.17500000 0.2448895
## BICF2G630707932 0.30681818 21 19 4 1.0000000 -0.01517911 0.9196527
```

```
##          No Mean  SD
## id          44  NA  NA
## speed       44 5.068 0.925
## game        44 4.909 1.217
## collaboration 44 3.750 0.943
## hunter      44 5.455 1.044
## retrieval   44 3.977 1.372
## water       44 3.750 1.314
## skull.muzzle 44 5.773 0.605
## cranio.facial 44 5.045 1.011
## eye         44 5.068 1.371
## head        44 4.682 1.073
## withers     44 4.864 0.955
## type        44 4.795 1.025
## sex         44 0.432 0.501
```

The first –very simple– GWAS model will be:

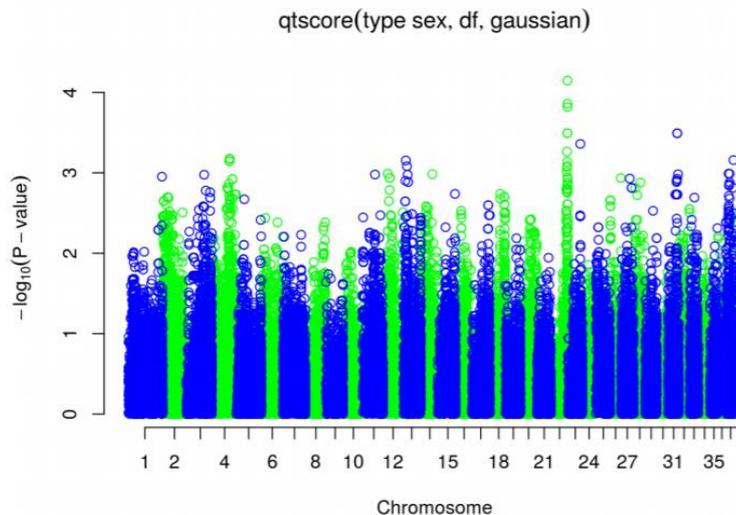
$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^m z_{ij} SNP_j + e_i$$

Note that this model **does not** account for **population relatedness**. Let's have a look at the results:

```
## Warning in qtscore(type ~ sex, df, trait = "gaussian"): Lambda estimated <
## 1, set to 1
```

Negli studi GWAS è pratica comune monitorare il coefficiente lambda, il cosiddetto “inflation factor”. Lambda dà una misura di quanto possiamo aspettarci che i *p-value* del modello siano “gonfiati”, ossia più significativi di quanto in realtà non siano. L’inflazione è spesso collegata all’incompletezza o inadeguatezza del modello di analisi scelto: valori di **lambda > 1** sono indice di inflazione, mentre valori **uguali o vicini ad 1** indicano che il modello cattura adeguatamente la variabilità presente nei dati.

Il nostro modello di regressione lineare semplice (Equazione 1), restituisce un lambda leggermente superiore ad 1, indice di moderata inflazione. Ciò suggerisce la probabile mancanza di fattori rilevanti nel modello, che negli studi di GWAS è tipicamente la struttura di popolazione.



Without correcting for genetic relatedness, though, there is a high chance of detecting spurious associations. This is measured by the λ inflation factor: 1. Values > 1 , like in this case, indicate inflation i.e. factors that have not been accounted for in the model.

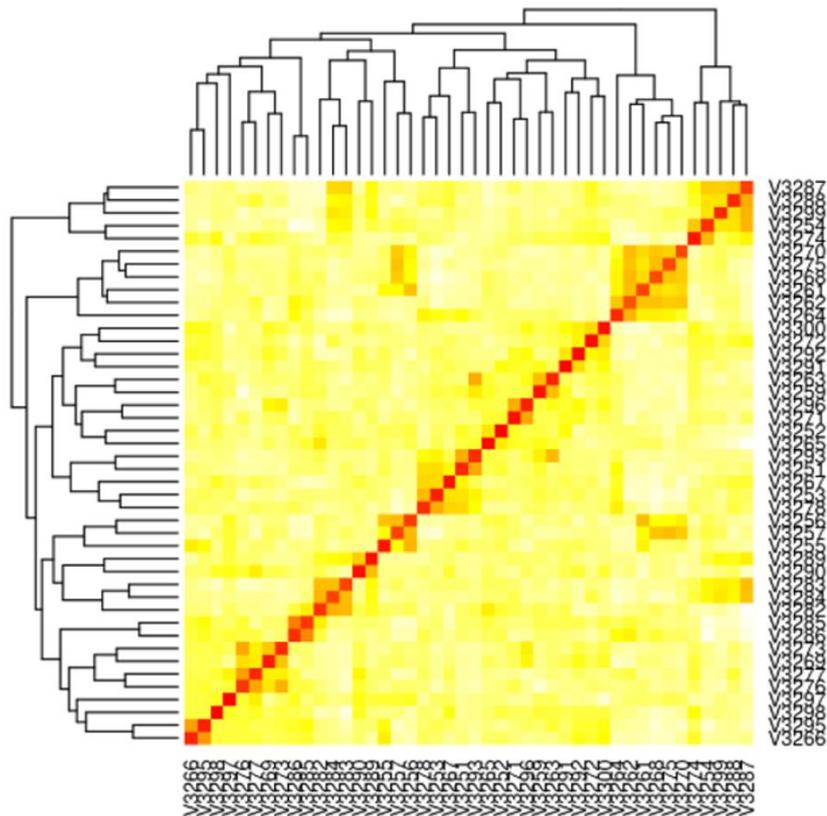


Figura 1. Rappresentazione grafica delle relazioni di Parentela tra i 48 Cani Analizzati: Matrice di Parentela e Dendrogrammi

La heatmap in Figura 1, infatti, mostra come i cani del nostro campione presentino una qualche struttura di popolazione, essendo alcuni più imparentati tra loro rispetto ad altri (e.g. famiglie, riproduttori popolari etc.).

Il modello di analisi può perciò essere completato aggiungendo la matrice delle parentele genomiche tra animali, calcolata basandosi sui dati dei genotipi SNP:

Equazione 2

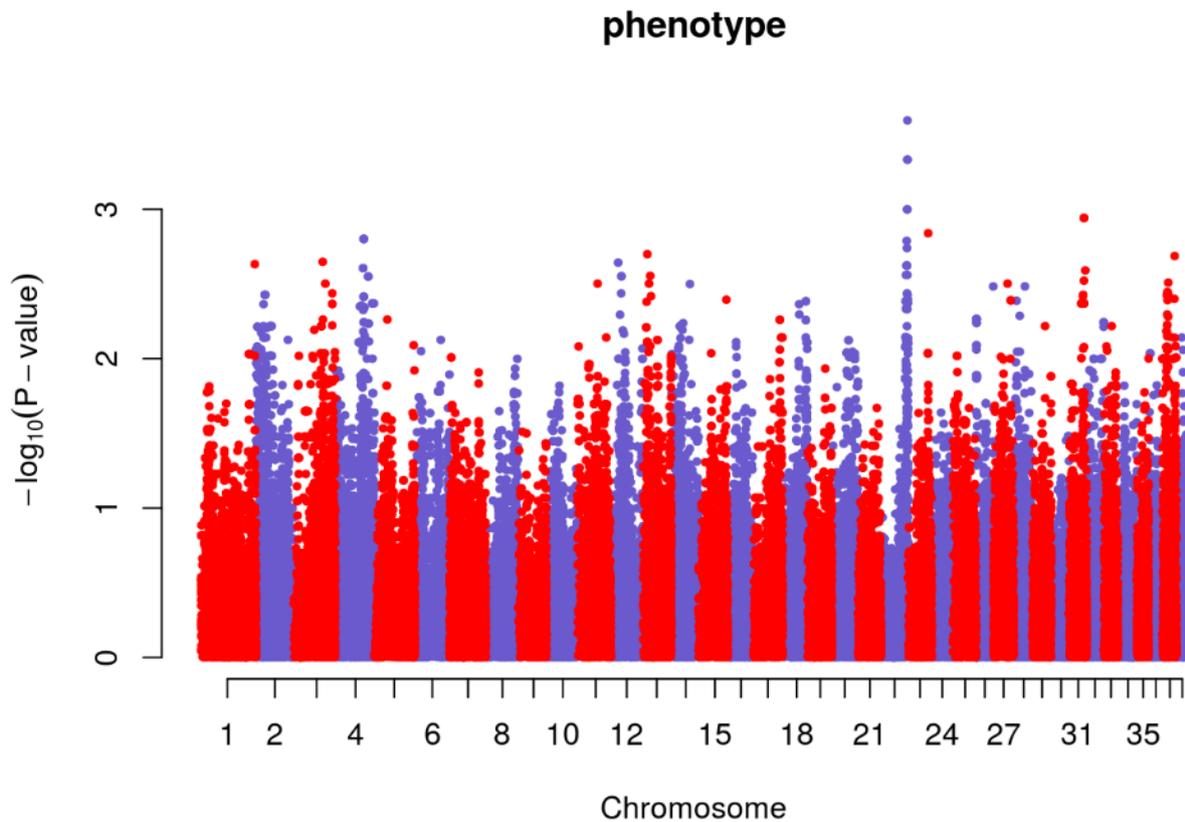
$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^m z_{ij} SNP_j + a_i + e_i$$

dove (y_i) è sempre il carattere fenotipico oggetto di studio misurato nel cane (i), (μ) la media generale, SNP_j è l'effetto dello SNP_j , e (z_{ij}) è una variabile indicatore che lega SNP e genotipi (0, 1, 2: n. di copie dell'allele minore).

La novità in questo modello è il termine (a_i), che indica l'effetto poligenico per l'animale (i): questo si riferisce agli effetti sul fenotipo di tutti gli altri geni (segmenti di genoma) non rappresentati dallo SNP_j .

Il modello in (Equazione 2), è un modello lineare misto, che comprende sia effetti fissi sia effetti aleatori: a questi ultimi è associata una distribuzione ed una varianza, che nel nostro caso è data da $\mathbf{K} \sigma_a^2$ dove \mathbf{K} è la matrice delle parentele genomiche.

Questo modello fornisce una migliore rappresentazione dei dati, e il suo lambda è esattamente uguale ad $\mathbf{1}$, indicando assenza di inflazione (almeno per il carattere usato per l'illustrazione seguente), e garantendo risultati più corretti.



Si è perciò scelto di adottare il modello (Equazione 2), per l'analisi GWAS dei 12 caratteri fenotipici a disposizione.

6.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

Per 44 dei 48 cani genotipizzati è stato possibile indagare i dati fenotipici alla luce dei dati genotipici, e dunque condurre uno studio di associazione genomica.

6.2.1 Statistiche descrittive dei dati genotipici e fenotipici

Per i dati genotipici, gli SNP monomorfici sono stati rimossi, in quanto non sono informativi per uno studio GWAS.

Gli SNP restanti presentano una eterozigosi media di 0.36, un valore che testimonia una discreta variabilità genetica nel campione. In Tabella 1 viene riportata una descrizione dei dati Genotipici SNP

Tabella 1 Descrizione dei dati Genotipici SNP

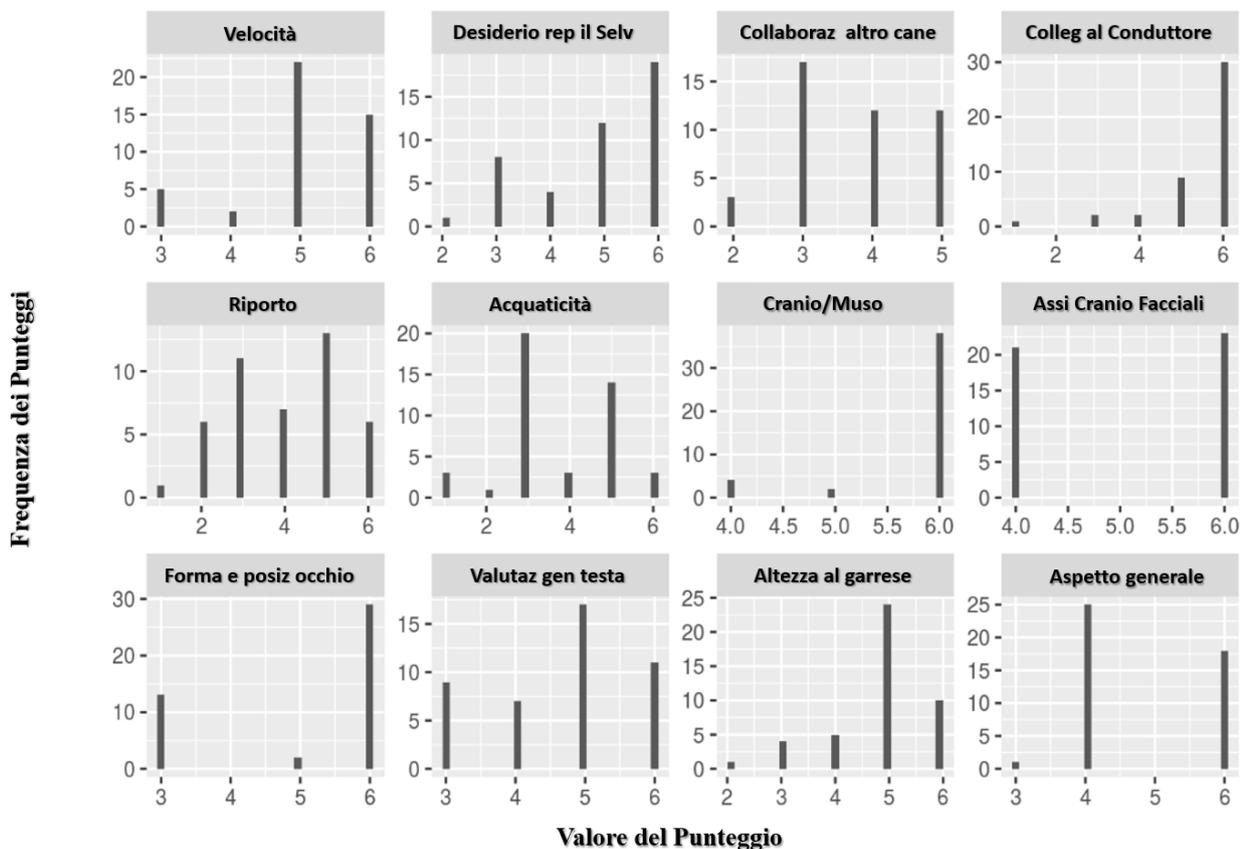
```
## `Minor allele frequency distribution`
##      X<=0.01 0.01<X<=0.05 0.05<X<=0.1 0.1<X<=0.2      X>0.2
## No      0      957.00    10072.000    22922.000    62865.000
## Prop    0      0.01      0.104      0.237      0.649
##
## `Cumulative distr. of number of SNPs out of HWE, at different alpha`
##      X<=1e-04 X<=0.001 X<=0.01 X<=0.05 all X
## No      28    1e+02 695.000 3375.000 96816
## Prop    0    1e-03 0.007 0.035 1
##
## `Distribution of proportion of successful genotypes (per person)`
##      X<=0.9 0.9<X<=0.95 0.95<X<=0.98 0.98<X<=0.99 X>0.99
## No      0      0      0      0      44
## Prop    0      0      0      0      1
##
## `Distribution of proportion of successful genotypes (per SNP)`
##      X<=0.9 0.9<X<=0.95 0.95<X<=0.98 0.98<X<=0.99 X>0.99
## No      0      0      0      0      96816
## Prop    0      0      0      0      1
##
## `Mean heterozygosity for a SNP`
## [1] 0.359442
##
## `Standard deviation of the mean heterozygosity for a SNP`
## [1] 0.1238252
##
## `Mean heterozygosity for a person`
## [1] 0.3724431
##
## `Standard deviation of mean heterozygosity for a person`
## [1] 0.02392148
```

Lo studio di associazione genomica è stato condotto per le caratteristiche fenotipiche ritenute importanti a scopi selettivi e segnalate da parte del Club Italiano Bracco Francese quali: Caratteristiche Attitudinali -Venatorie e Caratteristiche Morfologiche - Funzionali.

In Figura 1 vengono riportati i punteggi relativi alle suddette caratteristiche fenotipiche assegnati ai 48 cani allo studio da esperti valutatori accreditati presso il C.I.B.F.. Tali punteggi vanno da **1** (il più scadente) a **6** (il migliore).

Per ciascuna caratteristica fenotipica sull'asse delle ascisse sono riportate le 6 classi di punteggio e sull'asse delle ordinate sono riportate le frequenze dei punteggi. Possiamo osservare che per alcune caratteristiche quali: "Forma e Posizione dell'occhio", "Assi Cranio Facciali", "Aspetto Generale" risultano più frequenti solo due classi di valutazioni piuttosto elevate 3, 4 e 6 indicando che per queste caratteristiche morfologiche tutti e 48 i cani allo studio si avvicinano mediamente o molto a quanto indicato dagli standard di razza. Per "Valutazione Generale della Testa" ed "Altezza al Garrese" i fenotipi dei cani si distribuiscono su quasi tutte le classi di valutazione. Questo evidenzia la presenza una maggiore variabilità fenotipica all'interno del campione di cani valutato. Per le caratteristiche Attitudinali -Venatorie sono presenti a frequenze medio elevate quasi tutte le classi di valutazione ad indicare un'elevata variabilità delle caratteristiche comportamentali nel campione allo studio.

Figura 1. Punteggi assegnati alle Attitudini Venatorie ed alle Caratteristiche Morfologiche



In Tabella 2 vengono riportate le medie dei punteggi per le attitudini Venatorie e le caratteristiche Morfologiche assegnati ai 44 cani valutati. I punteggi medi più elevati sono stati attribuiti a quelle caratteristiche morfologiche che definiscono la tipicità di razza per la conformazione della testa quali: rapporto tra le dimensioni del cranio e del muso, forma e posizione dell'occhio, assi cranio facciali, valutazione generale della testa, indicando che i risultati della selezione stanno tendendo verso quanto stabilito dallo standard di razza. Seppur con valori medi più bassi rispetto ai precedenti, ma ancora piuttosto elevati, anche le valutazioni per le restanti caratteristiche morfologiche quali: Altezza al garrese ed Aspetto generale indicano e tipicità generale della morfologia, tendono verso il raggiungimento degli obiettivi fissati nello standard di razza. Tra le

caratteristiche Attitudinali -Venatorie, i valori medi più elevati dei punteggi riguardano quelle caratteristiche maggiormente coinvolte nell'azione di caccia quali: Collegamento al conduttore, velocità, e desiderio di reperire il selvatico. Tali caratteristiche sono state da sempre selezionate nelle razze canine da caccia, e spuntando i più elevati valori medi nei punteggi, restituiscono un'immagine dei risultati ottenuti con la selezione. Il riporto, l'acquaticità e la collaborazione con un altro cane, presentano valori medi dei punteggi più bassi, indicando che su queste 3 caratteristiche si deve ancora lavorare con la selezione.

	N° di Cani Valutati	Medie dei Punteggi	DS
N° di Cani analizzati	44	N / A	N / A
Velocità	44	5.068	0.925
Desiderio di reperire il Selvatico	44	4.909	1.217
Collaborazione con un altro cane	44	3.750	0,943
Collegamento al Conduttore	44	5.455	1.044
Riporto	44	3.977	1.372
Acquaticità	44	3.750	1.314
Rapporto Cranio/Muso	44	5,773	0.605
Assi Cranio Facciali	44	5.045	1.011
Forma e posizione dell'occhio	44	5.068	1.371
Valutazione generale testa	44	4.682	1.073
Altezza al garrese	44	4.864	0,955
Aspetto generale	44	4.795	1.025
Sesso	44	0.432	0,501

Tabella 2. Medie dei Punteggi assegnati per le Attitudini Venatorie e le Caratteristiche Morfologiche ai 44 cani valutati

A scopi selettivi, è importante che gli allevatori conoscano in quali relazione si trovano tra di loro le caratteristiche fenotipiche che intendono migliorare attraverso l'applicazione di piani di selezione. Per questo in Figura 2 vengono illustrati i valori di correlazione esistenti tra tutte le diverse caratteristiche fenotipiche allo studio sia Attitudinali-Venatorie che Morfologiche.

La Correlazione indica il grado con cui due caratteri co-variano all'interno di una popolazione. Il valore della correlazione tra due caratteri è espresso mediante un coefficiente il coefficiente di correlazione (r).

Il coefficiente di correlazione (r) può assumere valori compresi tra (-1) e (1) .

La correlazione può essere descritta in termini direzionali, ovvero, due caratteri sono positivamente correlati se all'aumentare del valore numerico di uno aumenta il valore numerico dell'altro. Sono negativamente correlati se all'aumentare del valore numerico di uno diminuisce il valore numerico dell'altro. Le possibili cause di correlazione genetica sono: La Pleiotropia (singoli geni influenzano più di un carattere), il Linkage Disequilibrium (associazione non casuale tra alleli a due o più loci). In Figura 1, se l'indice di correlazione (r), confrontate due caratteristiche fenotipiche, assume valori positivi, ovvero assume un valore tra (0) (assenza totale di correlazione tra le caratteristiche), ed un qualsiasi valore tendente verso il valore (1) , (massima correlazione tra le caratteristiche), il valore di (r) viene evidenziato in figura con un cerchio di colore Blu. Ad es. l'elevata correlazione positiva tra due caratteristiche viene espressa da un cerchio di grandi dimensioni e colorato con un Blu

intenso, la correlazione positiva media, cerchio di dimensioni medie colorato di celeste, la bassa correlazione positiva cerchio di piccole dimensioni colorato di un celeste sfumato verso il bianco. Se il valore dell'indice (r) assume valori negativi, ovvero assume un valore tra (0) (assenza totale di correlazione tra le caratteristiche), ed un qualsiasi valore tendente verso il valore (-1), (massima correlazione negativa tra le caratteristiche), il valore di (r) viene evidenziato in figura con un cerchio di colore Rosso. Ad es. l'elevata correlazione di segno negativo tra due caratteristiche viene espressa da un cerchio di grandi dimensioni e colorato con un Rosso intenso, la correlazione negativa media, cerchio di dimensioni medie colorato di rosa, la bassa correlazione negativa, cerchio di piccole dimensioni colorato di un rosa sfumato verso il bianco. Il significato di correlazione positiva e negativa è il seguente. Se due caratteri sono altamente correlati positivamente tra di loro, selezionando per un carattere otterrò una risposta positiva per entrambi i caratteri. Viceversa, se due caratteri sono altamente correlati negativamente allora selezionando per un carattere avrò una risposta negativa per l'altro carattere. Ideati illustrati in Figura 1 ci dicono che la caratteristica "Valutazione Generale della Conformazione della Testa" è altamente correlata alla caratteristica "Forma e Posizione dell'occhio". Con quest'ultima caratteristica è correlata positivamente, anche se con un valore di (r) inferiore la caratteristica "Assi cranio facciali". Della stessa entità è anche il valore di (r) tra "Assi cranio facciali" e "Forma e posizione dell'occhio". "Assi Cranio Facciali" ed "Aspetto Generale del corpo". Questo sta ad indicare che la selezione per queste caratteristiche, che definiscono la tipicità fenotipica della Testa o della conformazione generale del Bracco Francese Tipo Pirenei, ha coinvolto una serie di geni che hanno un'influenza comune sul fenotipo di una particolare parte anatomica o una serie di geni influenzanti l'aspetto generale del corpo e che si trovano della condizione di Linkage Disequilibrium, ad esempio si trovano in una stessa regione genomica su di uno stesso cromosoma. Valori di (r) leggermente inferiori ma positivi si riscontrano tra le caratteristiche di "Acquaticità" e "Rapporto", "Desiderio di reperire il selvatico" e "Velocità" "Collaborazione con un altro cane" e "Velocità", "Valutazione della Testa" e "Desiderio di reperire il selvatico". Nel caso di Valori negativi di (r) troviamo mediamente coinvolte le seguenti caratteristiche: "Rapporto" ed "Acquaticità" con "Altezza al Garrese" mentre quest'ultima caratteristica risulta correlata mediamente negativamente con "Forma e posizione dell'occhio" e "Valutazione Generale della testa", così come, anche se con un valore (r) di inferiore rispetto alle caratteristiche precedenti anche il "valore del rapporto Cranio/Muso". In questo caso una selezione per la caratteristica "Altezza al Garrese" sembra che influisca negativamente sulle caratteristiche di tipicità della testa e viceversa.

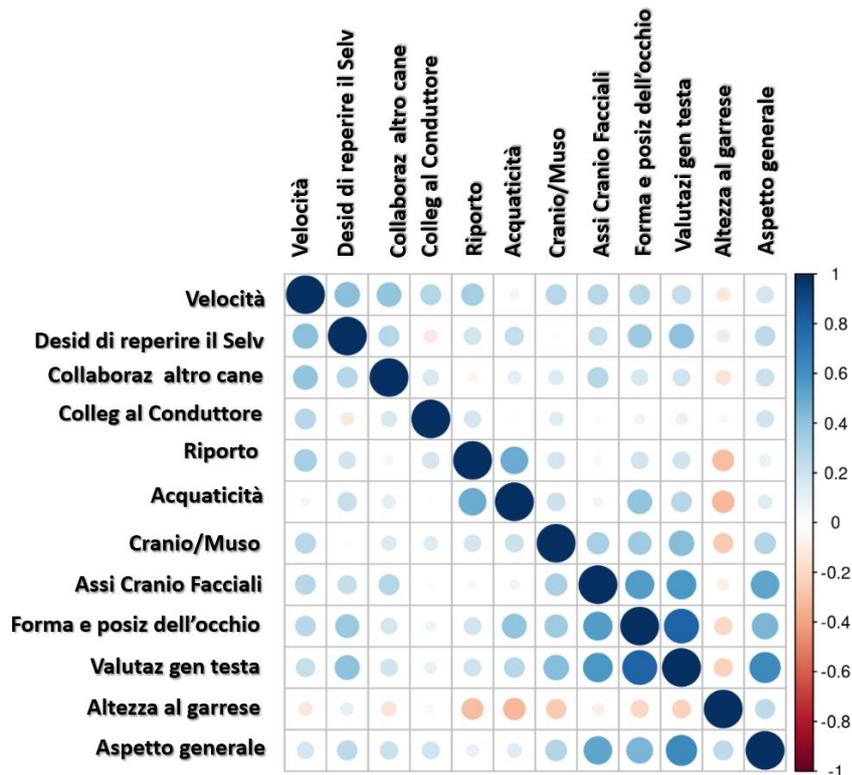


Figura 2. Valori di Correlazione tra le Attitudini Venatorie e le Caratteristiche Morfologiche valutate

6.2.2 Risultati dell'analisi Genome Wide Association Scan

Passando ad analizzare i risultati dell'analisi di Genome Wide Association Scan (GWAS), al fine di stabilire la significatività delle associazioni tra marcatori SNPs e le Caratteristiche Fenotipiche, utilizzeremo una grandezza statistica denominata *p-value*. Minore sarà l'entità del *p-value* e maggiore risulterà la significatività dell'associazione.

I grafici che stiamo per illustrare, sono denominati “*Manhattan plot*”, una tipologia di grafico a dispersione utilizzata per visualizzare un numero elevato di marcatori SNPs.

I grafici “*Manhattan plot*” prendono il nome dalla somiglianza della rappresentazione grafica che restituiscono dei risultati molecolari (localizzazione cromosomica degli SNPs) con lo skyline di Manhattan, costituito da un profilo di grattacieli che sovrasta "edifici" di livello inferiore.

Nei grafici “*Manhattan plot*”, lungo l'asse X sono visualizzate le coordinate genomiche di ciascuno SNP ovvero la loro localizzazione cromosomica, mentre sull'asse Y viene visualizzata la significatività di ogni singolo polimorfismo nucleotidico (SNP) mediante il logaritmo negativo dell'associazione *p-value*; vale a dire che ogni punto sul grafico “*Manhattan plot*” indica sia un singolo marcatore SNP che la propria significatività nell'esprimere un preciso risultato di associazione con una caratteristica fenotipica studiata.

Più il *p-value* risulta basso, maggiore sarà la significatività dell'associazione tra quello SNP la singola caratteristica indagata. In questo studio, come, linea guida, si può tener presente che $-\log_{10}(p\text{-value}) = 3$ corrisponde ad un *p-value* pari a **0.001**. Dunque abbiamo scelto questa soglia come valore di significatività.

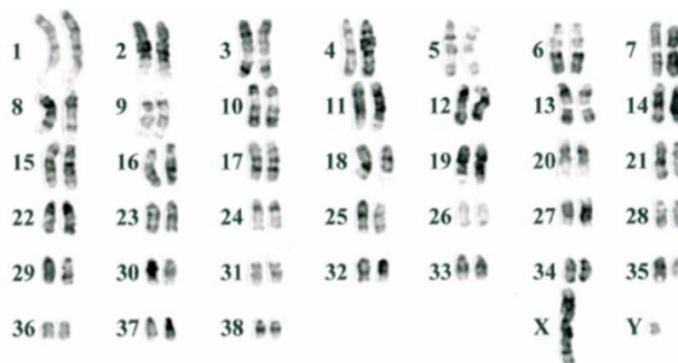
Nei grafici “*Manhattan plot*” che andremo ad illustrare, i valori di significatività degli SNP superiori a questa soglia, stanno ad indicare che esiste un’associazione tra lo SNP e la caratteristica fenotipica presa in considerazione. Ciò è particolarmente vero se, invece di SNP isolati, si evidenziano cluster di SNP significativi (visualizzabili come “colonne” o “picchi” di SNPs sui grafici “*Manhattan plot*”).

E’ doveroso precisare che questo studio (GWAS), è preliminare. Ad oggi, al fine di eliminare le associazioni spurie ed ottenere risultati più robusti, non abbiamo né potuto implementare strategie per controllare l’effetto del “*multiple testing*” (migliaia di SNP testati), né validare i risultati con approcci analitici complementari (es. analisi delle ROH ed analisi Copy Number Variations). Entrambi gli obiettivi saranno oggetto del prosieguo di questo lavoro, e ci permetteranno di raffinare e consolidare i risultati. Tuttavia, risultati ottenuti con l’analisi (GWAS) trovano conferme anche nei risultati presentati nel capitolo 3 per le analisi ROH e nel capitolo 4 per le analisi Copy Number Variations ed aprono la via alla possibilità di nuovi e promettenti studi di approfondimento sui singoli cromosomi. Possiamo dunque considerare i risultati che stiamo per presentare come delle prime indicazioni utili al prosieguo del nostro studio.

6.2.3 Associazioni tra marcatori SNPs e Caratteristiche fenotipiche

La chiave di interpretazione dei risultati illustrati nei grafici “*Manhattan plot*”, è la seguente:

- Nei grafici sono riportate le localizzazioni cromosomiche dei marcatori SNPs (ciascuno di essi è rappresentato sul grafico da 1 punto) e le significatività delle associazioni tra SNPs e ciascuna delle caratteristiche fenotipiche allo studio.
- Sull’asse delle X le localizzazioni cromosomiche riguardano gli Autosomi ovvero tutti i cromosomi dell’assetto completo della specie *Canis Lupus Familiaris* (78), tranne i cromosomi sessuali (Y ed X). I cromosomi sessuali verranno indagati nel prosieguo dello studio. Sull’asse delle X è riportato un assetto cromosomico (**n**) ovvero aploide composto dalla metà dell’assetto diploide (**2n**) ossia **38** cromosomi anziché **76**. Le localizzazioni SNPs sui cromosomi sono ordinate a partire dal cromosoma **1** il più grande in dimensioni di tutto l’intero assetto fino al più piccolo, il cromosoma **38**. A titolo esplicativo si riporta un assetto cromosomico completo.



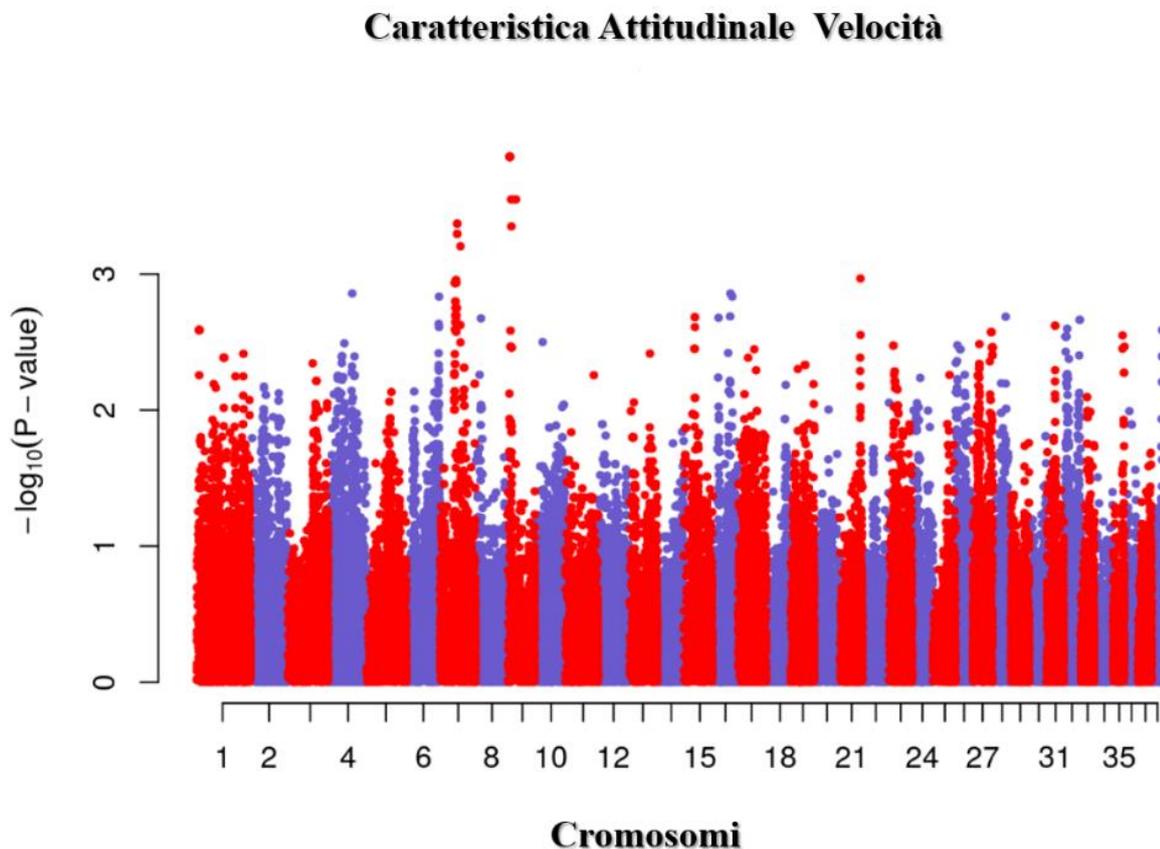
Canis Lupus Familiaris
assetto cromosomico 2n è composto da 78 cromosomi, 76 autosomi e 2 cromosomi sessuali.

- Sull'asse delle Y sono riportati i *p-value*, ovvero i valori di significatività delle associazioni esistenti tra marcatori SNPs e fenotipi espressi in base logaritmica negativa $-\log_{10}(p\text{-value})$ scegliendo come soglia di significatività $-\log_{10}(p\text{-value}) = 3$ corrispondente ad un *p-value* pari a **0.001**. Valori di significatività superiori alla soglia stabilita risultano altamente significativi

Nei grafici “*Manhattan plot*”, i cromosomi dispari sono colorati in rosso mentre quelli pari in viola.

6.2.4 Associazioni tra marcatori SNPs e Caratteristiche Attitudinali -Venatorie

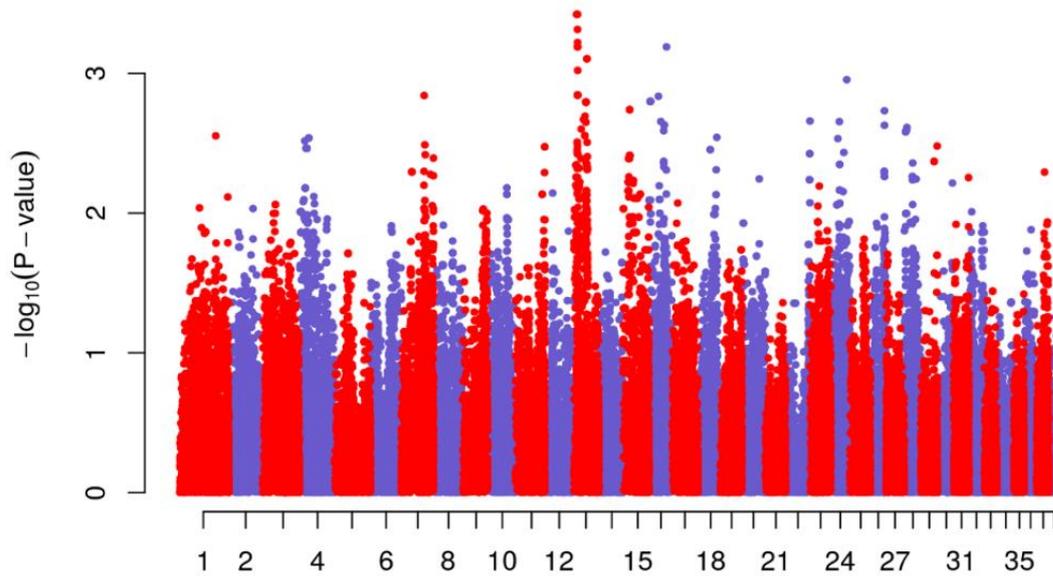
Per la caratteristica attitudinale “*Velocità*”, gli SNPs che risultano più significativamente associati sono localizzati sul cromosoma 7, e con un livello maggiore di significatività, sul cromosoma 9.



Per la caratteristica attitudinale “*Desiderio di reperire il Selvatico*”, gli SNPs che risultano associati in maniera più significativa sono localizzati sul cromosoma 16, e con un livello maggiore di significatività, sul cromosoma 13. Per la caratteristica attitudinale “*Collaborazione con un altro cane*”, gli SNPs che risultano più significativamente associati sono localizzati sui cromosomi 10, 15, 17, 18, 22, 24, 27 e 33 superando in diversi di questi la soglia di significatività prestabilita $-\log_{10}(p\text{-value}) = 3$. La Caratteristica “*Collegamento al Conduttore*” vede diversi SNPs associati a dei livelli di significatività elevati che superano addirittura la soglia 4 come per lo SNP localizzato sul cromosoma 32. In dettaglio la localizzazione cromosomica per gli SNPs più significativamente associati alla caratteristica è la seguente: Cromosomi 1, 3, 5, 7, 10, 12, 22, 23, 26, 32 e 35. Questa numerosità di localizzazioni su cromosomi diversi potrebbe far ipotizzare che

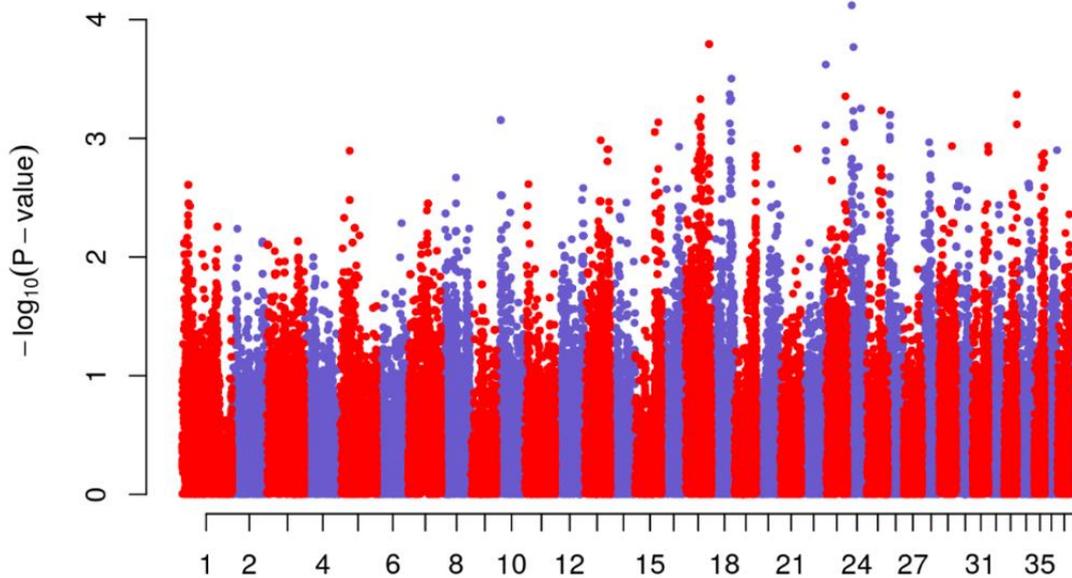
l'attitudine "*Collegamento con il Conduttore*" sia un carattere geneticamente complesso e presenti una base poligenica.

Caratteristica Attitudinale Desiderio di reperire il selvatico



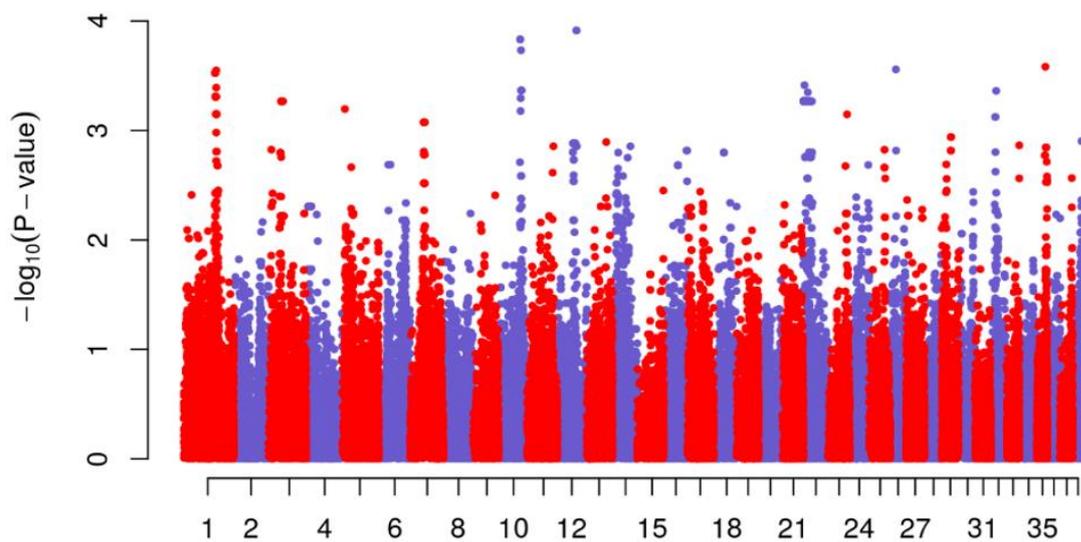
Cromosomi

Caratteristica Attitudinale Collaborazione con un altro cane



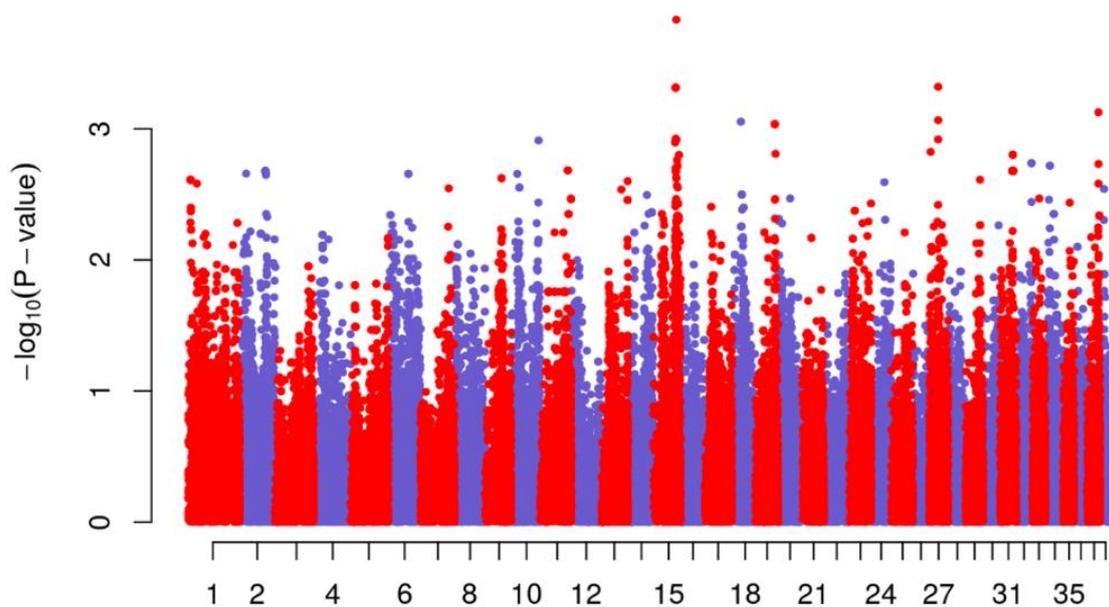
Cromosomi

Caratteristica Attitudinale Collegamento al Conduttore



Cromosomi

Caratteristica Attitudinale Riporto

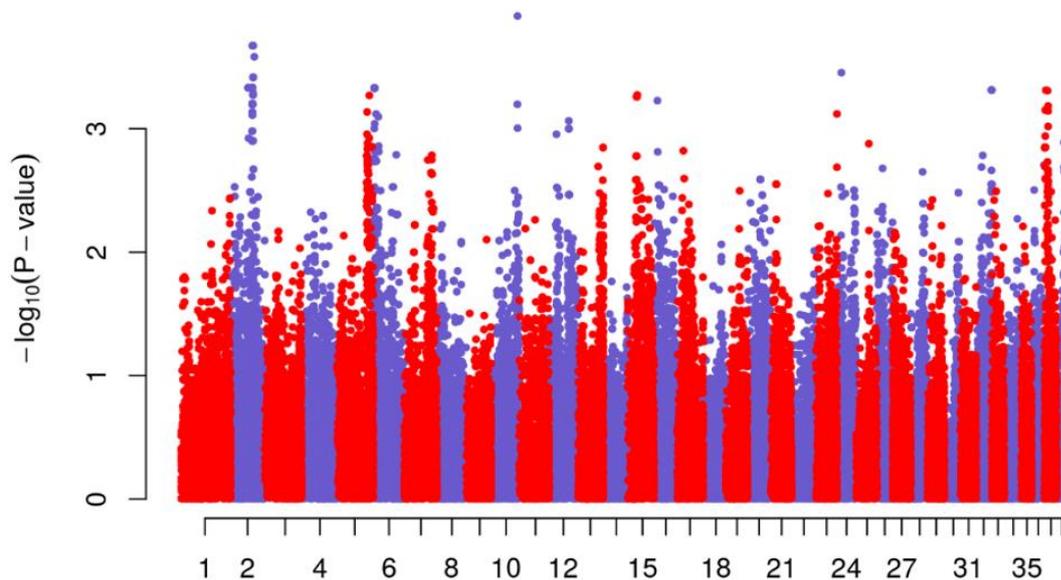


Cromosomi

La Caratteristica Attitudinale “**Riporto**” vede SNPs associati con livelli anche altamente significativi e localizzati solo sui cromosomi 15, 27 e 37

Per la Caratteristica Attitudinale “**Acquaticità**”, diversi marcatori SNPs superano la soglia di associazione significativa e si trovano localizzati sui cromosomi: 2, 5, 6,10, 15, 16, 23, 24, 32 e 37. Anche in questo caso, le localizzazioni di segnali positivi su così tanti cromosomi diversi potrebbe far ipotizzare che l’attitudine sia un carattere geneticamente complesso e presenti una base poligenica.

Caratteristica Attitudinale Acquaticità

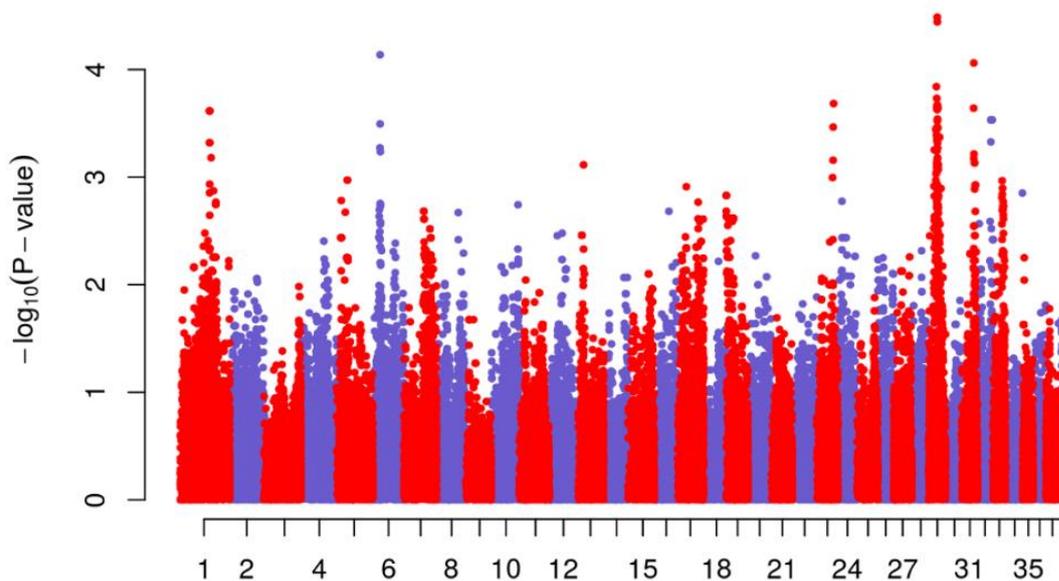


Cromosomi

6.2.5 Analisi delle associazioni tra marcatori SNPs e Caratteristiche Morfologiche

Per la Caratteristica “*Rapporto Cranio/Muso*” ovvero tra le dimensioni del cranio e la lunghezza del muso, diversi SNPs risultano associati con elevati valori di significatività ed oltrepassano la soglia di significatività addirittura in cluster come quelli localizzati sul cromosoma 29. Questo segnale è molto forte e meriterà di essere approfondito con ulteriori studi futuri. Gli altri SNPs interessanti risultano localizzati sui cromosomi 1, 6, 23, 31 e 32.

Caratteristica Morfologica Rapporto Cranio/Muso



Cromosomi

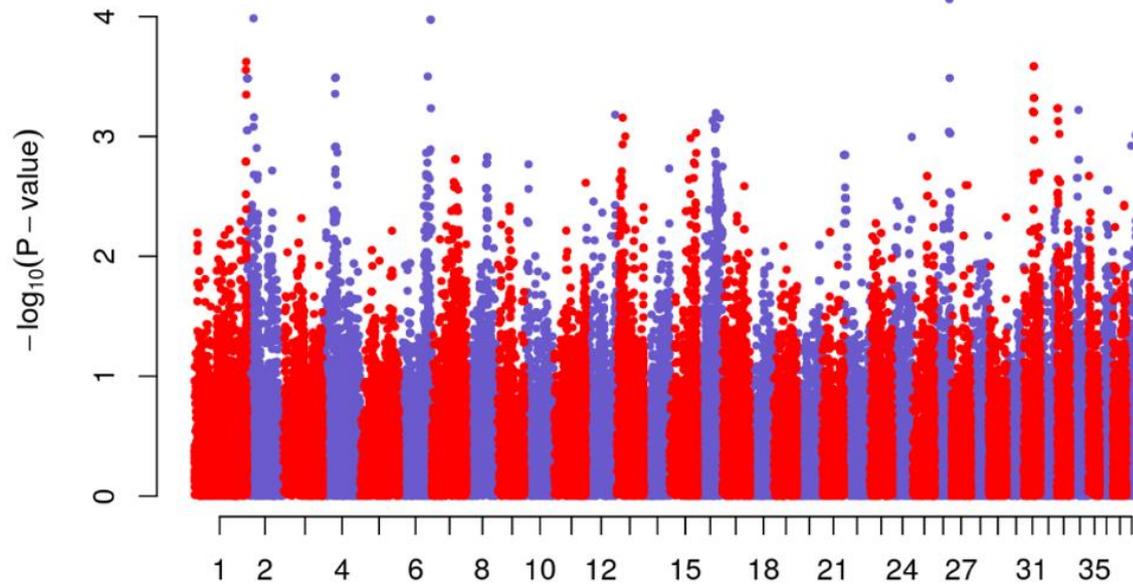
La Caratteristica “*Assi Cranio Facciali*” è presente su tutti gli standard di razza perché definisce la tipicità della testa per una data razza. Gli SNPs associati con una forte significatività che oltrepassa la soglia stabilita sono localizzati sui cromosomi: 1, 2, 4, 6, 26, 31, 33.

La Caratteristica “*Forma e Posizione dell’Occhio*” costituisce uno dei principali obiettivi da raggiungere sullo standard di razza del Bracco Francese Tipo Pirenei. Anche in questo caso alcuni SNPs superano di 2 punti la soglia stabilita di significatività e si trovano addirittura in un cluster entro la soglia stabilita sul cromosoma 5 e 13. Altri SNP presentando livelli di significatività appena al di sopra della soglia e sono localizzati sui cromosomi 2, 4, e 22.

La Caratteristica “*Conformazione Generale della Testa*”, è un importante parametro di tipicità nella valutazione fenotipica e vede associati anche con elevati livelli di significatività dei cluster di SNPs sui cromosomi: 4, 5, 13 e 22.

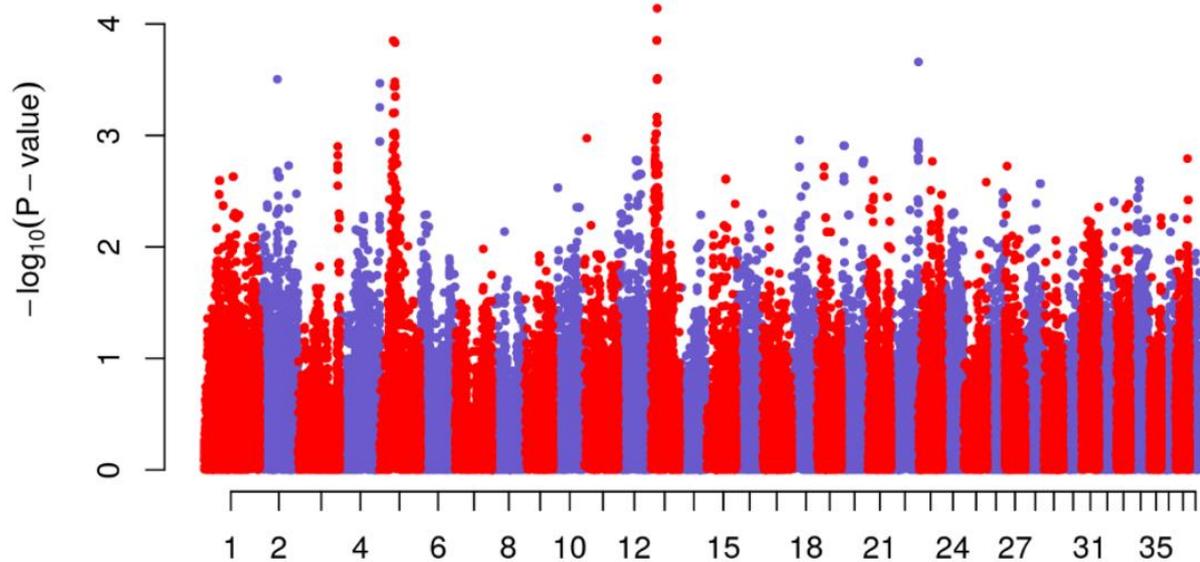
Per “*Atezza al Garrese*” sono pochi gli SNPs che risultano associati e superano di poco la soglia stabilita per la significatività. Sono localizzati sui cromosomi: 3, 4, 10, 15, 24 e 38.

Caratteristica Morfologica Assi Cranio Facciali



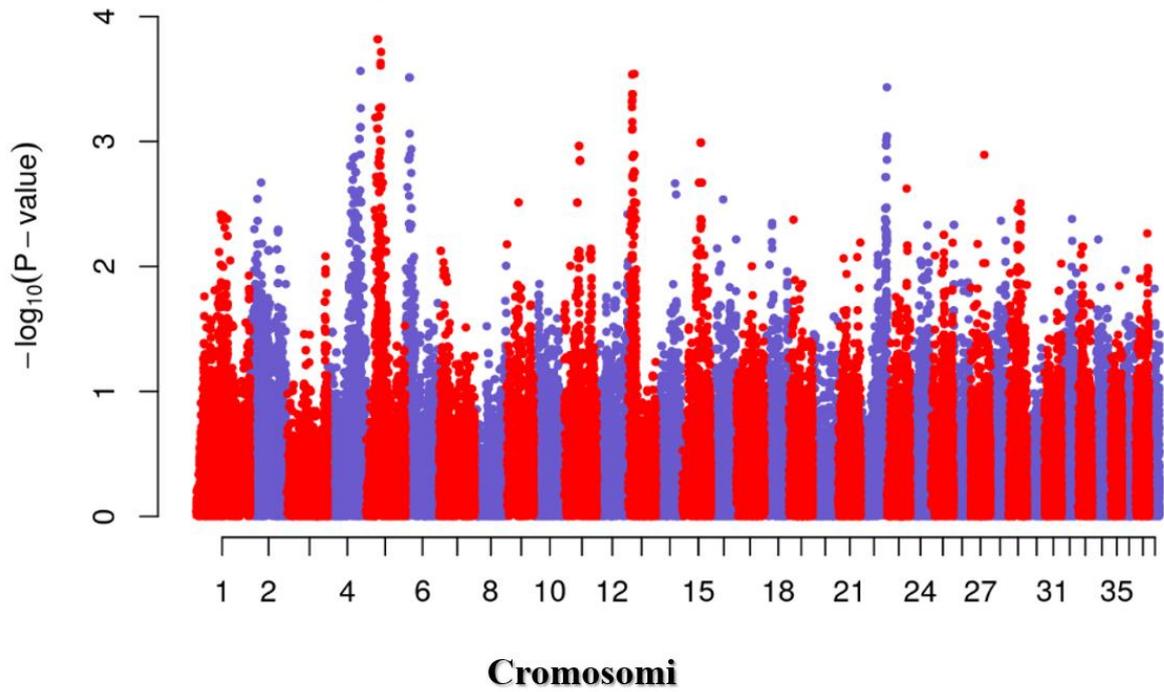
Cromosomi

Caratteristica Morfologica Forma e Posizione dell'occhio

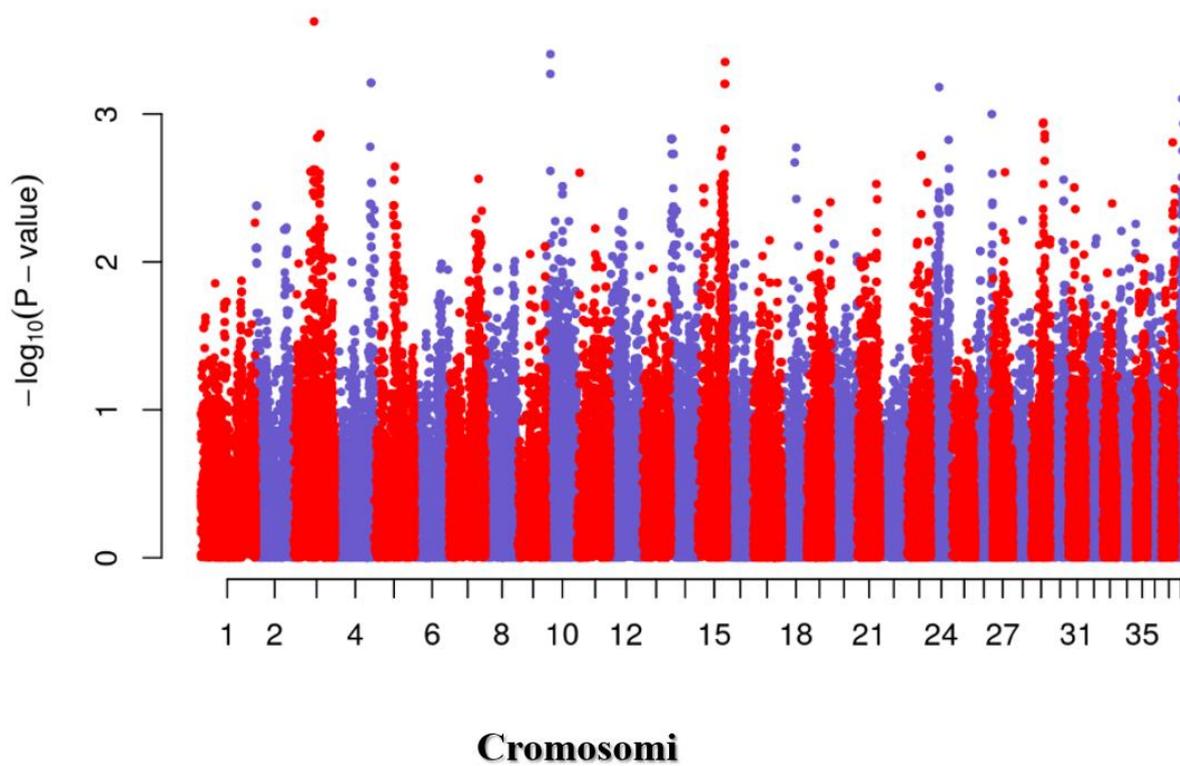


Cromosomi

Caratteristica Morfologica Conformazione Generale della testa

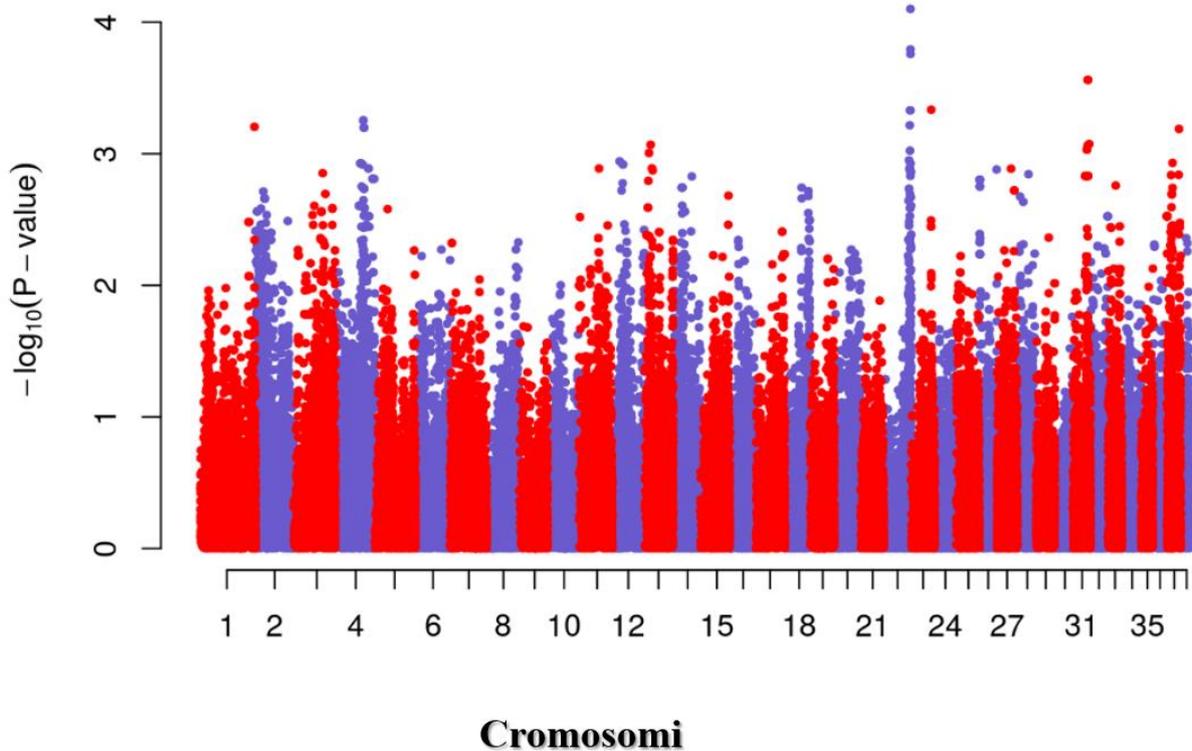


Caratteristica Morfologica Altezza al Garrese



La Caratteristica **“Tipologia Generale”** indica quell’insieme di caratteristiche morfologiche che, se in un individuo sono ben armonizzate tra di loro, lo rendono rispondente allo standard di razza e riassume quanto un esperto di razza si attende come risultato della selezione. Anche per questa caratteristica alcuni SNPs sono associati con elevati livelli di significatività che superano di 1 punto il valore della soglia di significatività stabilita e risultano localizzati in cluster sul cromosoma 22. Nei capitoli precedenti abbiamo evidenziato anche con altre metodiche di indagine un forte segnale su questo cromosoma. La Caratteristica **“Tipologia Generale”**, raccoglie in se tante altre caratteristiche, e definisce una precisa tipologia morfologica a cui si tende con la selezione; il fatto che con essa siano associati in cluster diversi SNPs ci incoraggia a pensare che su questo cromosoma si trovino le basi genetiche che determinano la struttura, la muscolatura le dimensioni del Bracco Francese Tipo Pirenei. Un’indagine più approfondita di questo aspetto sarà oggetto di studi futuri.

Caratteristica Morfologica Tipologia Generale



6.3 CONCLUSIONI

I risultati dell'analisi Genome -Wide Association Scan (GWAS), sono i primi mai ottenuti per la razza Bracco Francese Tipo Pirenei. Diverse evidenze ci indicano la presenza sul cromosoma 22, dei 48 cani oggetto di questo studio, di un segnale la cui consistenza è avvalorata da elevati livelli di significatività riguardanti l'associazione di diversi marcatori SNPs con alcune importanti caratteristiche Attitudinali-Venatorie e Morfologiche quali: **“Desiderio di Reperire il Selvatico”**, **“Collegamento al Conduttore”**, **“Forma e posizione dell'occhio”**, **“Conformazione Generale della Testa”**, **“Altezza al Garrese”** e **“Tipologia Generale”**. Altri Marcatori SNPs situati su altri cromosomi ad es. il 5 ed il 13, risultano fortemente associati, addirittura in cluster, sempre alla caratteristica **“Conformazione Generale della Testa”**. Ancora forti segnali si trovano sui cromosomi 5 e 13 per la caratteristica **“Forma e posizione dell'occhio”**. Per la caratteristica **“Assi Cranio Facciali”** i cromosomi 1, 2, 6 e 26 risultano ugualmente di grande interesse. Per il **“Rapporto Cranio/Muso”** il cromosoma 29 presenta addirittura interi cluster di SNPs associati e con valori elevati di significatività. Per le Caratteristiche Attitudinali-Venatorie sempre il cromosoma 22 evidenzia dei forti segnali associativi tra SNPs e **“Desiderio di Reperire il Selvatico”**, **“Collegamento al Conduttore”**, **“Collaborazione con un altro cane”**. Altri SNPs sono associati in modo molto significativo all' **“Acquaticità”** sui cromosomi 2, 5, 6 e 37, al **“Collegamento al Conduttore”**, sui cromosomi 1,10, 22 e 32 alla **“Collaborazione con un altro cane”** sui cromosomi 17, 18, 24 al **“Rapporto”** cromosomi 15, 27 e 37 alla **“Velocità”** sui cromosomi 7 e 9.

E' doveroso precisare che i risultati di questo studio sono preliminari in quanto devono ancora passare al vaglio di ulteriori e più stringenti metodiche analitiche che permetteranno di raffinarli e consolidarli.

Le associazioni evidenziate tra SNPs e le caratteristiche fenotipiche, confermano che la selezione condotta fino ad oggi ha agito più intensamente su quelle collegabili a precise attitudini venatorie e ad aspetti morfo-funzionali e ci forniscono indicazioni riguardo a quali cromosomi poter andare a studiare per poterne individuare le basi genetiche. Auspichiamo che a tale scopo a breve possano essere avviati ulteriori studi di approfondimento.

6.4 BIBLIOGRAFIA

1. Candidate genes and functional noncoding variants identified in a canine model of obsessive-compulsive disorder. Tang R, Noh HJ, Wang D, Sigurdsson S, Swofford R, Perloski M, Duxbury M, Pattersson EE, Albright J, Castelhana M, et al:
2. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma. Savage SA, Mirabello L, Wang Z, Gastier-Foster JM, Gorlick R, Khanna C, Flanagan AM, Tirabosco R, Andrulis IL et al: Nat Genet 2013, 45:799–803.
3. Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog
Jessica J. Hayward, Marta G. Castelhana, Kyle C. Oliveira, Elizabeth Corey, Cheryl Balkman, Tara L. Baxter, Margret L. Casal, Sharon A. Center, et al. : Nature Communications 2015 - 7:10460
DOI: 10.1038/ncomms10460 |www.nature.com/naturecommunications

7. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE PER LA GESTIONE DELLA RAZZA

7.1 CONCLUSIONI

Dagli studi condotti su pedigree risulta che l'inbreeding medio, osservato per tutto il database Bracco Francese Tipo Pirenei, è in linea con quanto osservato in altre razze. Un aspetto molto positivo è che il trend dell'inbreeding negli ultimi anni non è cresciuto.

Per la prima volta, la variabilità genetica della razza è stata indagata mediante l'impiego di marcatori genomici di ultima generazione SNPs attraverso metodiche analitiche innovative che permettono di scansionare l'intero genoma della razza. Questo nuovo approccio di studio ha consentito di rilevare la reale variabilità genetica esistente all'interno della razza. I risultati ottenuti hanno consentito il confronto tra i valori dell'inbreeding genealogico e molecolare ed evidenziato come i livelli di Inbreeding stimati a partire dalle analisi ROH siano relativamente contenuti e risultino comparabili con quelli presenti nelle altre razze canine confermando la validità delle informazioni contenute nei pedigree.

Dall'analisi dei parametri che stimano la variabilità genetica a livello genomico, si evidenzia come questa risulti sufficientemente ampia con un'estensione del Linkage Disequilibrium inferiore rispetto alla media ed una dimensione del (N_e) superiore rispetto alla media, riscontrata in tutte le altre razze canine FCI allo studio presenti nel Database LUPA. Sempre in relazione alle razze FCI, il Bracco Francese Tipo Pirenei ha dimostrato una chiara differenziazione genetica, confermando quanto suggeriscono le informazioni storiche disponibili ovvero che il Bracco Francese Tipo Pirenei sia originato da antiche popolazioni di cani da ferma provenienti dal sud ovest dell'attuale Francia.

L'analisi delle CNVR evidenziano come queste si sovrappongono a 159 geni annotati alcuni dei quali risultano associati a caratteristiche fenotipiche ben note nella specie canina. Di particolare interesse risultano i geni coinvolti nella differenziazione dei miociti, nello sviluppo funzionale del muscolo scheletrico e nei processi biologici più significativi quali lo sviluppo della struttura muscolare, la differenziazione delle cellule muscolari e la differenziazione delle cellule muscolari striate. Questi interessanti risultati lasciano ipotizzare che la selezione attuata nel Bracco Francese Tipo Pirenei potrebbe aver modellato, almeno in parte, il background genetico della razza e, di conseguenza, la frequenza / presenza dei CNVR rilevati nei suddetti geni.

Un altro interessante risultato è costituito dal segnale ROH rilevato sul cromosoma 22. Si può ipotizzare che tale segnale possa essere associato a particolari attitudini venatorie oppure a caratteristiche morfologiche che nel tempo sono state selezionate.

I risultati dell'analisi Genome -Wide Association Scan (GWAS), sono i primi mai ottenuti per la razza Bracco Francese Tipo Pirenei ed in generale per l'intera Specie Canis Familiaris. Diverse evidenze ci indicano, anche con questo approccio di studio, la presenza sul cromosoma 22 di un segnale la cui consistenza è avvalorata da elevati livelli di significatività riguardanti l'associazione di diversi marcatori SNPs con alcune importanti caratteristiche Attitudinali-Venatorie e Morfo-Funzionali selezionate dal Club Italiano Bracco Francese. L'analisi ha evidenziato molti SNPs, addirittura in clusters, localizzati su diversi altri cromosomi dell'intero assetto, presentanti elevati livelli di significatività oltrepassanti la soglia di significatività stabilita per associazioni con tutte le caratteristiche fenotipiche allo studio.

7.2 PROSPETTIVE PER LA GESTIONE DELLA RAZZA

Monitorare l'inbreeding e la variabilità genetica è importante per mantenere la salute genetica generale della razza. Pertanto, considerando che la variabilità genetica è un fattore intrinseco che influenza la capacità adattativa e la resilienza delle popolazioni, gli approcci genomici di studio delineati grazie al presente progetto di ricerca rappresentano strumenti utili per l'implementazione delle future strategie di selezione. Gli allevatori devono essere consapevoli dei rischi associati all'eccesso di inbreeding e delle opportunità offerte dalla genomica, per poter progettare mirati piani di accoppiamento che favoriscano e mantengano la variabilità genetica nella razza Bracco Francese Tipo Pirenei. Seguendo le linee guida delineate dai risultati ottenuti, la variabilità genetica potrà essere non solo conservata ed ampliata ma anche miratamente utilizzata se verrà accuratamente gestita.

Se il segnale evidenziato dalle analisi ROH sul cromosoma 22 verrà confermato da ulteriori indagini, questo preciso cromosoma costituirà l'oggetto di future ricerche per tentare di individuare le basi genetiche di interessanti caratteristiche fenotipiche che il C.I.B.F. sarà interessato a selezionare.

Le associazioni tra gli SNPs e le Caratteristiche Fenotipiche, evidenziate mediante l'analisi GWAS, ci forniscono indicazioni riguardo a quali cromosomi poter andare a studiare per poterne individuare le basi genetiche. Auspichiamo che a tale scopo a breve possano essere avviati ulteriori studi di approfondimento.

E' importante sottolineare l'elevato livello culturale e la sensibilità della Presidenza del Club Italiano Bracco Francese C.I.B.F. e degli allevatori. La loro volontà di conoscere la Variabilità Genetica presente nella razza e di contenere i livelli di Inbreeding, è stata di fondamentale importanza nel rendere possibile l'attuazione del presente progetto di ricerca.

8 PRODOTTI DELLA RICERCA

I risultati ottenuti dal progetto di ricerca hanno prodotto le Pubblicazioni Scientifiche elencate di seguito per le quali si riporta una copia di seguito l presente elenco

1. **Genetic variability of the Braque Français Type Pyrénées dog breed assessed by pedigree data.** Cecchi F., Spaterna A., Ragatzu M., Ciampolini R. **Poster** XXI Congresso della Associazione Italiane per la Produzione Animale, Milano 9-12 Giugno **2015**.

2. **Demographic approach on the study of genetic parameters in the dog Braque Français type Pyrénées**

Cecchi F., Paci G., Spaterna A., Ragatzu M., Ciampolini R. **Italian Journal of Animal Science**, **2016** VOL. 15, NO. 1, 30–36 <http://dx.doi.org/10.1080/1828051X.2015.1128689>

3. **Genome-wide diversity and runs of homozygosity in the “Braque Français, type Pyrénées” dog breed**

Salvatore Mastrangelo, Filippo Biscarini, Barbara Auzino, Marco Ragatzu, Andrea Spaterna and Roberta Ciampolini **BMC Res Notes** **2018** 11:13 <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3112-9>

4. **Caratterizzazione Genetica della Razza Bracco Francese “Tipo Pirenei” Allevata In Italia ed analisi comparative con le principali Razze Canine**

Salvatore Mastrangelo, Filippo Biscarini, Marco Tolone, Roberta Ciampolini

Presentazione orale XII Convegno Nazionale Biodiversità 2018 Campus A. Saliceti, Università degli Studi di Teramo Teramo 13-15 Giugno 2018

5. **Genomic characterization of the Braque Français type Pyrénées dog and relationship with other breeds**

Salvatore Mastrangelo, Filippo Biscarini, Marco Tolone, Barbara Auzino, Marco Ragatzu, Andrea Spaterna, Roberta Ciampolini **PLoS ONE** 13(12): e0208548.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208548>

6. **A genome-wide detection of copy number variations using SNP genotyping arrays in Braque Français type Pyrénées dog**

Rosalia Di Gerlando, Salvatore Mastrangelo, Maria Teresa Sardina, Marco Ragatzu, Andrea Spaterna, Baldassare Portolano, Filippo Biscarini, Roberta Ciampolini **2019**

Inviato alla rivista scientifica **ANIMALS** attualmente sotto revisione