

STUDIO PRELIMINARE DELLE PARTICOLARITÀ A SEDE FISSA ATTRAVERSO L'ANALISI DEL GENOTIPO DEI MANTELLI

ABSTRACT

Il Maremmano è una razza equina autoctona italiana probabilmente discendente dai cavalli utilizzati dagli Etruschi (VI secolo a.C.). L'ambiente selvaggio e difficile della Maremma ha plasmato questo animale che è diventato il più importante cavallo da sella autoctono italiano, dotato di bell'aspetto e ottima conformazione. L'Associazione Nazionale Allevatori di Razza Maremmana (A.N.A.M.) detiene il Libro Genealogico (L.G.) e si occupa dei piani di tutela, promozione e miglioramento genetico della razza. Il mantello ammesso dall'Associazione per l'iscrizione al L.G. di razza è il baio o morello nei maschi mentre nelle femmine è tollerato anche il sauro; inoltre non è considerata auspicabile un'eccessiva estensione delle macchie bianche (particolarità a sede fissa) sulla testa e sugli arti che è sgradita agli allevatori e mal valutata dai giudici e dagli esperti di razza.

È ampiamente noto che nel cavallo il colore del mantello di base è determinato principalmente dai polimorfismi del recettore della melanocortina-1 (MC1R) e dei loci della proteina di segnalazione Agouti (ASIP), che creano un mantello morello, baio o sauro. Altresì alcuni studi scientifici hanno messo in evidenza che MC1R influenza l'entità dei segni bianchi più di altre mutazioni in loci diversi (KIT, MITF). Inoltre si è scoperto che le diverse combinazioni per i 2 alleli più comuni nei loci MC1R (E/e) e ASIP (A/a) sono interessanti per l'entità e l'estensione dei segni bianchi.

Utilizzando l'analisi del genotipo dei mantelli gli obiettivi della presente ricerca sono:

- 1. caratterizzare in modo obiettivo il dato fenotipico dei mantelli,**
- 2. valutare preliminarmente le particolarità a sede fissa (“estensione del bianco”)**
- 3. produrre preliminarmente un indice genetico per il “carattere” integrato con il genotipo del mantello.**

Per i primi due obiettivi sono stati considerati 1.032 soggetti (799 bai, 211 morelli e 22 sauri), che disponevano della segnalazione delle particolarità a sede fissa rilevate dagli esperti di razza e riportati nei rispettivi certificati di identificazione e delle loro genotipizzati ai loci ASIP e MC1R.

Per il terzo obiettivo sono state prese in esame 639 valutazioni per il “carattere” rilevate durante le diverse edizioni dei Performance test organizzate dall'A.N.A.M.

Un file genealogico, comprendente 17.478 cavalli (10.222 femmine e 7.256 maschi) fornito dall'A.N.A.M. è stato utilizzato per eseguire le analisi necessarie al raggiungimento dei suddetti obiettivi.

Le genotipizzazioni ai loci ASIP e MC1R hanno permesso di caratterizzare in modo obiettivo il dato fenotipico relativo al colore del mantello, rilevato durante il segnalamento del soggetto precedentemente all'iscrizione al L.G..

L'equilibrio di Hardy-Weinberg ai due loci, analizzato mediante il test statistico del “*chi-quadrato*”, ha mostrato che questi non sono in equilibrio ($P \leq 0,001$) e ciò è probabilmente dovuto al fatto che è stata effettuata dall'A.N.A.M., come detto, una selezione fenotipica contro il mantello sauro.

Attraverso l'impiego di un modello lineare è stato testato il trait “*estensione del bianco*” e le diverse combinazioni dei due alleli ai loci ASIP e MC1R. Le combinazioni “AaEE” e “AAEE” per il baio e

quelle “aaEE” e “aaEe” per il morello sono risultate statisticamente significative per una minor “estensione delle bianco”.

Il file genealogico, è stato poi utilizzato per creare un BLUP Animal Model per stimare le componenti di varianza per il trait “*estensione del bianco*” considerando come effetti fissi le uniche quattro combinazioni, risultate statisticamente significative, degli alleli nei due loci.

L’ereditabilità genetica del trait “*estensione del bianco*” è risultata elevata e pari a $0,53 \pm 0,07$. Questi risultati incoraggiano a prendere in considerazione l’attuale genotipizzazione dei loci ASIP e MC1R, attualmente utilizzati solo contro il mantello sauro, anche per limitare l’estensione delle macchie bianche programmando gli accoppiamenti.

Lo stesso file genealogico è stato impiegato per stimare un indice genetico BLUP Animal Model (EBV) relativo al trait “**carattere**” rilevato in Performance Test per 639 soggetti, integrandolo con il rispettivo genotipo del mantello.

L’ereditabilità stimata è risultata pari a 0,16 e la ripetibilità uguale a 0,62. L’accuratezza media dell’indice è risultata pari a 0,54. I bassi valori di accuratezza invitano ad aumentare il campione per poter integrare gli indici genetici con il genotipo del mantello.

La stima dell’Indice genetico “carattere-genotipo” è stata inserita in tre modelli lineari che tenevano conto dei fattori: *ASIP*, *MC1R* e colore del mantello.

I risultati dello studio hanno evidenziato la presenza di una correlazione tra il locus *ASIP* e il carattere, per cui i soggetti con mantello morello sembrerebbero avere un comportamento “*diverso*” rispetto agli altri. Anche in letteratura è stato riscontrato un risultato simile da Jacobs et al. (<https://doi.org/10.1093/jhered/esw007>), che ha trovato una dipendenza significativa del comportamento dal genotipo al locus *ASIP*. Secondo questo studio, un cavallo morello (aa) è più “padrone di sé” e preferibile in una situazione “solitaria” e sembrerebbe avere un temperamento più indipendente rispetto ad un cavallo baio (Aa, AA).

Introduzione

La Maremma è una vasta regione geografica Italiana compresa fra Toscana e Lazio che si affaccia sul Mar Tirreno. Oltre ad una zona centrale, che si spinge sino alle pendici del Monte Amiata, la Maremma comprende una vasta fascia costiera che si estende tra la provincia di Grosseto e quella di Viterbo. In questo areale si hanno testimonianze di un florido allevamento di cavalli sin dalla civiltà etrusca (VI sec. a.C.). Nel corso dei secoli, il Maremmano, subì le modificazioni dettate inizialmente da una forte selezione naturale. L’ambiente sfavorevole e selvaggio ha esaltato quelle caratteristiche che ancora oggi rappresentano il fondamento e l’identità di quello che è diventato il cavallo maremmano: resistenza, robustezza e frugalità. Per questi motivi è stata sempre attribuita una grande attenzione all’allevamento di questa razza. Nei secoli scorsi l’Italia è stata il palcoscenico di migrazioni, incursioni, guerre ed invasioni compiute da altre popolazioni mediterranee che arrivando con la loro cavalleria hanno permesso che il cavallo maremmano fosse “insanguato” con sangue arabo, berbero e andaluso. Tale evento ha plasmato anche geneticamente questa razza e ha contribuito a legarla alla storia patria rendendola il più importante cavallo da sella autoctono e una risorsa culturale nazionale.

Dopo la seconda guerra mondiale, in seguito alla cessazione delle richieste di rimonta da parte dell’esercito ed al massiccio sviluppo della motorizzazione, la consistenza della razza diminuì enormemente, passando dalle 12000 unità censite negli anni ’40 alle circa 5000 del 1950 finché negli

anni '70 rinacque un nuovo interesse per questa razza in ragione della sua versatilità d'impiego: monta da lavoro, equiturismo e sport equestri.

Sin dalla sua istituzione l'A.N.A.M. ha scelto di adottare le più moderne pratiche per la gestione dei programmi di selezione, di miglioramento genetico e di salvaguardia genetica avvalendosi di una stretta collaborazione tecnica e di supporto scientifico con il Centro di Ricerca sul Cavallo Sportivo (C.R.C.S.) dell'Università degli Studi di Perugia.

L'A.N.A.M. è stata tra le prime associazioni allevatori ad impiegare analisi molecolari a supporto dei piani di selezione e delle azioni di miglioramento genetico.

Nel 2005 attraverso il C.R.C.S. è stata creata una banca del DNA che ad oggi conserva circa 2000 campioni, con i quali è stato possibile genotipizzare i soggetti iscritti al L.G per i loci *ASIP* e *MC1R*, che determinano il colore dei mantelli di base: baio, sauro e morello a cui è attribuita particolare importanza nella razza Maremmana.

Tutti i soggetti che partecipano al Performance Test vengono testati per questi alleli poiché nell'allevamento di questa razza il sauro è un carattere fenotipico non desiderato al contrario del morello. Inoltre non è auspicabile un'eccessiva estensione delle macchie bianche sulla testa e sugli arti che è sgradita agli allevatori e mal valutata dai giudici e dagli esperti di razza.

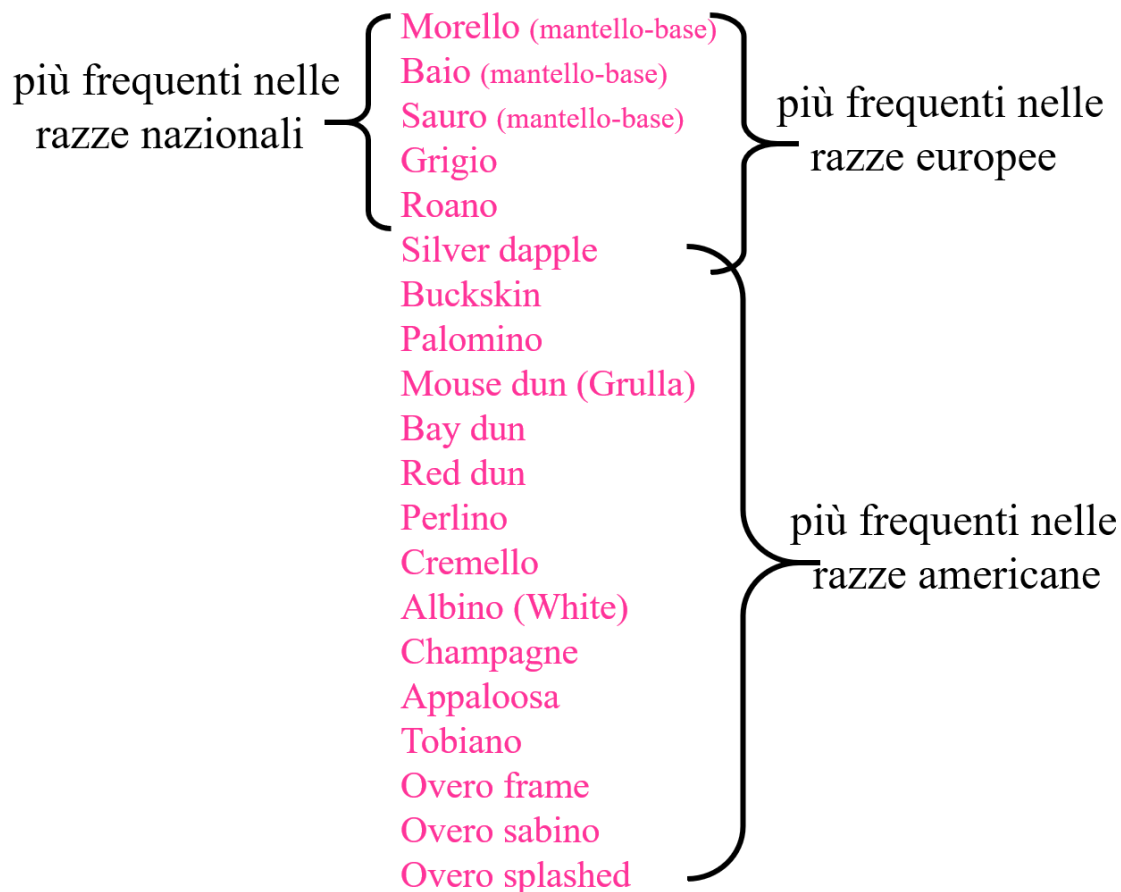
GENOTIPI E FENOTIPI DEL COLORE DEL MANTELLO DEL CAVALLO

La colorazione del mantello, unitamente ad altre caratteristiche, ha assunto un'importanza rilevante soprattutto a partire dalla seconda metà dell'Ottocento, in cui si è assistito a una standardizzazione delle caratteristiche fenotipiche di ogni razza. Questo ha portato un'attività di selezione che si è rivolta verso caratteri esteriori tipici della razza; oggi il possesso di questi caratteri ha una notevole rilevanza nella scelta dei riproduttori e può costituire motivo di esclusione dai Libri genealogici e dai Registri anagrafici, poiché costituisce la principale caratteristica distintiva di appartenenza alla razza.

Tutte le caratteristiche che si manifestano in un individuo, come il colore del mantello, sono l'espressione di un patrimonio genetico ben definito che lo determina. Il colore del mantello ha un significato primario per l'identificazione del cavallo ed è anche il primo indicatore di una probabile parentela tra individui. È molto probabile che il colore ancestrale del mantello dei cavalli fosse basato sulla riga mulina (DUN), il quale conferiva una maggiore protezione mimetica nei confronti dei predatori; successivamente i cavalli hanno evoluto una vasta gamma di colori del mantello. Lo studio del controllo genetico del colore del mantello iniziò nei primi anni del Novecento, il quale è un carattere mendeliano di tipo qualitativo, sostenuto da pochi geni.

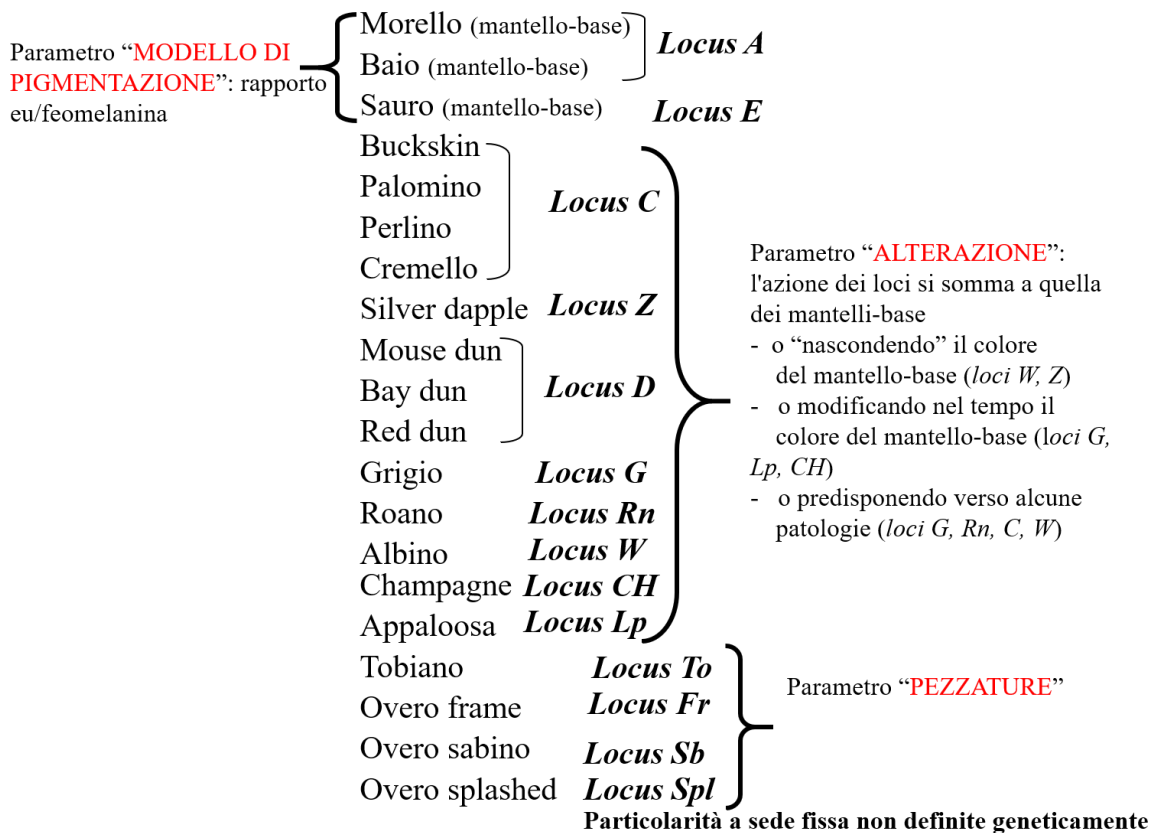
CLASSIFICAZIONE FENOTIPICA E GENOTIPICA DEL COLORE DEL MANTELLO DEL CAVALLO

Classificazione Fenotipica



Sovrapposizione tra alcuni fenotipi di mantelli
Particolarità a sede fissa
Fenotipo dei mantelli possibili a seconda dell'accoppiamento

Classificazione Genotipica



Mantello	Locus													
	E	A	C	G	Rn	Z	D	W	CH	Lp	To	Fr	Sb	Spl
morello	E-	aa	CrCr	gg	mm	zz	dd	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
baio	E-	A-	CrCr	gg	mm	zz	dd	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
sauro	ee	--	CrCr	gg	mm	--	dd	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
buckskin	E-	A-	Crcr	gg	mm	zz	dd	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
palomino	ee	--	Crcr	gg	mm	--	dd	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
perlino	E-	--	crcr	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
cremello	ee	--	crcr	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
silver dapple	E-	A-/aa	Cr-	gg	mm	Z-	--	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
mouse dun	E-	aa	Cr-	gg	mm	zz	D-	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
bay dun	E-	A-	CrCr	gg	mm	zz	D-	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
red dun	ee	--	CrCr	gg	mm	zz	D-	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
grigio	--	--	Cr-	G-	mm	--	--	ww	chch	--	--	--	--	--
roano	--	--	Cr-	gg	Rnm	--	--	ww	chch	--	--	--	--	--
albino	--	--	--	--	--	--	--	Ww	--	--	--	--	--	--
champagne	--	--	Cr-	gg	mm	--	dd	ww	CH-	lppl	toto	frfr	sbsb	splspl
appaloosa	--	--	Cr-	gg	mm	zz	dd	ww	chch	Lp-	toto	frfr	sbsb	splspl
tobiano	--	--	Cr-	gg	mm	zz	dd	ww	chch	lppl	To-	frfr	sbsb	splspl
overo frame	--	--	Cr-	gg	mm	zz	dd	ww	chch	lppl	toto	Frfr	sbsb	splspl
overo sabino	--	--	Cr-	gg	mm	zz	dd	ww	chch	lppl	toto	frfr	Sb-	splspl
overo splashed	--	--	Cr-	gg	mm	zz	dd	ww	chch	lppl	toto	frfr	sbsb	Spl-

In rosso: alleli caratterizzanti il colore del mantello
- = qualsiasi allele

STUDI DI GENETICA MOLECOLARE

Negli ultimi anni, sono state utilizzate la genomica comparativa e la scansione dell'intero genoma per sviluppare test del DNA per studiare le diverse varietà di colori del mantello del cavallo. Sono state utilizzate mappe geniche e approcci comparativi per assegnare diversi caratteri del colore del mantello e malattie ereditarie ai cromosomi del cavallo. Recenti studi di genetica molecolare sul colore del mantello nei cavalli hanno contribuito all'identificazione dei geni e della mutazione responsabili delle varianti del colore del mantello.

Relativamente al locus *Extension*, *Melanocortin-1 receptor* (*MSHR* o *MC1R*) controlla il livello dell'enzima tirosinasi nei melanociti. Se l'ormone stimolante i melanociti (*MSH*) si lega al recettore (*MSHR* o *MC1R*), il livello di tirosinasi aumenta. La tirosinasi è l'enzima limitante nella sintesi della melanina, ovvero alti livelli di tirosinasi determinano la produzione di eumelanina (nera o marrone) mentre bassi livelli determinano la produzione di feomelanina (rossa o gialla). Una mutazione missenso nel gene *MC1R* (da C a T, che porta alla fenilalanina anziché alla serina) è associata al colore sauro. Come risultato della mutazione, *MSH* non riesce a legarsi con *MC1R*, il che si traduce in una bassa attività della tirosinasi e nella produzione di feomelanina. Tutti i cavalli sauri sono omozigoti per questa mutazione, che conferma lo stato recessivo del fenotipo. Il gene *MC1R* è il locus *Extension*.

Relativamente al locus *Agouti*, gli alleli di tale locus sono responsabili della produzione di colori del mantello baio ("AA" e "Aa") e morello (*aa*), in presenza dell'allele dominante "E" nel locus *Extension*. Nei cavalli è stato cercato il polimorfismo nel gene della *Agouti signaling protein* (*ASIP*), che agisce come antagonista dell' α -*Melanocyte Stimulating-hormone* (α -*MSH*) sul recettore *MC1R*, il quale ha mostrato una delezione di 11 nucleotidi che induce una mutazione associata al colore morello nei cavalli. Questa delezione è risultata omozigote, pertanto il colore del mantello derivante dall'interazione di questi due loci è riportato nella tabella sottostante (tabella 1):

		<i>MC1R</i> genotype		
		<i>EE</i>	<i>Ee</i>	<i>ee</i>
<i>ASIP</i> genotype	<i>AA</i>	Bay	Bay	Chestnut
	<i>Aa</i>	Bay	Bay	Chestnut
	<i>aa</i>	Black	Black	Chestnut

Tabella 1 – Genotipi e corrispondenti fenotipi del colore di base del mantello nel cavallo (fonte: Jabobs et al., 2016, *The MC1R and ASIP coat color loci may impact behavior in the horse, Journal of Heredity*, 107(3), 214–219)

Quindi alla posizione *Agouti* possono esserci due alleli, il dominante "A" e il recessivo "a"; allo stesso modo il locus *Extension* ha due alleli, il dominante "E" e il recessivo "e". Poiché i tre colori di base del mantello del cavallo sono il sauro, il baio e il morello, se un cavallo ha due forme recessive del

locus *Extension*, cioè “*ee*”, qualunque sia il locus *Agouti* presente, avrà un mantello sauro. Se un cavallo ha almeno un allele dominante “*E*”, se è presente un allele dominante “*A*” sarà baio, mentre se sono presenti alleli recessivi “*aa*” sarà morello. In molte specie di mammiferi, incluso il cavallo, questi stessi geni (*MC1R* e *ASIP*) hanno spesso effetti pleiotropici sui fenotipi comportamentali (Jacobs et al., 2016 <https://doi.org/10.1093/jhered/esw007>).

Per quanto riguarda il cavallo Maremmano, il mantello risulta generalmente baio o morello, nelle varie gradazioni; è ammesso il sauro soltanto nelle femmine. Non è ammessa una eccessiva estensione di segni particolari e delle depigmentazioni cutanee. Nel cavallo Maremmano il colore del mantello rientra nei criteri di selezione dell’Associazione di razza e del L.G., affidato a partire dal 1991 all’Associazione Nazionale Allevatori cavallo di razza Maremmana (A.N.A.M.) (<http://www.A.N.A.M.cavallomaremmano.com/>).

GENOTIPIZZAZIONE DEI CAMPIONI

I soggetti scelti per lo studio hanno preso parte ai Performance test dell’A.N.A.M., in occasione dei quali veniva prelevata una provetta contenente 9 ml di sangue in una provetta con anticoagulante EDTA che veniva inviata ai laboratori del CRCS. Il sangue è indispensabile per conoscere il genotipo dei cavalli e questo è possibile utilizzando tecniche di biologia molecolare che permettono la genotipizzazione al locus di interesse.

Il DNA è stato estratto da ogni campione di sangue attraverso l’utilizzo di un kit commerciale (Wizard DNA, Promega), che prevede l’estrazione degli acidi nucleici mediante un protocollo di lisi e precipitazione. La procedura ha previsto la lisi dei globuli rossi, seguita dalla lisi dei globuli bianchi, dove è contenuto il DNA genomico. È seguita una fase di digestione con RNAsi, per eliminare eventuali acidi nucleici indesiderati. Le proteine in eccesso sono state fatte precipitare e sedimentare per precipitazione, mentre il DNA genomico rimasto in soluzione è stato estratto con una precipitazione in ambiente alcolico con isopropanolo e successivamente purificato mediante lavaggio con etanolo al 70%. L’estrazione, o purificazione, ha lo scopo di separare il DNA dalle componenti cellulari e da eventuali sostanze interferenti. È seguita una fase di purificazione del DNA e di quantificazione; quest’ultima è stata effettuata misurando l’assorbanza del campione, utilizzando uno spettrofotometro (Nanodrop ND-1000) che permette di riservare più materiale per le analisi successive. I campioni sono stati genotipizzati per i loci del colore del mantello attraverso la quantificazione qualitativa dei prodotti di PCR mediante elettroforesi su gel d’agarosio. L’elettroforesi su gel è una tecnica che permette la migrazione di particelle sotto l’influenza di un campo elettrico; il gel viene utilizzato per non disperdere le molecole nel mezzo liquido, rappresentato dal tampone di corsa.

Nel Maremmano, il sauro è il colore del mantello indesiderato, pertanto è necessario conoscere il genotipo dei soggetti bai o morelli ed individuare gli eterozigoti al locus “*E*”. Per fare questo, è necessario individuare la sequenza dell’*MC1R* del cavallo nella banca dati, per identificare la mutazione. Per trovare la mutazione, è stata scelta una coppia di primer (*MC1R Forward* e *MC1R Reverse*), che producono un amplificato di 560 bp. La mutazione ha creato una sequenza TGCA riconosciuta come sito di taglio dall’enzima *Taq polimerasi I*. Il prodotto di PCR ottenuto con i primers è stato sottoposto a digestione con l’enzima *Taq polimerasi I* e il DNA si è diviso in due porzioni formando, dopo corsa elettroforetica su gel d’agarosio, due bande distinte: una da 378 bp e una da 183 bp (figura 1), che è quella che denota la presenza dell’allele “*e*”. L’amplificato non viene digerito quando è presente l’allele wild type “*E*”.

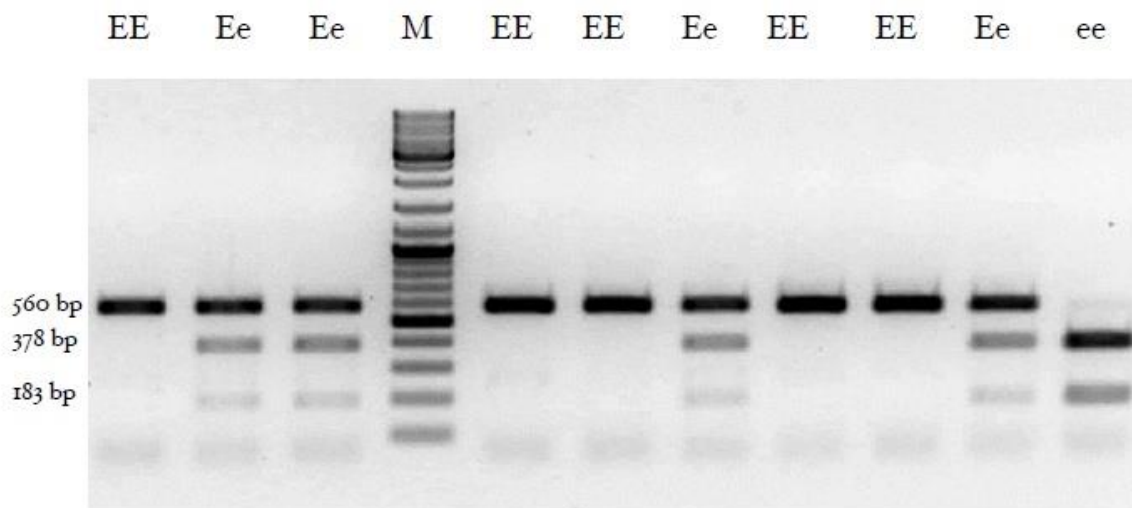


Figura 1 – Elettroforesi su gel d’agarosio di soggetti equini genotipizzati al locus “E”

Per la PCR al locus “E” è stato utilizzato:

- un DNA stampo nella quantità di 30 ng
- un PCR Buffer nella quantità di 2.5 µl
- il cloruro di magnesio (MgCl₂) avente 50 mM nella quantità di 0.75 µl
- i deossinucleotidi trifosfato (dNTPs) aventi 5 mM nella quantità di 1 µl
- i primer *MC1R Forward* (10 pmol/µl) e *MC1R Reverse* (10 pmol/µl) nella quantità di 0.5 µl ciascuno
- l’enzima *Taq polimerasi I* (5 U/µl) nella quantità di 0.25 µl
- l’acqua

Tutti questi reagenti sono stati miscelati tra loro e la strip che è andata incontro a PCR contiene 3 controlli positivi (*EE*, *Ee*, *ee*), il campione ignoto e il controllo negativo, utile per verificare eventuali inquinamenti. Una volta completata questa preparazione, la strip è stata immessa nel Thermal Cycler con il seguente programma:

Temperatura	Durata	
94 °C	4 minuti	1 ciclo
94 °C	45 secondi	35 cicli
65 °C	45 secondi	
72 °C	45 secondi	

Una volta terminata la reazione, sono stati presi 10 µl della strip, sono stati aggiunti 2 µl di colorante (blu bromo fenolo o xilene cianolo) ed è stata effettuata la separazione elettroforetica in gel d’agarosio all’1,2% in TAE IX (un tampone contenente Tris, acido acetico ed EDTA), per verificare la presenza

dell'amplificato di 560 bp. I restanti 40 μ l sono stati digeriti con l'enzima Taq I secondo il seguente protocollo:

- DNA derivato dalla PCR, nella quantità di 15 μ l
- PCR Buffer (10X), nella quantità di 2 μ l
- Taq I (20 U/ μ l), nella quantità di 0.5 μ l
- acqua, nella quantità di 2.5 μ l

La reazione è stata incubata a 65 °C per un'ora, dopodiché è stata effettuata una nuova corsa elettroforetica su gel d'agarosio.

Per il locus *ASIP*, la delezione è stata messa in evidenza per mezzo della PCR con primer specifici, attraverso l'amplificazione di un breve tratto di DNA (101/90 bp) e la separazione dei prodotti mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 4%. L'allele mutato, nel gel, è risultato di altezza diversa (più corto) rispetto al wild type, come riportato nella figura sottostante (figura 2):

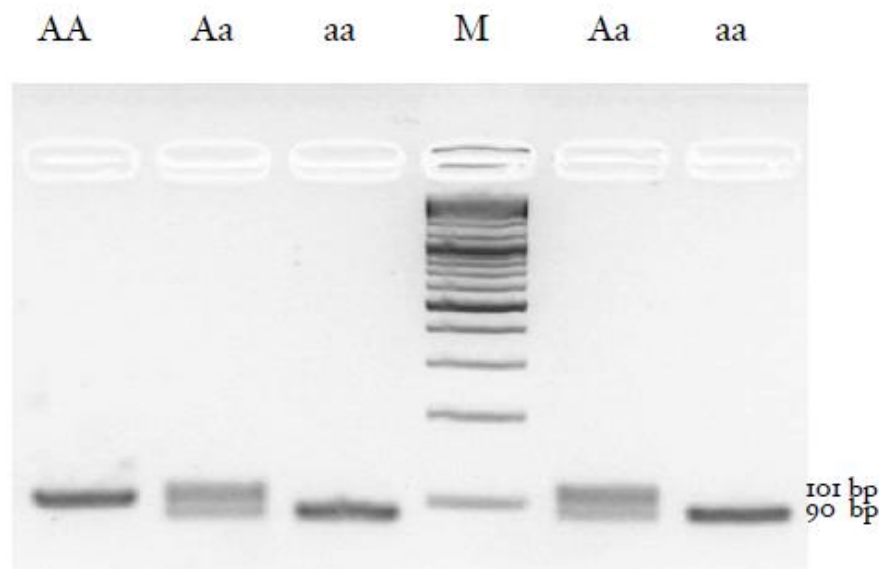


Figura 2 – Elettroforesi su gel d'agarosio di soggetti equini genotipizzati al locus "A"

Per la PCR al locus "A", sono stati miscelati tra loro i seguenti reagenti:

- 30 ng di DNA stampo
- un PCR Buffer (10 X) nella quantità di 5 μ l
- i deossinucleotidi trifosfato (dNTPs, 5 mM) nella quantità di 2 μ l
- i due primer *ASIP Forward* (10 pmol/ μ l) e *ASIP Reverse* (10 pmol/ μ l) nella quantità di 1 μ l ciascuno
- l'enzima Taq polimerasi (5 U/mol) nella quantità di 0.2 μ l

– l’acqua.

I reagenti sono stati miscelati tra di loro e la reazione è stata avviata secondo il seguente programma:

Temperatura	Durata	
94 °C	4 minuti	1 ciclo
94 °C	45 secondi	35 cicli
60 °C	45 secondi	
72 °C	1 minuto	

Una volta finita la reazione, sono stati presi dalla strip 10 µl, vi sono stati aggiunti 2 µl ed è stata effettuata la separazione elettroforetica su gel d’agarosio al 4% nel tampone TAE IX, per verificare la presenza degli amplificati attesi: 102 per l’allele “A”, 91 per l’allele “a”.

Al termine di queste operazioni, il DNA è stato colorato nel gel con l’etidio bromuro, il quale si intercala alle basi azotate degli acidi nucleici ed emette una luce fluorescente quando irradiato con la luce ultravioletta. L’etidio bromuro può essere direttamente aggiunto al gel o al tampone di corsa, al fine di rivelare il DNA. In particolare, sono stati pesati 0,6 gr di agarosio e sono stati sciolti per 2 minuti in 50 ml di tampone TAE inserendoli nel microonde. Una volta prelevata la beuta dal forno, è stato verificato che l’agarosio fosse completamente sciolto. Successivamente sono stati aggiunti 3 µl di etidio bromuro e il tutto è stato versato in una vaschetta preparata in precedenza, inserendo il pettine per la formazione dei pozzetti di caricamento, avendo cura di non creare bolle. I campioni sono stati poi colorati con 2 µl di colorante, rappresentato dal blu di bromo fenolo unito al saccarosio, per ogni 10 µl di campione. In questo modo è stato possibile visualizzare gli amplificati prodotti e ottenere la genotipizzazione di tutti i cavalli che hanno partecipato allo studio.

ANALISI STATISTICA

Dati

Le informazioni relative a ciascun soggetto che ha partecipato allo studio sono state fornite dall'A.N.A.M. e dalle banche dati del C.R.C.S. Per ogni soggetto, si disponeva:

- le segnalazioni delle particolarità a sede fissa rilevate dagli esperti di razza e riportati nei certificati di identificazione di 1032 soggetti.
- la genotipizzazione del mantello effettuata dal laboratorio del C.R.C.S.
- delle valutazioni per il “carattere” attribuite a 639 candidati durante il Performance test,
- il Pedigree e le relative informazioni anagrafiche dei 17478 soggetti costituenti il L.G. A.N.A.M.,

Analisi statistiche e risultati

Al fine di elaborare le informazioni raccolte, si è scelto di sviluppare l'analisi statistica utilizzando dei modelli statistici lineari e modelli di tipo BLUP. Il risultato delle analisi è stato considerato statisticamente significativo per $P \leq 0,05$.

L'Associazione di razza ha fornito il dato fenotipico relativo al colore del mantello, rilevato durante il segnalamento del soggetto precedente all'iscrizione al L.G.. A tal proposito, la genotipizzazione ha permesso di correggere alcuni errori di rilevazione. Il genotipo, infatti, ha evidenziato un errore di rilevazione fenotipica su 131 soggetti identificati come bai che risultano genotipicamente morelli, poiché al locus *ASIP* è presente la doppia combinazione recessiva (aa), mentre 2 cavalli, identificati come morelli, sono risultati genotipicamente bai. Un esempio è rappresentato dal cavallo “*M. Nakano di Sterpeti*”, il quale è indicato nel Catalogo stalloni come baio, mentre l'analisi molecolare ha restituito un colore del mantello morello.

Prima dell'applicazione dei modelli, è stato effettuato un test del “*chi-quadro*” sulle frequenze genotipiche ai loci *ASIP* e *MC1R*.

La frequenza assoluta dei genotipi *ASIP* e *MC1R* dei cavalli è riportata nella tabella sottostante (tabella 2):

		Genotipi <i>MC1R</i>		
		EE	Ee	ee
Genotipi <i>ASIP</i>	AA	110	85	2
	Aa	179	125	8
	aa	77	50	3

Tabella 2 – Frequenza dei genotipi *MC1R* e *ASIP*

Il test del “*chi-quadro*” effettuato per testare l'equilibrio di Hardy-Weinberg ai loci *ASIP* e *MC1R*, ha mostrato un valore di P-value $\leq 0,001$, che indica, come atteso, che questi due loci non rispettano tale equilibrio a causa della selezione fenotipica, basata sul colore del mantello, che viene effettuata dall'Associazione per i candidati stalloni destinati alla riproduzione.

I dati genealogici, relativi a 17.478 cavalli (10.222 femmine e 7.256 maschi) discendenti da 1062 stalloni e 5018 madri, hanno mostrato una consanguineità media della razza pari al 4% (con un massimo pari al 41,6%). I dati genealogici sono stati impiegati per stimare le componenti della varianza per trait “estensione del bianco” (POCO/TANTO) considerando come effetti fissi le uniche quattro combinazioni risultate significative dei due alleli nei loci ASIP e MC1R. La significatività statistica degli effetti fissi è stata stimata con un modello lineare eseguito da R Software.

```
lm(formula = POCO_TANTO ~ geno, data = dati)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.7857	-0.5896	0.1697	0.2244	1.4104

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	1.5000	0.2875	5.217	0.00000022	***
geno[T.aaEe]	-0.7208	0.2949	-2.444	0.01469	*
geno[T.aaEE]	-0.9104	0.2918	-3.120	0.00186	**
geno[T.Aaee]	0.2857	0.3260	0.876	0.38106	
geno[T.AaEe]	-0.4856	0.2903	-1.673	0.09468	
geno[T.AaEE]	-0.7244	0.2894	-2.503	0.01247	*
geno[T.AAee]	0.5000	0.4066	1.230	0.21913	
geno[T.AAEe]	0.4268	0.2922	-1.461	0.14436	
geno[T.AAEE]	-0.6697	0.2910	-2.301	0.02157	*

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

L’ereditabilità genetica del carattere “estensione del bianco” (POCO/TANTO) è risultata pari a 0,53 ± 0,07. Questi risultati incoraggiano a prendere in considerazione la genotipizzazione dei loci ASIP e MC1R, attualmente utilizzati solo contro il mantello sauro, anche per limitare l’estensione delle macchie bianche programmando gli accoppiamenti.

Gli stessi dati genealogici e il genotipo del mantello sono stati impiegati per stimare un indice genetico univariato per il “carattere” (EBV) tramite la procedura BLUP Animal Model per 639 soggetti valutati per il “carattere” durante le diverse edizioni di Performance Test A.N.A.M..

Nel modello erano presenti: l’effetto fisso della fase del Performance test, l’effetto casuale del cavallo, il genotipo del mantello e l’errore. Le stime dei parametri genetici sono state effettuate utilizzando il programma BLUPF90.

L’ereditabilità stimata è risultata pari a 0,16 e la ripetibilità uguale a 0,62. L’accuratezza media dell’indice è risultata pari a 0,54.

L’Indice genetico “carattere” così stimato (EBV) è stato inserito in tre modelli lineari che tenevano conto dei fattori: ASIP, MC1R e colore del mantello.

I tre modelli lineari erano così descritti:

$$EBV_{ijk} = \mu + a_i + \varepsilon_{ijk}$$

dove:

μ è la media generale, a_i è l'effetto fisso (nel primo modello è rappresentato dal locus *ASIP* (aa, Aa, AA); nel secondo modello è rappresentato dal locus *MC1R* (ee, Ee, EE); nel terzo modello è rappresentato dal colore del mantello (morello, baio e sauro)), ε_{ij} è il residuo.

Il modello lineare in cui è stato utilizzato il locus *MC1R* come effetto fisso, non ha evidenziato una relazione statisticamente significativa tra l'Indice genetico "carattere" e il locus *MC1R*, che codifica per il colore del mantello sauro. Occorre sottolineare che il rilevamento di questo effetto potrebbe essere stato ostacolato dalla bassa frequenza dell'allele "e" nella popolazione, in quanto l'A.N.A.M. esclude dalla riproduzione i soggetti sauri; anche in letteratura non è stata riscontrata nessuna relazione significativa con il comportamento e il genotipo al locus *MC1R* (Jacobs et al., 2016 <https://doi.org/10.1093/jhered/esw007>).

Il modello lineare in cui è stato utilizzato il locus *ASIP* come effetto fisso, ha prodotto come risultato una significatività ($P \leq 0,001$) tra l'Indice genetico "carattere" e il locus preso in esame, che è stata ulteriormente analizzata. È stato applicato il test di *Kruskal-Wallis* per verificare la differenza tra le mediane; poiché questa è risultata significativa ($P \leq 0,01$), per indagare quale coppia di genotipi ha determinato tale significatività, è stato applicato il *test di Dunn* per un confronto multiplo. Questo ha evidenziato una differenza significativa tra l'omozigote recessivo (aa) e l'eterozigote (Aa) pari a 0,012, come riportato nella tabella sottostante (tabella 3):

PAIRWISE COMPARISON	P_UNADJUSTED	P_ADJUSTED
aa - Aa	0,004	0,012**
aa - AA	0,19	0,57
Aa - AA	0,09	0,29

Tabella 3 - Differenze nel locus *ASIP* tra l'omozigote recessivo e l'eterozigote, l'omozigote recessivo e dominante e l'eterozigote e l'omozigote dominante. Confronto: test di Dunn, con il metodo "Bonferroni". La significatività è evidenziata dalla presenza degli asterischi.

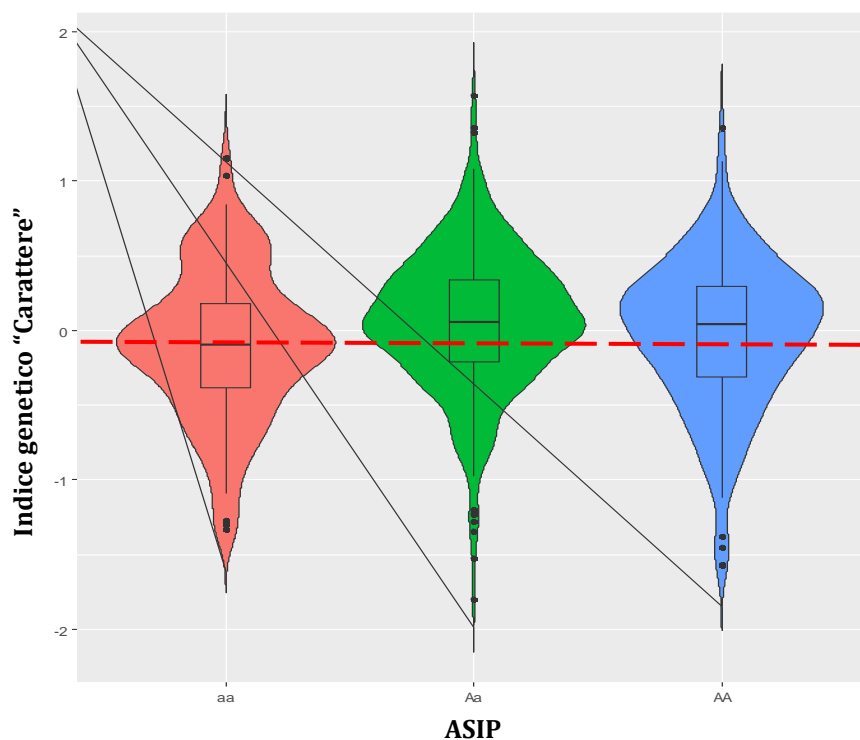


Figura 3 - Boxplot raffigurante la differenza tra l'omozigote recessivo (aa), l'omozigote dominante (AA) e l'eterozigote (Aa).

Questo risultato sembrerebbe evidenziare un carattere “inferiore” per l'omozigote recessivo (aa), rispetto all'eterozigote (Aa) e all'omozigote dominante (AA).

Successivamente è stato applicato il modello lineare che conteneva il colore del mantello come effetto fisso. L'analisi statistica di questo modello ha permesso di osservare una significatività ($P \leq 0,01$) tra l'EBV “carattere” e il colore del mantello, che è stata ulteriormente indagata per mezzo del test di *Kruskal-Wallis*. Essendo stata rilevata una significatività pari a $P \leq 0,02$, è stato applicato il *test di Dunn* per un confronto multiplo, per indagare quale coppia di genotipi ha determinato tale significatività, come riportato nella tabella sottostante (tabella 4):

PAIRWISE COMPARISON	P_UNADJUSTED	P_ADJUSTED
Baio - Morello	0,01	0,03*
Baio - Sauro	0,29	0,88
Morello - Sauro	0,88	1,0

Tabella 4 - Differenze per il carattere relative al colore del mantello. Confronto: test di Dunn, con il metodo “Bonferroni”. La significatività è evidenziata dalla presenza degli asterischi.

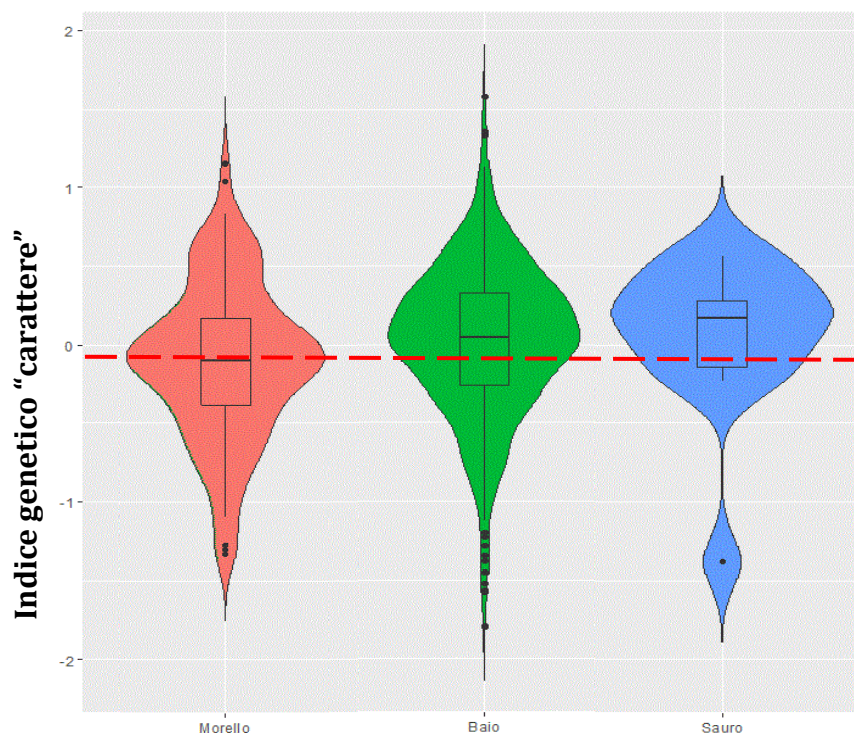


Figura 4 – Boxplot raffigurante la differenza tra i diversi colori del mantello

Da ciò si evince una differenza significativa principalmente tra i cavalli con il mantello baio e morello. In particolare i morelli sembrerebbero avere un carattere diverso rispetto agli altri. Anche in letteratura è stato riscontrato un risultato simile da Jacobs et al. (2016), che hanno trovato una dipendenza significativa del comportamento dal genotipo al locus *ASIP*. Secondo questo studio, un

cavallo morello (aa) è più autosufficiente e preferibile in una situazione solitaria e sembrerebbe avere un temperamento più indipendente rispetto ad un cavallo baio (Aa, AA).

Tuttavia al fine di poter utilizzare un indice genetico per il “carattere” integrandolo con le genotipi del mantello in ragione dei bassi valori di accuratezza riscontrati (0.54) è raccomandabile aumentare la numerosità del campione.