Agris
Agenzia per la ricerca in agricoltura
Agenzia regionale per la ricerca in agricoltura

REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

Allegato 7

RELAZIONE DI PROGETTO
(A cura del coordinatore di progetto)

1. Tematica e Filiera	Salvaguardia della biodiversità animale, del benessere animale e/o proposte volte al miglioramento dei servizi per l'assistenza tecnica specialistica agli allevatori italiani-Filiera ovi-caprina

2. Titolo	Identificazione e utilizzo di SNP per la selezione di riproduttori ovini con elevato valore genetico per la qualità del latte e la resistenza alle principali patologie e salvaguardia della biodiversità delle razze ovine autoctone

3. Acronimo	**BIODIVSEL**

4. Progetto	**Bando**	**Affidamento diretto**	**Sportello**
ID34	[1] **D.M. n. 5000 del 04/03/2015**	[2]D.M. n. 5000 del 04/03/2015	[3]D.M. n. 5000 del 04/03/2015

5. Durata (mesi) **30 (18+12)**		**Report[4]** **Intermedio** ☐ **Finale x**☐	**Nota[5]**

6. Dati finanziari	**Finanziamento concesso totale (€)**	**Finanziamento ricevuto (€)**	**Importo rendicontato (€)[6]**
	113.620,00	**56.810,00**	112.538,36

7. Coordinatore di progetto		
	Nome e COGNOME	**Antonello CARTA**
	Qualifica	Ricercatore e coordinatore del settore scientifico Genetica e Biotecnologie
	Istituzione di appartenenza	AGRIS-Sardegna
	Indirizzo	Loc. Bonassai S.S. 291 Sassari-Fertilia, km 18.6, 07100 Sassari
	Tel/fax	+39 0792842279
	e-mail	acarta@agrisricerca.it

Allegato 7

8.Ente coordinatore	Denominazione: AGRIS Sardegna Indirizzo: : Loc. Bonassai S.S. 291 Sassari-Fertilia, km 18.6, 07100 Sassari Tel.:____0792831500_ Fax:_0792831555, e-mail:direzione@agrisricerca.it Si confermano gli estremi bancari o di tesoreria già forniti per la concessione del contributo ☐ si x☐ no, indicare IBAN ABI CAB BIC Contabilità speciale intestata all'Agris aperta presso Banca Italia di Sassari, con le seguenti coordinate: Numero conto: 117731 Intestazione: AGRIS SARDEGNA Responsabile amministrativo della rendicontazione finanziaria: Nome Maria Giovanna Garau Tel/fax 0706018255 Emai:mgvgarau@agrisricerca.it

9. Sintesi del progetto (max 20 righe) *(può essere oggetto di pubblicazione)*	L'incremento dell'efficienza dei piani di selezione delle razze autoctone è fondamentale per la conservazione della biodiversità ovina ed evitare l'ingresso di razze straniere o cosmopolite. Il progetto si proponeva di produrre e trasferire in campo una lista di Single Nucleotide Polimorphisms (SNP) per la selezione di arieti di elevato valore genetico per la qualità tecnologica e nutrizionale del latte e la resistenza a patologie di importanza economica attraverso l'analisi di sequenze di animali target. Nello specifico sono stati oggetto del progetto: la resistenza alla paratubercolosi, la resistenza ai nematodi gastrointestinali, il tenore in grasso e proteine del latte, il tenore in Acido Linoleico Coniugato. Il progetto è partito dai risultati ottenuti nell'ambito del progetto europeo 3SR (FP7 – 2009-2013) nel corso del quale sono state identificate delle regioni del genoma associate ai caratteri sopraelencati: OAR6 per il tenore in proteina del latte, due su OAR20 per la resistenza ai Nematodi Gastro-intestinali e alla paratubercolosi, una su OAR22 per il contenuto in CLA del grasso del latte, OAR 4 per il grasso del latte. Alle 24 sequenze già disponibili, se ne son aggiunte ulteriori 21 (9 eseguite specificamente con i fondi BIODIVSEL). La disponibilità di 45 sequenze e l'applicazione di una procedura di imputazione dei genotipi di animali non sequenziati ha consentito di ottenere un notevole incremento della potenza consentendo la produzione per le 5 regioni genomiche di un set di SNP utilizzabili per la selezione assistita da marcatori nelle razze italiane.

Parole chiave	**Miglioramento genetico, SNP, patologie ovine, qualità latte.**

REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA AGRIS SARDEGNA

Allegato 7

10. Relazione del progetto (*totale max. 10 pagine*)

10.1 Descrizione dei risultati in relazione agli obiettivi generali e specifici previsti nel periodo di riferimento (max. 2 pagine)

L'obiettivo generale del progetto era l'incremento delle prestazioni produttive degli ovini da latte di razze italiane da realizzarsi attraverso la selezione assistita da informazioni molecolari. Obiettivo finale era quello di utilizzare mutazioni causative in geni che influenzano caratteri di interesse economico (qualità del latte e resistenza alla malattie) o marcatori genetici ad essi strettamente legati (in linkage disequilibrium) nella selezione degli ovini al fine di migliorare la resistenza alle malattie e la qualità casearia e nutrizionale del latte concorrendo in ultima analisi a incrementare la competitività della filiera produttiva.

La tabella riporta per ciascuno dei caratteri e delle relative regioni genomiche investigate nel progetto la posizione espressa in coppie di basi dall'inizio del cromosoma degli SNP che possono essere utilizzati per il miglioramento genetico delle razze ovine italiane.

Carattere	Cromosoma	Posizione
Tenore in grasso	4	11170067
	4	12435290
	4	13049268
	4	12021735
Tenore in proteina	6	85325959
	6	84884573
	6	85358543
Nematodi GI	20	21146922
	20	44032995
Paratubercolosi	20	24937684
	20	24680380
	20	24890019
	20	24635915
CLA	22	20410420

Nell'ambito del progetto si sono realizzati 9 nuovi sequenziamenti, i quali abbinati ai 24 già disponibili e ai 12 realizzati con fondi di altra provenienza nonchè a una procedura di imputazione dei genotipi di individui non direttamente sequenziati, ha consentito di aumentare il numero di repliche degli aplotipi plus e minus varianti dai 3 inizialmente previsti a più di 300 incrementando così in maniera esponenziale la potenza del protocollo sperimentale.

Il non eccellente livello della attuale annotazione del genoma ovino non ha consentito l'individuazione delle mutazioni causative implicate, il che ha reso di fatto non realizzabili gli obbiettivi specifici di creazione di un panel di mutazioni causative e del suo test in campioni di popolazione.

Tuttavia è stato raggiunto l'obbiettivo alternativo previsto nel progetto, di identificazione di un set di SNP i cui polimorfismi sono fortemente associati alle varianti favorevoli o sfavorevoli. In termini di miglioramento genetico atteso non si dovrebbero avere grossi scostamenti da quanto si sarebbe potuto ottenere da una

selezione basata sulle mutazioni causative dato il forte LD che i marcatori identificati mostrano con le varianti aplotipiche che includono la(e) mutazione(i) causativa(e).
Per quanto riguarda la razza Sarda sulla quale sono state condotte le analisi previste nel progetto, le fasi dei marcatori tra di loro (quando sono più di 1 per regione) e dei marcatori con la varianti causative sono state determinate con elevate probabilità e i marcatori proposti possono essere immediatamente utilizzati in selezione.
Per quanto riguarda l'utilizzo diretto in altre razze autoctone degli SNP identificati, le analisi realizzate su dati forniti dall'Associazione Nazionale della Pastorizia e dal Consorzio BIOVITA, tese a verificare la omogeneità dell'estensione e della fase del LD tra la razza sarda e le altre nelle regioni oggetto di analisi, hanno dimostrato che sono necessarie ulteriori verifiche per la validazione di quanto riscontrato nella razza Sarda. In pratica occorre sviluppare protocolli di validazione degli SNP identificati o di altri molto prossimi a quelli identificati. Queste ulteriori verifiche non sarebbero state necessarie se si fossero identificate come auspicato all'atto della presentazione del progetto le mutazioni causative.
I risultati e le metodologie sviluppate sono state trasferite a ASSONAPA per costituire la base della collaborazione in corso per il Progetto PSRN Misura 10.2 "Conservation, Health and Efficiency Empowerment of Small Ruminant" (CHEESR).
E' ragionevole pensare che con il progredire piuttosto rapido, almeno ai livelli di quello bovino, della qualità dell'annotazione del genoma ovino, in un prossimo futuro i dati prodotti nel corso del progetto possano consentire l'identificazione di mutazioni causative direttamente utilizzabili in selezione a prescindere dalle razze coinvolte.
Sara cura di AGRIS, comunicare al Ministero e ASSONAPA, tutte le ulteriori evoluzioni dei risultati sin qui ottenuti che saranno realizzate attraverso l'utilizzo dei dati BIODIVSEL in relazione alle prossime versioni delle annotazioni del genoma ovino. Si prende altresi l'impegno che in caso di ottenimento di risultati ulteriori sarà esplicitamente richiamato il ruolo svolto da BIODIVSEL.

10.2 Attività svolte (max 7 pag)

Work Package (WP)	Titolo WP	Risultati	Indicatori di verifica	UO PARTECIPANTI
WP 1	Coordinamento	Esecuzione completa fasi progetto	Relazione scientifica e rendiconto	UO1
WP2.	Identificazione e risequenziamento completo di animali target per una regione del cromosoma 4 associata alla variabilità del tenore in grasso (TG) del latte.	Disponibilità sequenze regioni implicate per 391 aplotipi plus varianti e 443 minus varianti i	9 individui sequenziati	UO1
WP3.	Analisi delle sequenze del genoma ovino per l'identificazione di mutazioni causative	Lista di mutazioni causative candidate per regione	File analisi annotazione	UO1-UO2

Allegato 7

WP4.	Selezione dei polimorfismi identificati e produzione di un panel per la genotipizzazione	Tabella con LD SNP identificati	File e elenco SNP polimorfi per regione	UO1-UO2
WP5.	Implementazione e trasferimento dei risultati	Scambio dati e informazioni con ASSONAPA e trasferimento risultati al Progetto PSRN Misura 10.2 "Conservation, Health and Efficiency Empowerment of Small Ruminant" (CHEESR).	File analisi LD tra razze italiane	UO1-UO2

WP1. Coordinamento. Le attività di coordinamento si sono perlopiù esplicitate attraverso riunioni periodiche dei ricercatori afferenti alle 2 unità operative. In particolare il 17 e 18 settembre 2018 si è svolta in AGRIS la riunione per la definizione finale delle strategie di elaborazione dei dati e di individuazione della lista di SNP utili per la selezione assistita da marcatori. Riunioni periodiche via Skype sono state organizzate al termine delle varie fasi operative per verificare lo stato di avanzamento delle attività. Lo scambio di informazioni e file è stato continuo attraverso lo scambio di e-mails contenenti gli esiti delle varie analisi. Il coordinatore ha anche curato la redazione della relazione intermedia allegata alla richiesta di proroga. Il coordinatore ha altresì verificato che le missioni e le partecipazioni a convegni realizzate nell'ambito del progetto fossero inerenti le attivista previste nel nei WPs.

WP2- Identificazione e risequenziamento completo di animali target per una regione del cromosoma 4 associata alla variabilità del tenore in grasso (TG) del latte.

L'obiettivo di questa attività era l'identificazione degli animali da sequenziare per ottenere un numero di repliche degli aplotipi che portavano le varianti favorevoli e sfavorevoli in grado di consentire l'identificazione delle mutazioni causative. La disponibilità di un software di imputazione di sequenze di animali non sequenziati direttamente e la contestuale riduzione dei costi dei reagenti per il sequenziamento ha portato all'individuazione di 9 animali le cui sequenze dirette abbinate a quelle di altre 36 realizzate con altri fondi e utilizzate per l'imputazione hanno portato a un numero di repliche degli aplotipi favorevoli e sfavorevoli a 391 e 443 rispettivamente rispetto alle 3 inizialmente previste. Inoltre il progetto si è avvantaggiato della disponibilità delle sequenze dirette o imputate di ulteriori aplotipi oltre quelli plus e minus varianti. Lo stesso effetto moltiplicatore della disponibilità di sequenze si è realizzato per le altre 4 zone per le quali si disponeva delle sequenze dirette. L'attività di *imputation* ha comportato dapprima l'utilizzazione dei softwares disponibili come BEAGLE (Browning & Browning, 2016) e FIMPUTE (Sargolzaei et al., 2014) i cui esiti sono stati comparati con quelli di uno specifico software sviluppato nell'ambito del progetto che teneva conto di alcune peculiarità della popolazione oggetto di studio (ridotto numero di animali sequenziati; disponibilità delle fasi dei gameti e delle probabilità di identity-by-descent tra essi stimate a priori a partire dai genotipi al BeadChip 50k e dalle informazioni genealogiche). Per quanto attiene il sequenziamento diretto, 9 animali sono stati sequenziati nell'ambito del progetto Biodivsel, mentre altri 12 sono stati sequenziati grazie a fondi provenienti da altri progetti di ricerca. Il DNA genomico di questi 31 animali, scelti sulla base dell'incremento di informatività che il loro genoma apporta al protocollo sperimentale, è stato sequenziato con un sequenziatore Illumina HiSeq 3000 con un coverage target di 30X. Il segmento da analizzare è stato definito sulla base dei risultati della QTL detection eseguita sul OvineSNP50 Beadchip utilizzando le posizioni degli SNP del Ovine Genome Assembly v4.0. Il cromosoma 4 mostrava la regione più significativamente associata al TG con un picco massimo in posizione 12337169

bp. Prendendo come riferimento tale posizione, una regione di 11 Mb attorno ad essa (da 7 Mb a 18 Mb) è stata analizzata più approfonditamente con i dati da sequenziamento. I 45 animali sequenziati erano portatori di 37 dei 155 aplotipi base sardi che caratterizzavano la posizione del picco. Perciò, il numero di copie sequenziate per aplotipo era circa 2.5 (45*2/37). Le fasi gametiche (ovvero le sequenze dell'aplotipo ereditato dal padre e di quello ereditato dalla madre) sono state stimate attraverso il software di imputation. La precisione della ricostruzione dei 37 aplotipi sequenziati "*direttamente*, per la regione di 11 Mb definita sopra era in media 0.98 ± 0.04. l'impatto dei 37 aplotipi base sul gregge genomico era del 0.75 (ovvero il 75% degli aplotipi portati dalle femmine del gregge genomico erano repliche di questi 37 aplotipi base.

WP3. Analisi delle sequenze del genoma ovino per l'identificazione di mutazioni causative

La qualità delle nuove reads è stata verificata con fastqc (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). Le sequenze sono state allineate sulla versione Oar_v4.0 (2015) del genoma ovino disponibile su NCBI utilizzando il software Burrows-Wheeler Aligner (BWA 0.7.15). L'identificazione dei polimorfismi è stata effettuata con Genome Analysis Toolkit (GATK 4.0.11.0, McKenna, 2010), considerando le sequenze di tutti i campioni disponibili (variant call multi samples).

a) Definizione delle regioni target da investigare

Le analisi di QTL detection sono state ripetute utilizzando nuove performance e nuovi genotipi resisi disponibili durante il progetto e rimappando le posizioni dei polimorfismi dello SNPchip sulla versione 4.0 del genoma ovino utilizzando lo strumento di conversione SNPchimMp v.3 (Nicolazzi *et al.*, 2015). Sono state identificate nuove più probabili localizzazioni dei QTL associati al tenore in grasso del latte (TG), al tenore in proteina totale del latte (TP), alla resistenza ai nematodi (FEC) e alla paratubercolosi (PTB), al rapporto CLA/Acido vaccenico (CLA/V). Per quanto riguarda il cromosoma 20, poiché le nuove analisi hanno evidenziato due picchi altamente significativi associati alla resistenza ai nematodi e uno associato alla resistenza alla paratubercolosi, è stata analizzata tutta la regione compresa tra 16 e 50Mb.

b) Annotazione funzionale delle mutazioni identificate sulle sequenze negli intervalli target.

Procedure di variant calling sono state effettuate negli intervalli indicati sulle sequenze genomiche dei 45 animali sequenziati e i polimorfismi identificati estratti in files vcf. I polimorfismi identificati sono stati sottoposti ad annotazione funzionale utilizzando l'Ovis aries Annotation Release 102 di NCBI e il software SnpEff v4.3t (Cingolani, 2010) cha ha portato alla identificazione di una lista di polimorfismi per regione con significato funzionale.

c) Ricerca di geni candidati tramite ricerca bibliografica e analisi di pathways

Il QTL per tenore in proteina del latte sul cromosoma 6 si trova in prossimità del cluster dei geni delle caseine, mentre quello associato al rapporto tra il CLA e l'acido vaccenico nel grasso del latte cade in una regione molto vicina al gene SCD stearoyl-CoA desaturase, che codifica per l'enzima responsabile della desaturazione dell'acido vaccenico in CLA nella mammella. Inoltre il cromosoma 20, dove sono stati identificati i QTL associati ai caratteri di resistenza alle patologie, ospita i geni del complesso maggiore di istocompatibilità. Il QTL associato al tenore in grasso nel latte al contrario mappa in un intervallo dove non erano presenti evidenti geni candidati funzionali per il carattere. Sia in quest'ultimo caso che in quelli precedenti è comunque necessario assegnare una priorità ai geni identificati negli intervalli target rispetto alla loro probabile rilevanza funzionale sulla base delle evidenze provenienti dalla letteratura. E' stata implementata un'analisi dei pathway con lo scopo di identificare tutti quei geni che, seppur non direttamente coinvolti nei tratti studiati, risultano ugualmente connessi tra loro all'interno di network metabolici. Al tal fine si è optato per un'analisi di arricchimento, ossia un approccio statistico 'competitivo' ampiamente usato in letteratura e basato sostanzialmente sul test esatto di Fisher. Questo metodo stima la probabilità di

osservare casualmente un certo numero di geni all'interno di uno specifico pathway tra quelli identificati come possibili candidati. L'analisi è stata condotta all'interno dell'ambiente statistico R tramite la libreria '*clusterProfiler*' (http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html).
Per ogni carattere la lista di geni da testare è stata compilata nel seguente modo: sono stati annotati i geni compresi negli intervalli di confidenza dei QTL identificati per ciascun carattere analizzato in un'analisi sul tutto il genoma, unitamente ad una lista di geni identificati in letteratura e supportati da numerose evidenze come associati ai fenotipi oggetto di indagine. Successivamente queste liste sono state sottoposte a *cluster Profiler* per due analisi di arricchimento differenti: la prima ha utilizzato come background i geni presenti nel database Gene Ontology (GO) bovino, in quanto ad oggi non esiste un'ontologia completa per la descrizione dell'annotazione funzionale in specie ovine, mentre la seconda ha utilizzato le banche dati KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) consultando sia quella relativa a Bos taurus che quella relativa ad Ovis Aries. Il vantaggio di KEGG rispetto a GO, oltre ad avere la possibilità di testare le nostre liste all'interno di network di geni specifici per la specie ovina, è che queste banche dati vengono aggiornate giornalmente. Si è quindi deciso di utilizzare i risultati di questa analisi. Tra i geni risultati implicati in KEGG's pathways nell'ovino per il tenore in grasso, resistenza alla paratubercolosi, resistenza ai nematodi gastrointestinali e rapporto tra CLA e Acido vaccenico nel grasso del latte sono stati selezionati come candidati quelli ricadenti negli intervalli target, anche a prescindere dal livello di significatività del pathway.

d) Analisi di associazione sulle sequenze

Il genotipo a 1.443.878 loci risultati polimorfici nelle regioni sequenziate è stato determinato sfruttando le probabilità di identity by descent stimate grazie a 1.190 SNP da OvineSNP50 Beadchip, genotipati in tutta la popolazione. Per ciascun carattere è stato quindi realizzata un'ulteriore analisi di associazione tra il carattere di interesse e il genotipo imputato in ogni posizione. Questa analisi di associazione, basata sui dati di sequenziamento permette di identificare nelle zone di interesse i polimorfismi più significativi al fine di annotarli sul genoma e verificarne l'effetto funzionale. Per ciascun carattere quindi è stata realizzata una regressione lineare sui genotipi agli SNP del sequenziamento (imputati su tutti gli animali con fenotipo) inserendo come effetti fissi gli SNP risultati più significativi attraverso un processo di selezione dei regressori di tipo step-wise. Un unico SNP in posizione 20410420 bp sul cromosoma 22 permette di spiegare completamente il QTL associato al rapporto CLA/VC. Questo SNP, che nella versione 4.0 del genoma ovino cade in un introne di un pseudogene (LOC106991766), si trova a 10.22kb a valle del gene SCD. Per tutte le altre regioni è stato necessario selezionare più marcatori per spiegare la varianza associata. In particolare 3 SNP, delimitanti un intervallo di circa 1 200 kB, sono necessari anche per spiegare il QTL associato al tenore in grasso sul cromosoma 4. Questi mappano tutti in regioni intergeniche, tra geni che non sono rientrati in pathways associati al carattere tenore in grasso benchè le funzioni di alcuni di essi PDK4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4) Bet1 (golgi vesicular membrane trafficking protein) suggeriscano un loro coinvolgimento nei processi di sintesi o formazione dei globuli del grasso del latte. Per quanto riguarda la regione sull'OAR6 associata al TP, il profilo del test di significatività ottenuto sia con l'analisi LDLA che con l'analisi di associazione sulle sequenze mostra un numero molto elevato di loci significativi. L'inclusione nel modello di QTL-detection dei 3 SNP risultati via via più significativi non ha spiegato l'intera varianza associata. Dei tre SNP identificati il più significativo mappa una regione intergenica a monte del gene che codifica per l'alphaS1-caseina. Due SNP, distanti poco più di 300Kb, spiegano il QTL associato alla paratubercolosi sul cromosoma 20. Il primo cade nell'introne 7 del gene MCM3 (minichromosome maintenance complex component 3) e il secondo interessa il primo introne o si trova a valle (a seconda del trascritto considerato) della sequenza del gene TMEM14A (transmembrane protein 14A). Nessuno di questi manifesta un effetto funzionale riconducibile alla resistenza alla paratubercolosi. Infine per quanto riguarda le regioni associate alla resistenza ai nematodi gastrointestinale sullo stesso cromosoma, dove sono stati identificati 2 picchi di significatività all'analisi LDLA del carattere FEC, è stato necessario selezionare 3 SNP, due dei quali molti vicini ai due picchi iniziali e un terzo centrale rispetto all'intervallo che li separa. Il primo in posizione 44032995bp cade in un introne del gene SMIM13, che

codifica per un piccola proteina di membrana e per il quale non è stato possibile trovare relazioni con il carattere e gli altri in posizione intergeniche o introniche di geni non caratterizzati funzionalmente.

e) *Analisi del linkage disequilibrium tra markers dell'intervallo nella razze Sarda e in altre razze prese come confronto*

Abbiamo testato l'ipotesi che, le medesime regioni identificate per i caratteri di interesse nella razza Sarda siano coereditate anche in altre razze che presentassero fenotipi comparabili, e.g. riguardo alla produzione di latte. L'identificazione di regioni all'interno del QTL in alto LD che si sovrapponessero sia nella Sarda che nella razza di confronto, avrebbe identificato regioni dall'alto valore funzionale potenzialmente associato al fenotipo di interesse. Per testare questa ipotesi è stato sviluppato un protocollo bioinformatico per determinare il valore di LD per coppie di SNP utilizzando il quadrato dell'indice di correlazione di Pearson come indicatore. L'analisi ha individuato alcune regioni identificabili come blocchi di LD, ovvero regioni altamente coereditate. L'algoritmo è stato poi applicato a dati genotipici SNP array 50k - di altre razze (e.g. la Lacaune, una razza specializzata nella produzione di latte). Sfortunatamente la bassa densitá di informazione dello SNP array non ha consentito confronti significativi con i profili di LD ottenuti in Sarda.

WP4 - Selezione dei polimorfismi identificati e produzione di un panel per la genotipizzazione.

L'analisi dettagliata delle sequenze ottenute, l'annotazione funzionale dei polimorfismi in esse identificati e l'analisi di associazione delle sequenze nonchè il loro confronto non hanno portato all'identificazione certa di mutazioni causative direttamente responsabili della variabilità dei caratteri oggetto di studio. Sono stati dunque identificati marcatori in forte LD con le varianti plus e minus per ciascuna regione. Per il carattere CLA/Vaccenico è stato scelto lo SNP in posizione 20410420 bp sul cromosoma 22, in quanto la sua introduzione nel modello di analisi di associazione sulle sequenze spiegava tutta la varianza del QTL. Anche per la resistenza ai nematodi gastro intestinali, la scelta dei 2 SNP più significativi (in posizione 21659944bp e 44442156bp rispettivamente) permette di abbattere la significatività dell'analisi statistica in quei punti. Per quanto riguarda gli altri caratteri si è invece preferito scegliere più marcatori che considerati contemporaneamente potessero consentire di individuare gli aplotipi portatori delle varianti favorevoli e/o sfavorevoli.

WP5 - Implementazione e trasferimento dei risultati

Per valutare il potenziale utilizzo utilizzo di LD marker in altre razze è stata realizzata un analisi di Haplotype Sharing che indica quanto due popolazioni tendano a condividere la stessa fase a due loci posti ad un certa distanza tra loro. L'analisi ha riguardato oltre al campione di Sarda 20 razze ovine italiane. Non essendo disponibili sequenziamenti per le altre razze, l'Haplotype Sharing è stato stimato sulla base dei genotipi al Ovine50k beadchip relativi alle regioni di interesse. I campioni analizzati consistevano in: 178 femmine di razza Comisana allevate presso l'azienda sperimentale Le Cortine - Asciano (SI) i cui genotipi sono stati messi a disposizione dall'ASSONAPA; 21 campioni costituiti da circa 24 individui ciascuno corrispondenti alle razze, Alpagota; Altamurana-BA; Altamurana-FG; Appenninica; Bagnolese; Bergamasca; Biellese; Comisana; Delle Langhe; Fabrianese; Gentile di Puglia; Istrian Pramenka; Laticauda; Leccese; Massese; Pinzirita; Sambucana; Nera di Arbus; Sarda; Sopravissana; Valle del Belice. I genotipi corrispondenti sono stati messi a disposizione da consorzio BIOVITA e già oggetto di uno studio sulla variabilità genetica delle razza ovine italiane (Ciani et al. 2014). I livelli di Haplotype Sharing riscontrati non consentono di utilizzare i marcatori identificati per la razza sarda in altre razze senza la realizzazione di protocolli di validazione.

10.3 Descrizione delle interazioni tra le UUOO partecipanti, eventuali collaborazioni esterne ed imprese (inserire diagramma) max 1 pag.

Allegato 7

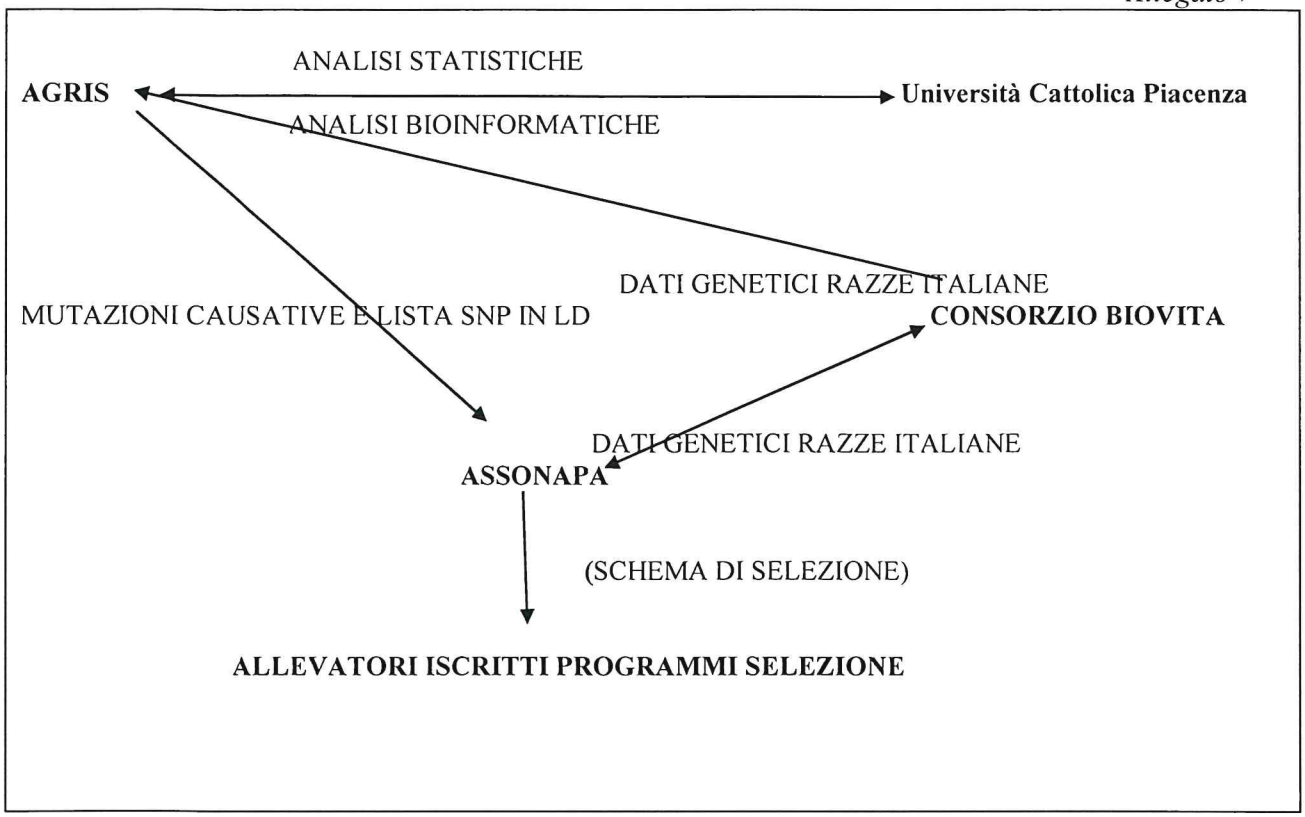
Al progetto hanno collaborato le Unità Operative: AGRIS-Sardegna e l'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore. I ricercatori del Settore Scientifico "Genetica e Biotecnologie" del Servizio di Ricerca per la Zootecnica hanno coordinato le attività relative a :
i. individuare gli animali target idonei a consentire l'imputazione dei genotipi di individui non direttamente sequenziati al fine di moltiplicare le repliche disponibili degli aplotipi favorevoli e sfavorevoli.
ii. definire le regioni di interesse, identificare gli SNP e le INDELS
iii. collaborare alle analisi bioinformatiche delle sequenze
iiii. individuare la lista di SNP in LD per la selezione assisti da marcatori.
vi. trasferire i risultati alle Associazioni allevatori
I ricercatori dell'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore coordinato le attività di analisi bioinformatica dei geni e delle varianti presenti nelle zone target per identificare i più probabili candidati. In particolare hanno curato l'applicazione di un approccio integrato: i) identificazione di geni candidati; ii) analisi funzionale delle varianti e iii) integrazione delle informazioni in pathway metabolici.

In conclusione, la realizzazione del progetto implicava la contestuale presenza di esperti nel campo dell'analisi di associazione tra marcatori e caratteri di interesse e esperti nell'analisi bioinformatica dei risultati delle analisi statistiche per la identificazione delle mutazioni causative. In quest'ottica le 2 UO si sono integrate perfettamente consentendo l'ottenimento di risultati che senza le complementarietà su evidenziate non avrebbero consentito la costituzione di una lista di mutazioni causative candidate e la lista di marcatori immediatamente utilizzabili in selezione.

9.4.2 Collaborazioni esterne

I risultati e le metodologie sviluppate sono state trasferite a ASSONAPA per costituire la base della collaborazione in corso con AGRIS per il Progetto PSRN Misura 10.2 "Conservation, Health and Efficiency Empowerment of Small Ruminant" (CHEESR). Nello specifico AGRIS e Assonapa stanno attualmente collaborando allo sviluppo di uno schema di selezione fondato sull'utilizzo di informazioni molecolari. I risultati di BIODIVSEL e altre informazioni per altre zone genomiche sono nella disponibilità di ASSONAPA per la messa a punto delle schema di selezione finale. E' ragionevole pensare che con il progredire piuttosto rapido, almeno ai livelli di quello bovino, della qualità dell'annotazione del genoma ovino, in un prossimo futuro i dati prodotti nel corso del progetto possano consentire l'identificazione di mutazioni causative direttamente utilizzabili in selezione a prescindere dalle razze coinvolte. Nell'ambito del progetto ASSONAPA ha condiviso anche per il tramite del Consorzio BIOVITA (consorzio costruito per il confronto fondato su analisi molecolari tra le razze italiane) i seguenti dati: 21 campioni costituiti da circa 24 individui ciascuno corrispondenti alle razze, Alpagota; Altamurana-BA; Altamurana-FG; Appenninica; Bagnolese; Bergamasca; Biellese; Comisana; Delle Langhe; Fabrianese; Gentile di Puglia; Istrian Pramenka; Laticauda; Leccese; Massese; Pinzirita; Sambucana; Nera di Arbus; Sarda; Sopravissana; Valle del Belice. Le analisi realizzate su questi campioni sono alla base della eventuale estensione dei risultati del progetto dalla Razza Sarda alle altre razze nazionali.

Allegato 7



10.4 Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto (max 1 pag)

N° WP	Ostacolo occorso	Azione correttiva
3	Nessuna mutazione causative per scarso livello annotazione genoma ovino	Individuazione LD markers

Timbro Istituzione	Il responsabile di gestione (o delegato)	Il coordinatore di progetto
	nome e cognome: SANDRO SALVATORE DELOGU	*nome e cognome;* ANTONELLO CAPPA
	firma	*firma*

2. Rendiconto complessivo di progetto

		Periodo Intermedio ☐ Finale ☐x							
		Costo congruo[7]	Finanziamento ricevuto[8]	Importo rendicontato					Totale
				UO 1	UO 2	UO 3	UO 4	UO 5	
Personale a tempo indeterminato	Ricercatori								
	Tecnici								
	Pers. auiliario								
Personale a tempo determinato	Ricercatori	65.000,00	30875,00	24.999,96	43.558,50				68.558,46
	Tecnici								
	Pers. ausiliario								
Missioni nazionali ed estere		16.000,00	7600,00	3.395,56	2.935,47				6.331,03
B) Subtotale Personale		81.000,00	38475,00	28.395,52	46.493,47				74.888,99
C) Materiale di consumo		25.000,00	11875,00	24.735,74					24.735,74
D) Attività esterne									
C1 – Consulenze									
C2 – Convenzioni									
C3 - Manutenzioni ecc.									
D) Attrezzature									
E) Spese generali		10.600,00	5035,00	5.313,13	4.600,00				9.913,13
F) Coordinamento		3.000,00	1425,00	3.000,00					3.000,00
TOTALE		119.600,00	56.810,00	61.444,39	51.093,97				112.538,36

Timbro Istituzione	Il responsabile di gestione o del delegato nome e cognome: Dott. Sandro Delogu	Il Coordinatore di progetto nome e cognome: Dott. Antonello Carta
	firma Sandro Salvatore Delogu	firma