RELAZIONE SCIENTIFICA PER LA VALUTAZIONE DEL PROGETTO REDDBOV

"Aumento della redditività degli allevamenti attraverso il miglioramento dei parametri tecnici e biologici"

DM 17880 del 05/09/2014

Scadenza 31/12/2016

Introduzione generale

All'inizio della presente relazione scientifica a conclusione del progetto si ritiene importante sottolineare che la realizzazione del programma è stato molto complessa ma con un appropriato impegno di tutto il personale coinvolto durante lo svolgimento è stato possibile raggiungere risultati di grande interesse. I risultati ottenuti, anche se sono in continuo aggiornamento e completamento poiché l'archivio continua ad essere arricchito di nuove informazioni, hanno consentito di raggiungere gli obbiettivi del progetto, cioè migliorare la redditività delle attività zootecniche attraverso l'impiego di nuove tecnologie di allevamento e cercare di suggerire soluzioni razionali per alleviare i problemi che attualmente pesano sull'intero settore: infertilità e bassa longevità degli animali e bassissima redditività di impresa. I risultati conseguiti hanno consentito di arricchire le conoscenze ma soprattutto costituiscono una ricchezza di informazioni utile ai fini dell'impiego a livello operativo.

Il progetto era articolato su due linee di ricerca che vedevano impegnate razze a differente attitudine con l'obiettivo di aumentare la redditività degli allevamenti zootecnici. Il vantaggio per gli allevatori sarebbe tangibile qualora le tecniche suggerite fossero in grado di migliorare le performance produttive e riproduttive degli animali in produzione zootecnica.

Con la prima linea di ricerca, che si basava sull'incrocio alternato di due razze da latte Frisona (FI) e Pezzata Rossa (PR), si è ottenuta una popolazione meticcia di prima e di seconda generazione che è stata confrontata con le razze pure incrocianti ai fini della stima degli effetti dell'eterosi relativamente a caratteri riproduttivi quali la fertilità, caratteri legati alla resistenza alle malattie e caratteri produttivi: latte e maggior numero di vitelli da destinare all'ingrasso per la produzione della carne.

La seconda linea di ricerca, riguardava lo studio del carattere "gemellarità" nella razza bovina Maremmana, obiettivo raggiunto attraverso le più moderne tecniche di genetica molecolare. Sono stati genotipizzati tutti gli animali in allevamento (nucleo in purezza di 124 fattrici) col chip Illumina BovineSNP50 BeadChip, attraverso l'analisi di associazione (GWAS) dei marcatori (SNP) con il carattere gemellarità e sono stati identificate regioni del genoma in cui sono presenti due potenziali geni candidati di interesse per questo carattere (ARHGAP28 e TMEM200C). Il gene ARHGAP28 è risultato essere direttamente coinvolto nel processo di ovulazione. Sono anche stati sequenziati i geni GDF9 e BMP15, geni che controllano la follicologenesi nei mammiferi, individuando alcuni polimorfismi. I polimorfismi del gene GDF9 sono stati identificati solo in vacche con parto singolo, mentre le mutazioni del gene BMP15 sono state identificate sia in vacche con parto gemellare che con parto singolo. Le mutazioni nel gene BMP15 potrebbero influenzare la funzione e struttura della proteina BMP15.

Le due schede del progetto sono state affidate a due diverse ricercatrici:

1) Uso dell'eterosi nell'allevamento di bovini da latte – CROSSLAT. Responsabile scientifico Alessandra Crisà.
2) Aumento della gemellarità nella razza Maremmana – GEMMA. Responsabile scientifico Cinzia Marchitelli.

USO DELL'ETEROSI NELL'ALLEVAMENTO DI BOVINI DA LATTE – CROSSLAT.

Responsabile scientifico Alessandra Crisà

OBBIETTIVO GENERALE

La linea di ricerca aveva come obbiettivo generale l'impostazione di una prova sperimentale della durata minima di 2 anni basata sull'incrocio a rotazione di due razze bovine per iniziare una valutazione dei possibili benefici effetti dell'incrocio.

La pratica dell'incrocio mira a sfruttare il fenomeno dell'eterosi, cioè la superiorità manifestata dalla progenie di incrocio rispetto alla media dei genitori. Detta superiorità tende ad essere più evidente per i caratteri a bassa ereditabilità: resistenza alle malattie (es. vitalità dei vitelli, zoppie, mastiti ecc.), riproduzione (evidenza dei calori, fecondità e in una certa misura anche la produzione di latte), e alla longevità funzionale delle bovine.

Obbiettivi specifici:

- Costituzione, all'interno del CRA-PCM, di una mandria sperimentale nella quale applicare tecniche di allevamento basate sull'incrocio di rotazione tra la razza bovina Frisona allevata in purezza ad alte produzioni e la razza bovina Pezzata Rossa italiana che presenta produzioni medie di latte inferiori, è a duplice attitudine ed è geneticamente distante dalla Frisona.
- Valutazione economica dei risultati della prova. Confronto tra le due razze in purezza e gli incroci tenendo conto del valore economico del latte prodotto, del valore della carne prodotta sia dei vitelli che delle vacche a fine carriera, del diverso costo di allevamento, della rimonta necessaria a seconda della longevità dei diversi tipi genetici, di alcuni aspetti comportamentali importanti ai fini gestionali (evidenza dei calori) e dell'eventuale diversa mortalità durante l'accrescimento
- Confronto della composizione genetica della mandria a regime costituita da ¼ FI, ¼ PR e per metà da soggetti frutto di incrocio. Identificazione di regioni cromosomiche e/o aplotipi possibilmente associati a caratteri riproduttivi e produttivi.
- Miglioramento dei caratteri ad alta ereditabilità quali ad esempio la conformazione della carcassa, aspetto rilevante sia per i vitelli prodotti che per le vacche a fine carriera.

Al fine di poter ottenere gli obiettivi prefissati, il piano di attività previsto dalla scheda era costituito da 4 work package:

1. Organizzazione del piano di incroci
2. Raccolta fenotipi riproduttivi manze
3. Raccolta fenotipi produttivi vacche e vitelli
4. *Selective genotyping* con *chip* a 54K

MATERIALI e METODI:

Costituzione mandria sperimentale: Per l'organizzazione di una mandria sperimentale composta dalle due razze pure di partenza (Frisona e Pezzata Rossa) e dagli incroci di rotazione sono state acquistate 16 manze bovine gravide di razza Pezzata Rossa, 1 toro di razza Pezzata Rossa, dosi di seme per le operazioni di fecondazione artificiale (FA) su entrambe le razze. Per l'acquisto del seme di entrambe le razze sono stati tenuti in considerazione soprattutto gli indici di produttività, longevità e facilità di parto.

Costituzione di archivi digitali: Per la raccolta di tutti i dati inerenti il progetto sono stati costituiti e tenuti aggiornati alcuni archivi tematici: fenotipi riproduttivi delle manze e vacche (l'età alla pubertà, peso alla pubertà, tipologia e numero di fecondazioni, data parto, diagnosi ecografiche, difficoltà di parto, tipo parto, numero nati e sesso, aborti, riassorbimenti, morti), fenotipi produttivi, fenotipi sanitari, genealogie.

Protocolli di sincronizzazione e acquisizione dati sui calori: E' stato utilizzato un protocollo di sincronizzazione Ovsynch modificato sulle manze. Nelle vacche il rilevamento del calore e la registrazione è stato effettuato con una tecnologia innovativa quale l'attivometria. Gli attivometri sono sensori posti nei collari che permettono il rilevamento automatico degli estri basandosi sull'attività motoria dell'animale. La vitella in estro altera in suo normale comportamento, quindi il monitoraggio del suo movimento, confermato dall'osservazione diretta, consente di individuare il periodo più idoneo per procedere con la fecondazione.

Raccolta dati relativi ai vitelli: Sono stati raccolti i fenotipi produttivi dei vitelli nati di sesso maschile (peso alla nascita, peso alla vendita, prezzo di vendita, indice di conformazione generale e indici specifici (testa, arti, taglia) misurati prima della vendita. Per l'indice di conformazione generale è stato utilizzato il seguente punteggio: pessimo (1), mediocre (2), sufficiente (3), discreto (4), buono (5), eccellente (6). I dati sono stati filtrati per età alla valutazione > 10 giorni. Per gli indici di conformazione specifici sono stati utilizzati i seguenti punteggi lineari:
testa = piccola (1), media (2), grande (3)
Lunghezza arti= corti (1), medi (2), lunghi (3)
Tipo arti= leggeri (1), medi (2), pesanti (3)
Taglia = piccola (1), media (2), grande (3)

Raccolta dei dati relativi alle manze/vacche: sono stati raccolti dati quantitativi e qualitativi del latte prodotto (grasso, proteine, SCC). E' stato rilevato il BCS (*Body Condition Score*) sulle manze/vacche per due cicli nei seguenti momenti: inseminazione, diagnosi, asciutta, 200 giorni di lattazione.

Valutazione aspetti sanitari: si è proceduto ad analizzare e registrare tutto ciò che attiene al benessere animale. A tal fine sono stati registrati tutti i trattamenti sanitari effettuati su vacche e vitelli ed è stato rilevato lo stato di ingrassamento (*Body Condition Score*) di vacche e manze.

Estrazione DNA per analisi genomiche: sono stati effettuati prelievi di sangue in tubi *vacuteiner* da 5 ml contenenti anticoagulante. Da 500 microlitri è stata effettuata l'estrazione del DNA mediante l'utilizzazione di un kit specifico e dell'estrattore automatico Maxwell 16 (Promega). Il DNA risultante è stato quindi valutato sia qualitativamente che quantitativamente mediante analisi su gel di agarosio 1% e nanospettrofotometria (Perl, Implen). I campioni sono stati spediti ad una ditta esterna per effettuare il genotyping con l'Illumina BovineSNP50 BeadChip.

Analisi statistica dei dati:

La stima delle medie ed il confronto fra tipi genetici (Frisona, Pezzata Rossa e Incrocio F_1) per i dati relativi al prezzo alla vendita, peso alla vendita e conformazione è stato impiegato il seguente modello:

$Y_{ij}= \mu+ \alpha_i+ b(x_{ij})+ \varepsilon_{ij}$ (modello 1)

dove:

Y= peso e prezzo di vendita, indice di conformazione.

μ= media

α= razza con i= 1,2,3

b= coefficiente di regressione

x= età alla valutazione per la conformazione o età alla vendita per il prezzo di vendita.

ε= errore residuo

Il modello impiegato per l'analisi dei dati relativo a: pesi alla nascita dei vitelli, peso alla pubertà, età alla pubertà, età alla prima fecondazione per le manze della generazione 1, è stato il seguente:

$Y_{ij}= \mu+ \alpha_i+ \varepsilon_{ij}$ (modello 2)

dove:

Y= fenotipi.

μ= media

α= razza con i= 1,2,3

ε= errore residuo

Per analizzare i dati sanitari sui vitelli nati (maschi e femmine) è stato utilizzato il seguente modello:

$Y_{ijkl}= \mu+ \alpha_i+ \beta_j + \gamma_k + \partial_l + \varepsilon_{ijkl}$ (modello 3)

dove:

Y= durata trattamento

μ= media

α= razza con i= 1,2,3

β= sesso con j= maschio, femmina

γ= tipo di patologia con k=0,1,2,3,4,5,6,7,8

∂=risposta al trattamento l=1,2,0

ε= errore residuo

RISULTATI

Per l'ottenimento della mandria sperimentale sono state utilizzate manze/vacche di razza Frisona presenti in azienda, che hanno costituito la generazione 0. Da questi animali per FA con seme Frisone (F) o Pezzato Rosso (P) sono stati ottenuti rispettivamente la linea pura F o meticcia (M), costituenti la generazione 1. Per la linea pura P sono state acquistate 16 manze gravide, un toro e seme P.

CARATTERI RIPRODUTTIVI

Protocollo di sincronizzazione

A 60 gg dal parto è stato fissato il primo intervento di sincronizzazione ed il protocollo è stato impostato con tre cicli di sincronizzazione e FA tra 60 e 90 gg per poi passare in monta naturale in caso di esito negativo. Nella tabella 1 sono schematizzati i trattamenti ed i relativi giorni di intervento.

Tabella 1. Trattamento e giorni di intervento

Trattamento GNRH	Giorno X
Sincronizzazione PG	Giorno X +7
I Inseminazione + GNHR	Giorno X +7 + 2
II Inseminazione	Giorno X +7 + 2 +1
Ecografia post fec	Giorno X +7 + 2 +1 + 30

Eventi relativi ai fenotipi riproduttivi registrati

Il primo parto della razza F è stato registrato in data 17/06/2013

Il primo parto della razza P è stato registrato in data 30/06/2013

Il primo parto della razza M è stato registrato in data 08/02/2014

Nelle tabelle 2 e 3 sono riportati tutti gli eventi registrati nel corso della prova sperimentale per la generazione 0 e generazione 1 rispettivamente.

Tabella 2.

Generazione 0	Gruppo genetico	IAS	IAC	IN	P	PG	R	A	FV	FM	MV	MM
	F per produrre purezza e meticci	193	248	105	206	12	10	9	97	4	105	13
	P	44	50	19	48	2	1	2	22	4	20	6
	Totali	237	298	124	254	14	11	11	119	8	125	19

Tabella 3.

Generazione 1	**Gruppo genetico**	**IAS**	**IAC**	**IN**	**P**	**PG**	**R**	**A**	**FV**	**FM**	**MV**	**MM**
	F pure	36	5	10	9	0	1	1	6	0	3	1
	P pure	23	11	4	15	1	0	0	9	1	5	2
	M	37	9	6	12	0	1	3	8	0	5	0
	Totali	96	25	20	36	1	2	4	23	1	13	3

Legenda tabella 2 e 3:

IAS= inseminazione su sincronizzazione
IAC= inseminazione su calore naturale
IN= monta naturale
P= parto
PG= parto gemellare
R= riassorbimento entro i 3 mesi dalla diagnosi positiva di gravidanza
A= aborto dopo i 3 mesi dalla diagnosi positiva di gravidanza
FV= femmine nate vive
FM= femmine nate morte
MV= maschi nati vivi
MM= maschi nati morti

Dall'inizio dell'esperimento sono nati un totale di 280 vitelli di cui177 maschi e 103 femmine le quali sono state allevate come rimonta e così divise: 53 M, 18 P e 32 F. E' stato osservato un *calving rate* (numero di parti su fecondazioni totali) del 40% ed un tasso di parti gemellari del 5%. Nel corso della prova è stata osservata una percentuale di nati morti più elevata nella razza P.
L'obbiettivo principale del progetto, ossia la costituzione della mandria è stato quindi ottenuto con successo.
Sono stati elaborati i primi dati relativi ai caratteri riproduttivi delle manze della generazione 1, che sono riassunti nella tabella 4. I valori del peso alla nascita e peso ed età alla pubertà delle M hanno mostrato valori intermedi rispetto alle F e P. Il valore percentuale del tasso di gravidanze (*pregnancy rate*) al primo servizio ha indicato un valore di eterosi del +8% delle M rispetto alle razze pure ed un valore del numero di servizi per concepimento di – 0,47.

Tabella 4. Medie stimate ± SD per la manze in base al gruppo genetico

Gruppo genetico	Peso alla nascita (kg)	Peso alla pubertà (kg)	Età alla pubertà (giorni)	Età alla prima inseminazione (giorni)	Pregnancy rate	servizi per concepimento
Frisona	36.82 ± 6.05 A	345.59 ± 52.95 a	487.65 ± 38.71	544.29	0.35	2.83
Meticcia	42.71 ± 5.37 B	370.62 ± 36.04 bc	490.46 ± 55.08	542.60	0.58	1.71
Pezzata Rossa	44.67 ± 6.41 B	386.67 ± 39.33 c	524.67 ± 32.66	568.35	0.65	1.54
Eterosi	1.96	4.49	-15.7	-13.72	0.08	-0.47

CARATTERI PRODUTTIVI e CONFORMAZIONALI DEI VITELLI MASCHI

Su di un totale di 118 vitelli nati le valutazioni sono state effettuate su 107.

Il gruppo dei meticci occupa una posizione intermedia rispetto ai parentali con un valore positivo per il peso alla nascita e tendente verso un valore negativo per il peso alla vendita avvenuto ad una età che va da un minimo di 5 ad un massimo di 228 giorni (media= 42 giorni) (tab.5). Questo denota che i meticci presentano un lieve rallentamento nella crescita rispetto alle razze parentali, infatti l'accrescimento medio giornaliero delle pezzate è quali doppio sia rispetto alle meticce che alle frisone pure. Le differenze fra i tre tipi genetici sia per la conformazione che per il prezzo di vendita dei vitelli sono risultate significative. Per la conformazione F vs M P<0.016, F vs P P<0.0001, M vs P P<0.003; i meticci presentano una conformazione generale tra il mediocre e il sufficiente come le frisone mentre le pezzate sono tra il sufficiente e il discreto. I prezzi di vendita sono risultati significativamente differenti per le tre razze (P<0.0001). Il valore di vendita degli animali meticci è risultato intermedio rispetto a quello delle due razze parentali. Il valore di eterosi ottenuto per le meticce rispetto alle razze parentali è però di -13.67 euro (tabella 5)

Tabella 5. Medie stimate e SD dei pesi, conformazione e prezzo di vendita dei vitelli maschi per gruppo genetico

Gruppo genetico	Peso alla nascita (kg) (modello 2)	Peso alla vendita (kg) (modello 1)	Conformazione (score) (modello 2)	Prezzo alla vendita (euro) (modello 2)
Frisona	40.56 ± 1.07 [c]	55.13 ± 2.05 [b]	2.58 ± 0.11 [c]	90.24 ± 8.76 [c]
Meticcio	44.15 ± 0.78 [b]	59.17 ± 1.34 [b]	2.93 ± 0.08 [b]	152.78 ± 5.77 [b]
Pezzata Rossa	46.89 ± 1.44 [a]	67.62 ± 2.64 [a]	3.57 ± 0.15 [a]	242.66 ± 10.25 [a]
Eterosi	0.425	-2.21	-0.15	-13.67

Tabella 6. Medie stimate e SD degli indici di conformazione.

Stima degli indici di conformazione specifica dei vitelli										
Gruppo genetico		testa			L arti		T arti			taglia	
	n	x	ds		x	ds	x	ds		x	ds
Frisona	31	1.74	0.06	c	1.99	0.06	1,68	0.06	b	2,04	0.07
Meticcia	58	2,01	0.04	b	2,06	0.05	1,82	0.04	b	2,10	0.05
Pezzata	14	2,28	0.09	a	1,97	0.09	2,23	0.08	a	2,12	0.10
eterosi		0			0.08		-0.14			0.02	

Nella tabella 6 sono riportati gli indici di conformazione specifica per i vitelli maschi analizzati. Solo per la testa e per gli Lunghezza arti (L arti) le meticce occupano una posizione intermedia fra le due razze parentali, per gli altri due fenotipi taglia e Tipo arti (T arti) non vi sono differenze fra tipi genetici

ASPETTI SANITARI VITELLI NATI

Nei primi sei mesi di vita dei vitelli nati vivi (maschi e femmine) circa il 27% hanno contratto una qualche forma di patologia che ha richiesto un intervento terapeutico. L'incidenza di ammalati sui soggetti sani nei primi sei mesi di vita è stata diversa tra i tre tipi genetici, ma le differenze non hanno raggiunto la significatività statistica. In particolare, il 33% dei vitelli frisoni ha contratto un patologia, il 25% per la pezzata e solo il 24% per i meticci. E' stato inoltre osservato che la patologia più frequente è la diarrea, che ha interessato circa il 73% dei vitelli ammalati. Ci si è posti la domanda se esistesse una differenza nella durata dei giorni di trattamento nei vitelli tra le tre razze. I risultati hanno mostrato che non vi sono differenze statisticamente significative tra i gruppi anche se le meticce hanno mostrano avere una migliore risposta alla terapia, con tempi di guarigione più brevi di circa 0.51 giorni rispetto alle razze parentali. Non vi sono differenze fra vitelli maschi e femmine. La durata del trattamento si diversifica secondo il tipo di patologia anche se non vi sono differenze significative fra le patologie. La tipologia del trattamento (dose dipendente: antibiotici e cortisonici, tempo dipendente: antinfiammatori non steroidi, vermifughi, ecc., neutrali: integratori vitaminici e minerali, ecc.) influenza la durata della terapia. L'impiego di farmaci con effetto nel tempo ne aumenta significativamente la durata della prognosi (tabella7).

Tabella 7. Durata della terapia suddivisa per tipo di patologia e numero di vitelli ammalati.

Durata in giorni della terapia per i vitelli ammalati nei primi sei mesi di vita				
		n	x	ds
Gruppo genetico				
	Frisona	49	1.00b	0.27
	Meticcia	39	0.96b	0.32
	Pezzata	16	1.94a	0.38
Sesso				
	maschio	59	1.39	0.27
	femmina	45	1.21	0.31
Patologia				
	non diagnosticata	3	2.02	0.64
	Diarrea	76	1.63	0.21
	Actino micosi mandibolare dx e sx	10	1.98	0.40
	Febbre	3	1.88	0.63
	Tosse	1	0.30	1.06
	Sospetta infezione respiratoria	4	1.39	0.57
	Incisione ascesso ombelicale	2	0.32	0.77
	debilitazione	1	1.56	1.07
	stomatite	2	1.34	0.78
	colica	2	0.57	0.75
Tipologia del trattamento				
	1=dose dipendente	34	0.95b	0.51
	2=tempo dipendente	62	2.21a	0.33
	0=neutrale	8	0.73b	0.26
eterosi			0.51	

Estrazione DNA e GENOTYPING:

Il DNA estratto è risultato di ottima qualità (assorbimento 260/280>1,85). Un'aliquota dei campioni caricati su gel di agarosio e colorati con Gel Red è visibile nella figura1.

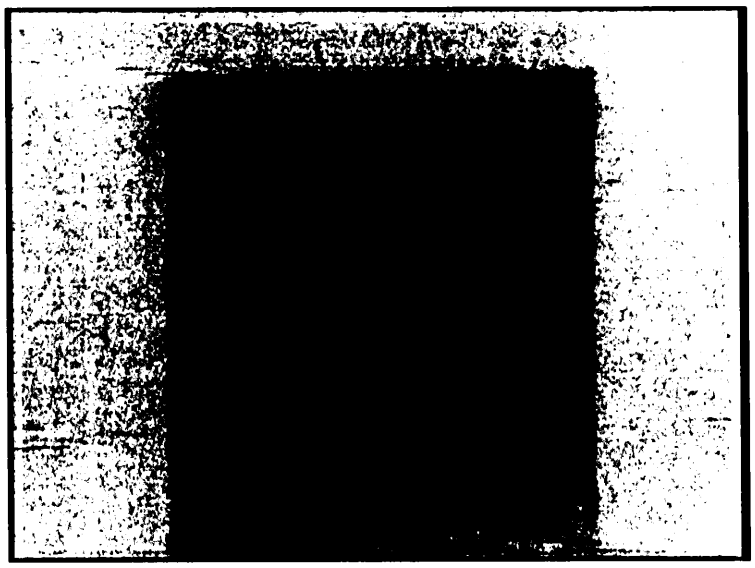

Figura 1

Attualmente sono disponibili dati di genotyping di 32 meticce, 46 Frisone e 27 Pezzate Rosse. In un prossimo futuro saranno effettuate le prime valutazioni genomiche per identificare frequenze alleliche/aplotipi e regioni cromosomiche differenti tra i tre gruppi genetici, associate con l'eterosi osservata per i caratteri considerati. Queste regioni e/o aplotipi verranno studiate in modo specifico per identificare geni candidati per i caratteri di interesse. Appena si renderà disponibile un sufficiente numero di dati di lattazione degli animali della generazione1 verranno effettuate associazioni *genome-wide* di tutti i parametri fenotipici rilevati.

AUMENTO DELLA GEMELLARITÀ NELLA RAZZA MAREMMANA – GEMMA.

Responsabile scientifico Cinzia Marchitelli

INTRODUZIONE

1.1 Storia della razza bovina Maremmana ieri ed oggi: origine, allevamento, caratteristiche morfologiche

La razza bovina Maremmana viene definita "razza podolica", identificando cosi le sue origini geografiche nella Podolia, ampia regione del sud-ovest dell'Ucraina. Questa razza sarebbe giunta in Italia a seguito delle invasioni barbariche, a partire dal V secolo d.C. In realtà dai ritrovamenti archeologici si è scoperto che i bovini macroceri (cioè a corna lunga) sono documentati nel Mediterraneo a partire dal Neolitico, convivendo con il progenitore selvatico *Bos primigenius* (Ciani e Matassino, 2001).

La diffusione della popolazione bovina Maremmana "Primitiva" comprendeva la Maremma litoranea, la zona collinare, l'ambiente Montano *interno* e Appenninico del bioterritorio Tosco-

Laziale. Lentamente questa distribuzione si è ridotta con la presenza relitta di tale popolazione in alcuni bioterritori della Toscana meridionale e del Nord del Lazio, sostituita nelle altre località dalla razza Maremmana in selezione (Ciani et al., 2010).
La peculiarità di questa razza è stata la capacità di sopravvivere nelle zone paludose e infestate dalla malaria dell'Italia centrale. Nel corso del XX secolo la Maremmana ha attraversato diversi momenti di crisi, causati inizialmente dalla grandiosa opera di bonifica della zona paludosa della Maremma che rese disponibili molti terreni su cui inizialmente pascolava questa razza.
Oggigiorno il libro genealogico della Maremmana è tenuto dall'ANABIC (Associazione Nazionale Allevatori Bovini Italiani da Carne). La consistenza è di 10.000 capi circa (Tabella 1), quasi la metà si trova in provincia di Roma, e il 75% vive nel Lazio, mentre il 24% è allevata in Toscana (quasi tutti in provincia di Grosseto).
Per quanto riguarda le caratteristiche funzionali la razza Maremmana, come già accennato, è adatta per ampie condizioni di pascolo essendo una razza rustica, vigorosa e resistente.
Per quanto riguarda i parametri riproduttivi, l'età media è piuttosto avanzata al primo parto (3 anni, 9 mesi e 13 giorni) e rappresenta un punto negativo, a differenza dell'intervallo parto-concepimento (meno di 14 mesi), l'età di riforma (12 anni) e il numero di vitelli nati per vacca (più di 7) che rappresentano i punti positivi. La frequenza media dei parti gemellari è pari a 1,17% e la percentuale di vitelli nati morti è del 1,5%.
Questa razza, anche oggi, viene allevata principalmente nelle zone collinari dove viene sfruttato il pascolo come fonte alimentare principale, più qualche integrazione nei periodi dove la disponibilità del pascolo diminuisce. Generalmente l'allevamento prevede la suddivisione in gruppi della mandria al cui interno sono presenti tori per ogni gruppo che vengono immessi per un periodo che va da aprile fino a fine giugno. Questo permette di concentrare le nascite nel periodo primaverile e consente anche uno sfruttamento dei pascoli nella loro massima produttività con ripercussioni positive anche sullo stato di salute delle vacche e sulla produzione di latte. I vitelli vengono lasciati con le madri e questo prevede un forte controllo da parte degli allevatori durante questo periodo dovuto ad eventuali problemi che si possono verificare al momento di un parto gemellare che, in alcuni casi, provoca il favoritismo di un vitello rispetto ad un altro (Sargentini et al., 2009).
Il tasso medio di fertilità (numero di bovine partorite sul numero di bovine inseminate) totale (2012-2015) è dell'85% e quello di fecondità (numero di vitelli nati sul numero di bovine inseminate) è del 92%.
La mortalità infantile è per lo più dovuta principalmente all'abbandono, da parte della madre, del più debole dei due vitelli di un parto gemellare, comportamento che risulta essere frequente.
Per i torelli l'età al primo salto è intorno ai 2-3 anni e la loro carriera riproduttiva dura mediamente 4 anni. Le manze vengono fecondate all'età di due anni ed il primo parto avviene a tre anni.
Attualmente l'interparto è di circa 438 giorni (circa 14,6 mesi).
La carriera riproduttiva delle vacche dura mediamente 10-12 anni, con una media di 8-9 vitelli in carriera.
Va sottolineato che la riproduzione della mandria è strettamente correlata agli andamenti stagionali che determinano l'andamento produttivo dei pascoli e, di conseguenza, le condizioni alimentari degli animali.
Un aspetto particolare che caratterizza la riproduzione dell'allevamento bovino Maremmano di Tor Mancina è il tasso di gemellarità. Nel 2010 è stato adottato un nuovo protocollo di management dell'allevamento, rispetto al passato, al fine di aumentare il tasso di gemellarità. Precedentemente le vacche con parto gemellare o i vitelli gemelli venivano venduti.
Nelle aziende bovine è molto importante ottimizzare l'efficienza riproduttiva al fine di mantenere un buon profitto economico, infatti sono molti i costi associati alla riproduzione.

Efficienza riproduttiva nei bovini

I fattori che determinano l'efficienza riproduttiva in un'azienda bovina sono manageriali, fisiologici, nutrizionali, genetici e sanitari. I parametri che permettono di quantificare l'efficienza riproduttiva di un allevamento sono: fertilità, prolificità, fecondità, sopravvivenza e mortalità.

Il profitto di un allevamento bovino da carne è strettamente legato all'efficienza riproduttiva delle fattrici, dal momento che la produzione del vitello costituisce la parte principale dei ricavi annuali dell'azienda.
L'obiettivo di una gestione efficiente dell'allevamento è quello di ottenere un interparto medio di circa 365 giorni, ossia di mettere ogni bovina nella condizione di produrre un vitello all'anno. Bovine che presentino problemi di parto o difficoltà a ripristinare l'attività riproduttiva nel periodo successivo al parto tendono ad allungare significativamente la durata dell'interparto e, quindi, a ridurre la redditività potenziale dell'allevamento.

Gemellarità nei bovini

Il bovino (*Bos taurus*) è una specie unipara, il che significa che nella maggior parte dei casi solo un follicolo, all'interno di ogni ondata follicolare, è selezionato per diventare dominante e acquisire le capacità ovulatorie portando alla nascita di un solo feto per gravidanza. In alcuni casi si può presentare il carattere della gemellarità, ma la frequenza è intorno all'1% (Komisarek e Dorynek, 2002) nella maggior parte delle mandrie, anche perché il carattere non è selezionato. Nelle mandrie di vacche da carne, l'incidenza di nascite gemellari è più alta e si registrano valori anche del 5% (Kirkpatrick, 2002). La gemellarità può essere classificata in due tipi: monozigoti (MZ), dizigoti (DZ). L'identificazione delle gravidanze gemellari nei bovini viene in molti casi determinata attraverso l'ecografia o con nuove tecnologie come il DNA finger printing, che sono in grado di indentificare con maggior successo la zigosità nei bovini. La maggior parte dei gemelli nella specie bovina sono dizigoti e possono essere dello stesso sesso o opposto. Nei parti gemellari dizigotici dei bovini può verificarsi l'effetto *"freemartin"*, causato da connessioni vascolari tra le placente in sviluppo di feti eterosessuali, e il risultato è la mascolinizzazione del tratto riproduttivo femminile a vari livelli (Fricke, 2001).
Anche gli allevatori di vacche da carne sono sfavorevoli alla selezione del carattere gemellarità, per i problemi riportati sopra. Ma come riporta Nephawe (2002), la nascita di due vitelli da una sola fattrice potrebbe avere un forte impatto positivo sull'efficienza riproduttiva e quella economica dell'allevamento. Il "Twinning Project" sviluppato presso US Meat Animal Research Center, volto a selezionare la gemellarità nell'allevamento da carne sperimentale del Clay Center, in Nebraska, ha dimostrato la fattibilità di ciò. Il gruppo di ricercatori americani è riuscito ad ottenere un aumento della gemellarità dal 3,1% al 55% nell'arco di venti anni (Echternkamp e Gregory, 2002), selezionando per il tasso di ovulazione, che ha una forte correlazione genetica (0,75) con il tasso di gemellarità. E' stato dimostrato che la selezione per la gemellarità non aveva nessuna influenza negativa sul tasso di crescita e sulla qualità della carcassa dei vitelli gemelli (Gregory et al., 1997).
Numerose sono le evidenze che la gemellarità nei bovini sia influenzata da fattori ambientali che possono favorire la sua espressione (Adams, 1995, Gregory et al., 1997, Min et al., 2003) e che abbia basi genetiche (Marchitelli e Nardone, 2015, Kirkpatrick e Morris, 2015, Vinet et al., 2012).

Fattori genetici che influenzano la gemellarità nei bovini

L'espressione della gemellarità nei bovini, come in altri mammiferi, è influenzata da fattori genetici come dimostrato dai numerosi lavori scientifici in cui: a) è stata calcolata l'ereditabilità genetica e genomica; b) sono stati individuati QTLs per il twinning rate; c) sono stati individuati polimorfismi in geni candidati; d) sono stati individuati geni associati al carattere mediante studi di Genome Wide Association.

L'ereditabilità genetica è stata stimata variare tra un minimo di 0,006 ed un massimo di 0,101 in studi su razze bovine da carne e da latte (Van Vleck e Gregory, 1996; Gregory et al., 1997; Ron et al., 1990; Weller et al., 2008; Ghavi Hossein-Zadeh et al., 2009, Moioli et al., 2017). A differenza della specie umana, ovina e murina, nei bovini, gli studi su geni candidati e associazioni di eventuali polimorfismi con la gemellarità non sono molti. Zhang et al. (2009) hanno individuato, in razze bovine cinesi, una delezione nel gene BMP15 (Bone Morphogenetic Factor 15), che potrebbe alterare la funzione della proteina. Nel gene GDF9 (Growth Differentiation Factor 9) sono stati associati due polimorfismi con la superovulazione e la qualità dello sperma, utilizzando bovini di razza Holstein cinesi (Tang et al., 2013a, Tang et al., 2013b). Marchitelli e Nardone (2015) hanno individuato, utilizzando la razza bovina Maremmana, un polimorfismo nel gene GDF9, che potrebbe alterare la struttura e funzione della proteina, solo in bovine con parto gemellare.
Kim et al. (2009) utilizzando il 54k bovine BeadChip sono riusciti a confermare un QTL per il tasso di gemellarità in una popolazione di bovine di razza Holstein degli Stati Uniti. In particolare un polimorfismo nel gene IGF1 (Insulin like Growth Factor 1) è stato associato con il carattere in esame. Mediante uno studio di Genome Wide, con 3k bovine BeadChip, i geni SMAD3 (SMAD family member 3), SMAD6 (SMAD family member 6) and IQCH (IQ motif containing H) sono risultati candidati per il tasso di ovulazione (Kirkpatrick e Morris, 2015).

DESCRIZIONE DELLA RICERCA E DEI RISULTATI DEL PROGETTO GEMMA

Fin dal 1923, quando fu fondato l'Istituto zootecnico di Roma, il CREA-ZA nell'azienda sperimentale di Tormancina alleva un nucleo in purezza di bovini di razza Maremmana.
Il nucleo iniziale era composto da 60 vacche e tre tori in attività, provenienti da vari allevamenti della Maremma tosco-laziale.
Ad oggi l'allevamento è composto da 86 vacche, 10 giovenche, 10 manze, 10 vitelle post-svezzamento, 2 tori, 2 vitelli post-svezzamento, per un totale di 120 capi.
Fino al 1978 la mandria era suddivisa in tre gruppi allevati al pascolo in tre differenti località: a) azienda di Montemaggiore, b) pascoli di Alingoli c) pascoli Monte dei Preti. Attualmente la mandria è suddivisa negli ultimi due gruppi e dal 2011, in uno dei due gruppi viene utilizzato un toro di razza Piemontese, per ottenere vitelli meticci con una conformazione migliore per la carne (Figura 1).
Figura 1. Ripresa dal satellite delle zone di pascolo entro l'azienda di Tormancina

La riproduzione della mandria avviene per monta naturale, la rimonta maschile è aziendale e gli animali sono suddivisi in gruppi di monta al fine di poter risalire con certezza alla paternità del redo. Il toro viene immesso nel gruppo da maggio a luglio, gli animali rimangono al pascolo e la diagnosi di gravidanza viene effettuata in autunno, in occasione della profilassi annuale. Le nascite avvengono nel periodo che va da febbraio a maggio e nella prima settimana di vita dei redi si effettua la pesatura, la bollatura e l'immatricolazione per il riconoscimento aziendale.

L'obiettivo generale del progetto GEMMA consisteva nella costituzione di una mandria sperimentale caratterizzata da una elevata frequenza di parti gemellari.

Per ottenere ciò sono stati seguiti i seguenti obiettivi specifici.

Obiettivo specifico 1

Costruzione degli alberi genealogici, calcolo del coefficiente di parentela, di consanguineità, stima del breeding value

Per ottenere ciò nell'intervallo di tempo 2012-2015 è stato attuato un protocollo di management e di registrazione dei dati aziendali diverso da quello degli anni precedenti.
E' stato creato un database informatico ove sono stati registrati tutti gli eventi riproduttivi, la mortalità dei nuovi nati, i dati genealogici e altri fenotipi utili (eventuali pesi, aspetti sanitari, eliminazioni ed altro) di tutti gli animali del passato e del presente. Le informazioni genealogiche raccolte nel database sono state utili per ricostruire le famiglie, in base al toro, e per calcolare il coefficiente di parentela e di consanguineità. Una volta costituite le famiglie, sono stati individuati i riproduttori che hanno maggiormente contribuito alla diffusione del carattere gemellarità e quindi le famiglie con il tasso di gemellarità più alto. A differenza del passato, le fattrici con parto gemellare e i vitelli gemelli, sono stati lasciati nella mandria così da ottenere una tasso di gemellarità più alto.

Risultati

Il database informatico contiene le informazioni di 1260 individui nati tra il 1963 e il 2014, così suddivisi in 527 maschi e 733 femmine, delle quali 402 hanno avuto almeno un parto dal 1983 al 2015. Tra tutti gli individui sono stati individuati 37 padri di vacche: tre con un numero di figlie maggiore di 50, otto con un numero di figlie tra 16 e 50, nove con un numero di figlie tra 6 e 15 e 17 con un numero di figlie minore di sei. Nell'intervallo di tempo 1983-2015 sono stati registrati 2130 parti di cui 2009 singoli e 121 gemellari.
Nell'intervallo di tempo 2012-2015 sono stati registrati tutti gli eventi riproduttivi e la mortalità dei nuovi nati. Nello stesso arco di tempo il tasso di gemellarità è variato tra il 5,63% e il 12,77% (Tabella 1).

Table 1 *Twinning rate from 2012 to 2015*

Year	Total calving	Twin	Twin (%)
2012	71	4	5.63
2013	72	6	8.33
2014	80	8	10.00
2015	94	12	12.77

Durante i quattro anni la mortalità totale è stata del 8,93%, con una differenza significativa tra parti singoli e gemellari (5,23% vs 26,57%, P<0,0001) e anche tra mandria in purezza e incrocio con la Piemontese (12,77% vs 4,40%, P=0,006) (Tabella 2).

Table 2 *Calf mortality in single and twin births, in the Maremmana (Mar) purebred v. Piedmontese crossbred (Pied)*

Parameters	Overall	%	Mar (*n*)	Mar (%)	Pied (*n*)	Pied (%)	*P* diff (Mar–Pied)
Calving (*n*)	317		171	53.94	146	46.06	–
Single calving	287	90.54	154	90.06	133	91.09	–
Twin calving	30	9.46	17	9.94	13	8.91	–
Total mortality	31	8.93	24	12.77	7	4.40	0.006
Total stillborn (out of total born)	16	4.61	11	5.85	5	3.14	Ns
Total mortality from birth to weaning (out of total born)	15	4.73	13	7.60	2	1.26	0.010
Single calf mortality (out of total single born)	15	5.23	13	8.44	2	1.50	0.009
Twin calf mortality (out of total twin born)	16	26.57	11	32.35	5	19.23	Ns
Single stillborn (out of total single born)	7	2.44	6	3.90	1	0.75	Ns
Twin stillborn (out of total twin born)	9	15.0	5	14.71	4	15.38	Ns
Single calf mortality from birth to weaning (out of total single born)	8	2.80	7	4.55	1	0.75	0.052
Twin calf mortality from birth to weaning (out of total twin born)	7	11.70	6	17.65	1	3.85	0.090

La mortalità è risultata significativamente maggiore nei parti singoli di maremmana pura (8,44%) rispetto ai parti singoli dell'incrocio con Piemontese (1,50%, P=0,009). La mortalità alla nascita nei parti gemellari della razza pura era molto simile a quella dei parti gemellari dell'incrocio (14,71% vs 15,38%). Mentre la mortalità dalla nascita allo svezzamento era significativamente maggiore nei parti singoli della razza pura (4,55%) rispetto a quelli singoli dell'incrocio (0,75%, P=0,052). Se consideriamo insieme parti singoli e gemellari, la mortalità dalla nascita allo svezzamento era significativamente più alta nella razza pura rispetto agli incroci (7,60% vs1,26%, P=0,01).
Sono stati registrati solo due parti difficili tra le fattrici che hanno avuto parti singoli. Solo un vitello gemello è stato abbandonato dalla vacca, ma è sopravvissuto perché allevato in vitellaia e alimentato artificialmente.

I dati raccolti nel database sono stati utilizzati per calcolare il breeding value, utilizzando un single-trait animal model, ove l'ambiente è incluso come fattore permanente:

$$y_{ijk} = \mu + C_j + b_1(età_{ik}) + b_2(età^2_{ik}) + b_3(F_i) + a_i + p_i + e_{ijk}$$

dove y_{ijk} è il numero di vitelli nati al k-esimo parto della i-esima vacca; Cj è l'effetto fisso del j-esimo anno di parto ($_j$=1,2,3....33); $età_{ik}$ l'età in giorni della i-esima vacca al suo k-esimo parto; F_i è il coefficiente di consanguineità della i-esima vacca; b_1, b_2, b_3 sono i coefficienti di regressione; p_i effetto permanente dell'ambiente della i-esima vacca; a_i effetto genetico additivo dell'i-esimo animale; e_{ijk} effetto residuo del k-esimo parto della i-esima vacca.
Poiché il parto gemellare è un carattere dicotomico e le frequenze sono chiaramente sbilanciate tra le due categorie, è stato utilizzato anche un threshold animal model.
Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il pacchetto Multivariate Mixed Models DMU (Derivative-free approach to Multivariate analysis by Restricted Maximum Likelihood), version 6.0, release 5.2 (Madsen and Jensen, 2013). Per utilizzare sia il single trait animal model che il threshold animal model sono stati utilizzati due moduli diversi del medesimo pacchetto statistico.
Il pacchetto DMU non fornisce l'errore standard dell'ereditabilità, e per stimarlo è stato utilizzato l'approccio proposto da Su et al. (2007).
Sono state calcolate anche le correlazioni tra i caratteri gemellarità, fertilità e mortalità del vitello.
Per poter verificare se la gemellarità aveva avuto un effetto negativo sulla fertilità, è stato adottato un *two trait threshold animal model* così da stimare la correlazione genetica tra il numero di parti gemellari durante la vita della fattrice e il numero di anni in cui la stessa era rimasta vuota. Il modello statistico applicato è il seguente:

$y_{ijl} = \mu_l + C_{jl} + b\,(F_{il}) + a_{il} + e_{ijl}$

dove y_{ijl} per l=1 numero di parti gemellari della i-esima vacca; per l=2 numero di anni in cui la stessa vacca è rimasta vuota; C_{jl} effetto fisso del numero di anni dal primo parto alla morte (j=1,2,3...17) sul carattere l-esimo; F_{il} coefficiente di consanguineità della i-esima vacca; b coefficiente di regressione per l-esimo carattere; a_{il} effetto genetico additivo dell'i-esimo animale sul l-esimo carattere; e_{ijl} effetto residuo per la i-esima vacca e l-esimo carattere. Il valore della correlazione fenotipica tra gemellarità e fertilità è stata ottenuto applicando un test di indipendenza del chi-quadro per stimare la probabilità di una vacca di rimanere vuota l'anno successivo al parto gemellare o al parto singolo. Inoltre per analizzare la relazione tra parto gemellare e mortalità del vitello (totale e entro gruppo), Maremmana vs incrocio con Piemontese è stato utilizzato un test dell'indipendenza del chi-quadro.
Come si può vedere nella tabella 3 il valore di ereditabilità ottenuto dal threshold model (0,062±0,093) era più alto rispetto al linear model (0,014±0,018). I valori di breeding value stimati con entrambi i modelli sono riportati in tabella 4.

Table 3 *Genetic parameters for twinning (SE in parentheses) estimated by Repeatability Linear Model (R_LM) and Repeatability Threshold Model (R_ThM)*

	Models	
Parameters	R_LM	R_ThM
σ^2_a	0.00074 (0.001)	0.08731 (0.003)
σ^2_{pe}	0.00307 (0.001)	0.31264 (0.003)
σ^2_e	0.04973 (0.002)	1.00000 (0.000)
r	0.071 (0.004)	0.286 (0.012)
h^2	0.014 (0.018)	0.062 (0.093)

σ^2_a = additive genetic variance; σ^2_{pe} = permanent environmental variance; σ^2_e = error variances; r = repeatability: $(\sigma^2_{pe} + \sigma^2_a) / (\sigma^2_{pe} + \sigma^2_a + \sigma^2_e)$; h^2 = heritability: $(\sigma^2_a) / (\sigma^2_{pe} + \sigma^2_a + \sigma^2_e)$.

Table 4 *EBVs estimated by Repeatability Linear Model (R_LM) and Repeatability Threshold Model (R_ThM)*

	Models	
Parameters	R_LM	R_ThM
Mean	−0.0052	−0.0013
SD	0.0240	0.0087
Minimum	−0.0059	−0.0202
Maximum	0.1201	0.0303

Mentre nella Figura 1 è riportata la media dei valori del breeding value per anno di nascita predetti con il threshold model.

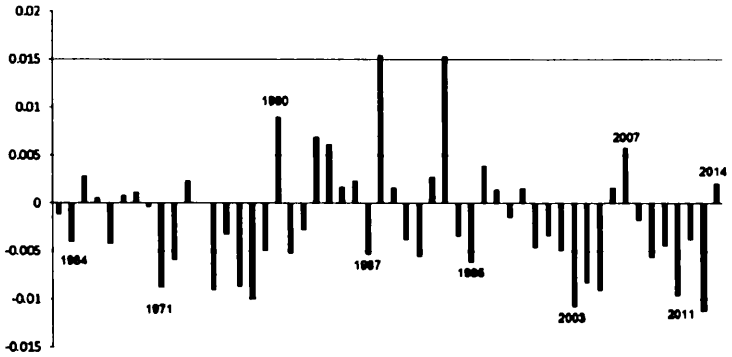

Figure 1 Yearly averages of EBVs for twinning rate from 1963 to 2014.

Per quanto riguarda la correlazione tra gemellarità e fertilità su 1945 parti singoli disponibili nel database, 1590 sono stati seguiti nell'anno successivo da un parto (81,7%), mentre su 120 parti gemellari, 96 sono stati seguiti nell'anno successivo da un parto (80%), ma il test del chi-quadro non è risultato significativo.

Discussione

I risultati ottenuti per il primo obiettivo specifico del progetto GEMMA hanno dimostrato che l'obiettivo di selezionare il carattere gemellarità merita di essere perseguito, anche se è stata calcolata una moderata correlazione negativa tra tasso di gemellarità e anni in cui la vacca resta vuota. Il valore di mortalità per i vitelli nati da parto gemellare rappresenta un risultato negativo, ma tale valore era molto più basso nella popolazione incrociata con la razza Piemontese.
Ma la mortalità dei vitelli può essere ridotta ulteriormente modificando e migliorando il management della popolazione di Maremmana.
E' stato ottenuto un valore di ereditabilità per la gemellarità più alto con il *threshold model* rispetto al *single model*, confermando la letteratura (Ron et al., 1990; Ghavi Hossein-Zadeh et al., 2009), comunque tale valore è basso, come stimato in altre popolazioni con parto gemellare (Vleck and Gregory, 1996; Gregory et al., 1997; Syrstad, 1984, Ron et al., 1990; Ghavi Hossein-Zadeh et al., 2009; Weller et al., 2008).

Obiettivo 2 Individuazione di regioni cromosomiche associate con il carattere gemellarità

Per comprendere le basi genetiche che sottendono all'espressione del carattere gemellarità è sono stati utilizzati dei metodi di indagine genomica.
Infatti 119 vacche (vive nel 2009) sono state genotipizzate utilizzando il BovineSNP54 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA), che contiene 54.524 *Single Nucleotide Polymophisms*. I risultati di genotipizzazione sono stati utilizzati per eseguire una *Genome Wide Association analysis* mediante il pacchetto statistico GenABEL di R (Aulchenko et al., 2007) applicando l'approccio a tre step GRAMMAR-GC (genome-wide association using mixed model and regression – genomic control). Mediante questa procedura si stima la matrice di parentela genetica dai dati di genotyping, così da poter comparare i valori di eredibilità genetica, ottenuti solo con la matrice di parentela genealogica, con quelli di ereditabilità genomica.
Per poter individuare le regioni cromosomiche associate con la gemellarità (mediante GWAS), non sono stati utilizzati come fenotipi i *breeding value*, perché potrebbero dare dei falsi positivi (Ekine et al., 2014), ma si è deciso di utilizzare gli effetti random non correlati di ogni vacca, ottenuti dal seguente modello senza considerare la parentela tra gli animali:

$$y_{ijk} = \mu + C_j + b_1(età_{ik}) + b_2(età^2_{ik}) + b_3(F_i) + a_i + e_{ijk}$$

dove y_{ijk} è il numero di vitelli nati al k-esimo parto della i-esima vacca; Cj è l'effetto fisso del j-esimo anno di parto ($_j$=1,2,3....33); età$_{ik}$ l'età in giorni della i-esima vacca al suo k-esimo parto; F_i è il coefficiente di consanguineità della i-esima vacca; b_1, b_2, b_3 sono i coefficienti di regressione; p_i effetto permanente dell'ambiente della i-esima vacca; a_i effetto random non correlato dell'i-esimo animale; e_{ijk} effetto residuo del k-esimo parto della i-esima vacca.
Per l'analisi sono stati esclusi tutti i markers con una MAF (minor allele frequency) minore del 1% e con un call rate minore del 95%, e sono state rimosse dal database le vacche che avevano un valore di missing data minore del 10%.

Risultati

Sono stati esclusi 409 e 12.584 SNPs che avevano, rispettivamente, un *call rate* minore del 95% e una MAF minore dell'1%, mentre sono state rimosse dal database sei vacche con un *individual call rate* di 0,90. Dopo il controllo di qualità del database sono stati utilizzati per la GWAS 41.638 SNP e 113 vacche.
Il valore di eterozigosità media era di 0,363±0,037 per individuo e 0,337±0,148 per SNPs. Il valore di ereditabilità genomica era 0,29±0,021.
I risultati per cromosoma dei polimorfismi associati sono rappresentati tramite Manhattan plot (Figura 4). Il limite di significatività è stato scelto in accordo a Panagiotu and Ioannidis (2012).

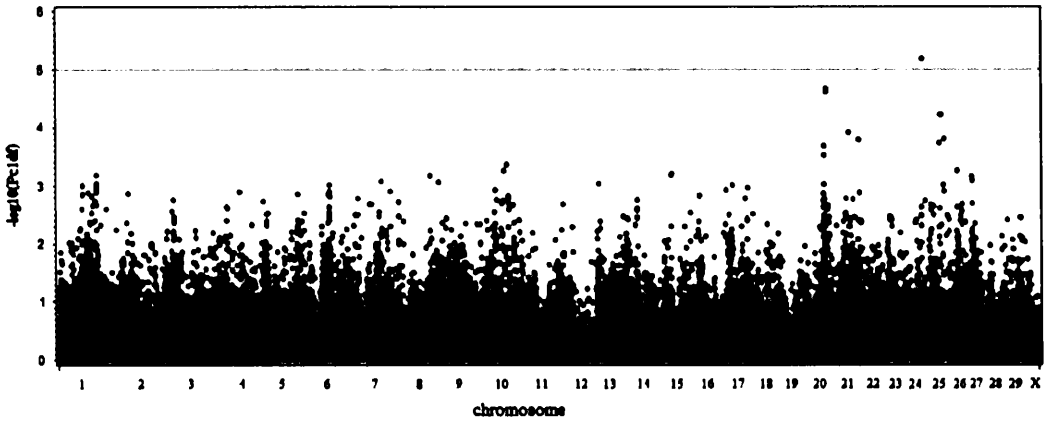

Figure 4 Manhattan plot displaying the results (−log10 of *P*-value) of the genome-wide scan using the GRAMMAR-GC method with respect to the genomic position. The horizontal lines separate single nucleotide polymorphisms (SNPs) with *P*-values <0.001 and < 0.01, respectively.

Un SNP significativo (Hapmap22923-BTA-129564) è stato identificato sul BTA24 alla posizione 40020911 bp con un P-value di 6.47 e −06 e una MAF of 1.32%; questo polimorfismo spiega lo 0,034% della varianza fenotipica della gemellarità. Per cercare i geni canditati nella regione intorno al SNP significativo è stata scelta una finestra di ±300 kb, perché il campione di individui genotipizzati era troppo ristretto. Camminando sul cromosoma 24 sono stati individuati due geni ARHGAP28 (Rho GTPase activating protein 28), 208 kb a valle del marker and TMEM200C (*transmembrane protein* 200C), 282 kb a monte del marker. ARHGAP28 regola l'assemblaggio delle fibre di actina nel citoscheletro; mentre TMEM200C codifica per una proteina coinvolta principalmente nelle comunicazioni della cellula con l'ambiente esterno.

Discussione

Dai risultati ottenuti si evince che l'ereditabilità genomica (0,29) era molto più alta rispetto a quella genetica, in accordo con i modelli di simulazione di (Zaitlen et al., 2014). Sebbene l'ereditabilità genomica è stata calcolata solo su un piccolo numero di animali genotipizzati, il suo valore fa ben presumere che ci possa essere la possibilità di selezionare per il carattere gemellarità. Per quanto

riguarda i due geni identificati solo per ARHGAP28 è stato ipotizzato un coinvolgimento nel processo di ovulazione (Catalano et al., 2007).
In futuro bisognerà ripetere un'analisi simile su un maggiore numero di animali, per poter confermare il valore di ereditabilità genomica, e la vera associazione dei due geni con il carattere gemellarità dovrà essere confermata mediante altri tipi di analisi genetiche, quali il sequenziamento o l'espressione dei geni

Obiettivo 3 Individuazione di polimorfismi in geni candidati associati con il carattere gemellarità

Al fine di realizzare tale obiettivo sono stati scelti come geni candidati il gene BMP15 (*bone morphogenetic protein* 15) e il gene del GDF9 (*Growth differentiation factor* 9).
Per questa analisi è stato utilizzato il DNA di 124 vacche (vive nel 2009) e sono state eseguite le seguenti analisi
Per ogni campione sono state svolte le seguenti operazioni:

1. Estrazione DNA, controllo della qualità e quantità
2. Amplificazione delle regioni di interesse dei geni BMP15 e GDF9
3. Purificazione e sequenziamento degli ampliconi ottenuti
4. Allineamento delle sequenze ottenute e ricerca dei polimorfismi
5. Analisi delle mutazioni individuate.

Amplificazione delle regioni di interesse dei geni BMP15 e GDF9, mediante reazione a catena della polimerasi (PCR).

Per l'amplificazione dei frammenti dei geni BMP15 e GDF9, di nostro interesse, sono stati disegnati dei primer (o oligonucleotidi) utilizzando le informazioni disponibili in banca dati (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ e http://www.ensembl.org/index.html) sulle sequenze dei geni e degli mRNA nella specie bovina. I primer sono stati disegnati utilizzando il software online Primer3 (http://primer3.ut.ee/).
I primer utilizzati sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Tabella riassuntiva dei primer utilizzati

BMP15 II esone fw	5'TCAGGAAGAGGCTCCTCAAA3'
BMP15II esone rw	5'AAGGCTGAGGGACACTCTGA3'
GDF9 I esone fw	5'GTGTTCCTTGCTAATTCTTCCA3'
GDF9 I esone rw	5'TTCTTCTTCCCTCCACCC3'
GDF9 II esone fw	5'TGGCATTACTGTTGGATTGTTTT3'
GDF9 II esone rw	5'ATAAGCAATTGAGCCATCAG3'
GDF9 3'UTR fw	5'CTGATGGCTCAATTGCTTAT3'
GDF9 3'UTR rw	5'TCATTTAAACATTTGGCCAT3'

Sequenziamento dei prodotti PCR

Per la determinazione delle sequenze nucleotidiche dei singoli frammenti amplificati, per ogni individuo, è stato utilizzato un servizio di sequenziamento in out-sourcing (ditta Eurofins). Ogni frammento è stato sequenziato con entrambi i primer Fw e Rw.

Allineamento delle sequenze e ricerca dei polimorfismi

Le sequenze forward e reverse ottenute dal sequenziamento automatico sono state allineate mediante il software BioLign, al fine di ottenere la sequenza *consensus*. Per accertarsi di aver amplificato il gene di nostro interesse, la sequenza *consensus* è stata sottoposta ad analisi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Dopo aver accertato l'appartenenza del frammento amplificato al gene di nostro interesse, la sequenza *consensus* è stata allineata, sempre mediante BioLign, con le sequenze utilizzate per disegnare i *primer*. Questo allineamento ci permette di verificare di aver un amplicone corrispondente al frammento di nostro interesse e ci può mettere in evidenza anche degli eventuali polimorfismi, se la sequenza dell'animale sequenziato differisce in alcuni punti dalla sequenza depositata.

Analisi delle mutazioni individuate

Una volta sequenziati i singoli frammenti e dopo aver individuato singoli polimorfismi, o delezioni/inserzioni, se tali mutazioni si trovano entro gli esoni è interessante vedere se hanno un'influenza sulla struttura e funzione della proteina codificata dai geni studiati. Per capire la funzione e la lunghezza delle singole regioni della proteina, N-terminale (nel nostro caso peptide segnale), parte centrale (nel nostro caso propetide) e C-terminale (nel nostro caso proteina funzionante), è stato consultato il database UNIPROT (http://www.uniprot.org/), il quale rappresenta una risorsa accessibile da parte del ricercatore per ottenere informazioni sulla sequenza delle proteine, su eventuali siti di modificazioni post-traduzionali, sulla funzione delle singole regioni della proteina, sulla similarità della sequenza proteica in diversi organismi, ecc.

Risultati

L'analisi delle sequenze ha rilevato: 1) GDF9: un polimorfismo nel I esone (104, G/C) e una delezione nel 3'UTR (245-246 TA/-); 2) BMP15: due delezioni (263-266 AAGA/-, 257-260 GCCT/-) e una duplicazione (263 DUPL). I polimorfismi del gene GDF9 sono stati identificati solo in vacche con parto singolo, mentre le mutazioni del gene BMP15 sono state identificate sia in vacche con parto gemellare che con parto singolo. Le delezioni nel gene BMP15 causano uno scorrimento del modulo di lettura con la comparsa di un codone di stop prematuro. Queste mutazioni potrebbero influenzare la funzione e struttura della proteina BMP15 e potrebbero essere considerate una causa possibile dell'espressione del carattere gemellarità nella razza bovina Maremmana.

Discussione

In particolare, Marchitelli e Nardone (2015) in una popolazione di bovini di razza Maremmana avevano individuato nel gene GDF9, 4 polimorfismi, ma nessuno di questi è presente nella popolazione di bovini di razza Maremmana di Tormancina. Alcuni anni fa ciò era stato confermato mediante genotyping (presso una ditta in out-sourcing), dei suddetti polimorfismi nelle 111 vacche utilizzate in questa tesi (dati non pubblicati).

Nel caso del gene GDF9 i polimorfismi individuati sono presenti solo in bovine che nella loro carriera hanno avuto parto singolo e, in particolare, il gene GDF9 non sembra molto variabile nella popolazione bovina indagata.
Anche nel caso del gene BMP15, le mutazioni già individuate nella popolazione di Maremmane di Castelporziano non sono presenti nelle bovine oggetto di studio in questo lavoro.
Tra le mutazioni individuate, le due delezioni sembrano avere un effetto deleterio sulla funzione e struttura della proteina BMP15; sono state individuate sia in bovine a parto singolo che in bovine a parto gemellare. I risultati trovati, al momento, non ci permettono di associare i polimorfismi al fenotipo "parto gemellare", però si devono tenere sotto controllo le vacche a parto singolo che presentano le mutazioni, poiché, vista la carriera molto lunga delle bovine maremmane, potrebbero in futuro avere dei parti gemellari. Inoltre nell'osservare la distribuzione delle vacche nei gruppi di monta c'è il forte sospetto dell'influenza sul carattere dell' "effetto toro", e ciò viene rafforzato dal fatto che il gene BMP15 mappa sul cromosoma X, quindi potrebbe derivare anche dalla linea maschile. Questo verrà in futuro confermato sia mediante la ricostruzione degli alberi genealogici, ma anche semplicemente con il sequenziamento del gene BMP15 nei giovani tori della mandria nati da parti gemellari.
La terza mutazione, la duplicazione, merita ulteriore approfondimento perché potrebbe essere una CNV e influenzare in maniera dose-dipendente, rispetto a una mutazione puntiforme o una indel, l'espressione del gene. Questa mutazione è stata individuata anche in alcune vacche da latte della azienda, per le quali sono stati registrati dei parti gemellari (dati preliminari).
Infine tra le vacche studiate non è stato trovato nessun individuo omozigote per le mutazioni individuate. Le possibili ragioni sono: che le vacche omozigoti per le mutazioni potrebbero non esistere nella popolazione sotto studio per puro caso oppure perché la mutazione allo stato omozigote causa sterilità e quindi le femmine omozigoti non sono diventate madri e non possono quindi essere presenti nel nostro database demografico.

Obiettivo 4 Integrazione dei risultati ottenuti nei sistemi attuali di allevamento di bovini da carne al fine di aumentare il numero di vitelli da ristallo

Al giorno d'oggi, gli obiettivi di selezione dell'allevamento di animali da reddito sono principalmente rivolti ai caratteri funzionali, in particolare alla longevità. Ma la Comunità Europea richiede anche il miglioramento del benessere animale e la fattibilità della sostenibilità economica e ambientale delle produzioni animali. Nel caso degli allevamenti dei bovini da carne i problemi principali sono rappresentati da: 1) dipendenza dall'estero per l'approvvigionamento di carne, principalmente vengono importati animali vivi dalla Francia (broutard), ma è da sottolineare la forte crescita d'importazioni dalla Polonia (+208% nell'anno 2014-2015, in particolare i vitelloni tra gli 80 e i 300 Kg); 2) nel decennio 2005-2015, l'auto-approvvigionamento di carne è diminuito dell'11,5% (elaborazioni ISMEA su dati ISTAT); 3) diminuzione del numero di vacche nutrici (-7% biennio 2014-2016).
Vista la situazione attuale è auspicabile un aumento della produzione nazionale di vitelli da ingrasso, per riuscire a ridurre l'importazione dall'estero. Per aumentare in tempi relativamente brevi i ristalli "italiani", una possibile soluzione potrebbe essere quella di aumentare la percentuale di parti gemellari in alcune razze italiane da carne.
Alla gemellarità, in particolare nelle vacche da latte, sono legati diversi fattori negativi quali distocia, aborti, ridotta sopravvivenza dei vitelli, intervallo parto-concepimento più lungo, ritenzione della placenta e vitelle "freemartin" (Kirkpatrick, 2002). La situazione si mostra completamente differente nel caso delle vacche da carne, in particolare quando si prendono in considerazione delle razze rustiche simili alla Maremmana o nel caso della Piemontese. L'aumento dei parti gemellari potrebbe avere una ricaduta molto positiva sulla sostenibilità economica e ambientale dell'allevamento.

Infatti la produzione di due vitelli da un'unica fattrice ridurrebbe il carico animale per ettaro, con conseguenze positive sia sull'impatto ambientale, vista la riduzione di emissioni gassose, solide e liquide sia sull'efficienza economica, vista la diminuzione del costo della fattrice per capo destinato all'ingrasso (Echternkamp e Gregory, 1999).
Diversi studi hanno dimostrato che la gemellarità ha un'ereditabilità molto bassa, ma negli ultimi anni è stata calcolata anche un'ereditabilità genomica che risulta leggermente più alta (Moioli et al., 2017). Studi di Genome Wide Association hanno dimostrato l'associazione, statisticamente significativa, di diversi geni con il tasso di gemellarità (Kirkpatrick e Morris, 2015, Moioli et al., 2017), ma in quei casi non sono stati individuati geni che influenzano la follicologenesi.

BIBLIOGRAFIA CITATA NELLA RELAZIONE DI GEMMA

1. Ciani F. and Matassino D. (2001) "Il Bovino Grigio Allevato In Italia: Origine" Nota I: Il Bovino Macrocero. Taurus Speciale 12: 89-99.
2. Ciani F., Giorgetti A., Sargentini C., Occidente M., Matassino D. (2010) "Bovino Maremmano "Primitivo" Ecologia, Origine, Etologia E Allevamento" Taurus, 21, 21-34
3. Sargentini C., Giorgetti A., Tocci R., Lorenzini G., Martini A., Gentili G. (2009) "La Diversificazione Produttiva Nella Razza Maremmana Come Risposta Alla Stagionalità Dei Parti" Periodico Dell'a.N.A.B.I.C; Anno XX – Numero 3 – Maggio/Giugno.
4. Komisarek J. and Dorynek Z. (2002) "Genetic Aspects Of Twinning In Cattle" Journal Of Applied Genetics 43, 55-68.
5. Kirkpatrick B.W. (2002) "Management Of Twinning Cow Herds" Journal Of Animal Science 80,398 Suppl 2, E14-E18.
6. Fricke P.M. (2001) "Twinning In Dairy Cattle" The Professional Animal Scientist
7. NEPHAWE K.A. (2012) Twinning in beef cattle: an opportunity to improve reproductive and economic efficiency of beef production"
8. Echternkamp S.E. and Gregory K.E. (2002) "Effects of twinning on postpartum reproductive performance in cattle selected for twin births" Journal of Animal Science 77, 48–60.
9. Gregory K. E., Bennett G. L., Van Vleck L. D., Echternkamp S. E., Cundiff L.V. (1997) "Genetic And Environmental Parameters For Ovulation Rate, Twinning Rate, And Weight Traits In A Cattle Population Selected For Twinning" Journal of Animal Science 75: 1213–1222.
10. Adams N.R. (1995) "Detection Of Effects Of Phytoestrogens On Sheep And Cattle" Journal of Animal Science 73: 1509 – 1515.
11. Min B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T. and Mcnabb, W.C. (2003) "The Effect Of Condensed Tannins On The Nutrition And Health Of Ruminants Fed Fresh Temperate Forages: A Review" Animal Feed Science And Technology. 106: 3-19.
12. Marchitelli C. and Nardone A. (2015) "Mutation And Sequence Variants In GDF9, BMP15 And BMPR1B Genes In Maremmana Cattle Breed With Single And Twin Birth" Rendiconti Accademia Nazionale dei Lincei. Scienze Fisiche e Naturali 26 (S3) DOI 10.1007/s12210-015-0418-1
13. Kirkpatrick B.W. and Morris C. (2015) "A Major Gene for Bovine Ovulation Rate" PLoS ONE 400 10 (6): e0129025.
14. Vinet A., Touze' J.L., Bichot R., Hestault O., Bellayer C., Boussaha M.,Fritz S.,Guillaume F., Sapa J., Bodin L., Phocas F. (2010) "Genome wide scan For Bovine Ovulation Rate Using Dense Snp Map" 9th World Congress On Genetics Applied Livestock Production, Leipzig, Germany, 1–6,Volume 17, Issue 2, Pages 61-67.
15. Van Vleck L.D. and Gregory K.E. (1996) "Genetic trend and environmental effects in a population of cattle selected for twinning" Journal of Animal Science 74, 522–528.
16. Ron M., Ezra E. and Weller J.I. (1990) "Genetic analysis of twinning rate in Israeli Holstein cattle" Genetics Selection Evolution 22, 349–359.

17. Weller J.I., Golik M., Seroussi E., Ron M., Ezra E. (2008) "Detection Of Quantitative Trait Loci 433 Affecting Twinning Rate In Israeli Holsteins By The Daughter Design" Journal Of Dairy 434 Science 91, 2469–2474.
18. Ghavi Hossein-Zadeh N., Nejati-Javaremi A., Miraei-Ashtiani S.R., Kohram H. (2009) "Estimation Of Variance Components And Genetic Trends For Twinning Rate In Holstein Dairy Cattle Of Iran" Journal Of Dairy Science 92, 3411–3421.
19. Zhang L.P., Gan Q.F., Zhang X.H., Li H.D., Hou G.Y., Li J.Y., Gao X., Ren H.Y., Chen J.B., Xu S.Z. (2009) "Detecting A Deletion In The Coding Region Of The Bovine Bone Morphogenetic Protein 15 Gene (BMP15)" Journal of Applied Genetics 50(2): 145-148.
20. Tang K.Q., Yang W.C., Zhang X.X., Yang L.G. (2013a) "Effects Of Polymorphisms In The Bovine Growth Differentiation Factor 9 Gene On Sperm Quality In Holstein Bulls" Genetics Molecular Research 12(3):2189-2195.
21. Tang K.Q., Yang W.C., Li S.J., Yang L.G. (2013b) "Polymorphisms Of The Bovine Growth Differentiation Factor 9 Gene Associated With Superovulation Performance In Chinese Holstein Cows" Genetics Molecular Research 12(1):390-399.
22. Kim E.S., Shi X., Cobanoglu O., Weigel K., Berger P.J., Kirkpatrick B.W. (2009) "Refined Mapping Of Twinning-Rate Quantitative Trait Loci On Bovine Chromosome 5 And Analysis Of Insulin-Like Growth Factor-1 As A Positional Candidate Gene" Journal of Animal Science 87:835–843.
23. Madsen P. and Jensen J. (2013) "A user's guide to DMU. A package for analyzing multivariate mixed models, version 6, release 5.2." Center for Quantitative Genetics and Genomics, University of Aarhus, Tjele, Denmark.
24. Su G., Lund M.S. and Sorensen D. (2007) "Selection for litter size at day five to improve litter size at weaning and piglet survival rate" Journal of Animal Science 85, 1385–1392.
25. Van Vleck L.D. and Gregory K.E. (1996) "Variances of Additive and Dominance Genetic Effects for Ovulation and Twinning Rates in a Population Selected for Twinning" Journal of Animal Science 74:1234–1239
26. Syrstad O. (1984). Inheritance of multiple births in cattle. Livestock Production Science 11, 373–380.
27. Aulchenko Y.S., Ripke S., Isaacs A. and van Duijn C.M. (2007) "GenABEL: an R package for genome-wide association analysis" Bioinformatics 23, 1294–1296.
28. Ekine C.C., Rowe S.J., Bishop S.C. and de Koning D.J. (2014) "Why breeding values estimated using familial data should not be used for genome-wide association studies" G3-Genes, Genomes, Genetics 4, 341–347.
29. Panagiotu O.A. and Ioannidis P.A. (2012) "What should the genome-wide significance threshold be? Empirical replication of borderline genetic associations" International Journal of Epidemiology 41, 273–286.
30. Zaitlen N., Pasaniuc B., Sankararaman S., Bhatia G., Zhang J., Gusev A., Young T., Tandon A., Pollack S., Vilhjálmsson B.J., Assimes T.L., Berndt S.I., Blot W.J., Chanock S., Franceschini N., Goodman P.G., He J., Hennis A.J.M., Hsing A., Ingles S.A., Isaacs W., Kittles R.A., Klein E.A., Lange L.A., Nemesure B.N., Patterson N., Reich D., Rybicki B.A., Stanford J.L., Stevens V.L., Strom S.S., Whitsel E.A., Witte J.S., Xu J., Haiman C., Wilson J.G., Kooperberg C., Stram D., Reiner A.P., Tang H. and Price A.L. 2014. "Leveraging population admixture to characterize the heritability of complex traits" Nature Genetics 46, 1356–1362.
31. Catalano R.D., Critchley H.O., Heikinheimo O., Baird D.T., Hapangama D., Sherwin J.R.A., Charnock-Jones D.S., Smith S.K. and Sharkey A.M. (2007) "Mifepristone induced progesterone withdrawal reveals novel regulatory pathways in human endometrium" Molecular Human Reproduction 13, 641–654.

Pubblicazioni prodotte dalla scheda "Gemellarità" del progetto

Moioli B, Steri R, Marchitelli C, Catillo G, Buttazzoni L. (2017) - Genetic parameters and genome-wide associations of twinning rate in a local breed, the Maremmana cattle. *Animal.* Oct;11(10):1660-1666. doi: 10.1017/S1751731117000283 (IF = 1.921).

Cinzia Marchitelli, Bianca Moioli, Roberto Steri, Gennaro Catillo. (2017) - Twinning project: increasing of twin births in Maremmana breed. *Ital J Anim Sci vol.16:s1, pp 42.*

Alessandra Crisà, David Meo Zilio, Roberto Steri, Gennaro Catillo, Luca Buttazzoni. (2017) - Establishment of a crossbreed Simmental Holstein experimental herd and first assessment of heterosis effects on technical and biological parameters. *Ital J Anim Sci vol.16:s1, pp 150.*

Tesi di Laurea: "Gemellarità nei bovini di razza Maremmana: studio dell'influenza sul carattere di alcuni geni candidati"

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI E AMBIENTALI
UNITÀ DI RICERCA DI SCIENZE ZOOTECNICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE INTERDIPARTIMENTALE IN SCIENZE ZOOTECNICHE

Il coordinatore del progetto Gennaro Catillo

04/06/2018