

*Centro Interuniversitario di Ricerca e di
Consulenza sulla Genetica del Cane
Università di Pisa e Camerino*



Società Amatori Bracco Italiano

Autori:

dott.sa Francesca Cecchi

dott.sa Roberta Ciampolini

dott. Silvano Presciuttini

PROGRAMMA DI RICERCA

“GESTIONE GENETICA DEL BRACCO ITALIANO”

BOZZA DELLA RELAZIONE FINALE

1. INTRODUZIONE

- 1.1 VARIABILITA' GENETICA**
- 1.2 CONSANGUINEITA' E PARENTELA**
- 1.3 CARATTERI QUANTITATIVI**

2. L'ARCHIVIO ELETTRONICO ENCI DEL BRACCO ITALIANO

- 2.1 ACQUISIZIONE E CONSISTENZA DEL DATABASE BRACCO ITALIANO**
- 2.2 QUALITÀ DELL'INFORMAZIONE GENEALOGICA**

3. ANALISI DELLA VARIABILITA' GENETICA

- 3.1 CAMPIONAMENTO DEGLI ANIMALI E COSTITUZIONE DELL'ARCHIVIO GENOMICO**
 - 3.1.1 CAMPIONAMENTO**
 - 3.1.2 ARCHIVIO GENOMICO**
- 3.2 SCELTA DEI MARKERS GENOMICI**
- 3.3 CATEGORIZZAZIONE ALLELICA**
- 3.4 TIPIZZAZIONE GENETICA E STIMA DEI PARAMETRI POPOLAZIONISTICI**
- 3.5 CORRELAZIONE OMOZIGOSITA' – ININCROCIO**
- 3.6 ININCROCIO E PARENTELA NEL CAMPIONE**
- 3.7 CONDIVISIONE ALLELICA E PARENTELE BIOLOGICHE NEL CAMPIONE**
- 3.8 GIUDIZI DI BELLEZZA E BRAVURA VS/PROFILO GENOMICO**

4. ANALISI GENEALOGICA DEL DATABASE ELETTRONICO

- 4.1 INTERVALLO DI GENERAZIONE**
- 4.2 NUMEROSITA' EFFETTIVE**
- 4.3 FATTRICI E STALLONI**
- 4.4 ININCROCIO E PARENTELA**
 - 4.4.1 ININCROCIO PER GENERAZIONE**
 - 4.4.2 TREND DI F NEL CORSO DEGLI ANNI**

5. ANALISI BIOMETRICHE

5.1 CAMPIONAMENTO DEGLI ANIMALI PER LA VALUTAZIONE MORFOLOGICA

5.2 VARIABILITA' FENOTIPICA PER MISURAZIONI DIRETTE

5.3 USO DI SOFTWARE DEDICATO PER IL RILEVAMENTO DELLE MISURAZIONI

5.4 INDICE GENETICO PER L'ALTEZZA AL GARRESE

5.5 ANALISI MULTIVARIATA DELLA VARIABILITA' FENOTIPICA

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE PER LA GESTIONE DELLA RAZZA

7. PRODOTTI DELLA RICERCA

8. GLOSSARIO DEI TERMINI TECNICI

9. METODOLOGIE DI ANALISI

10. PUBBLICAZIONI INERENTI LA RICERCA

1. INTRODUZIONE

La gestione della Variabilità Genetica del Bracco Italiano è una sfida prioritaria che la SABI ha accolto con coraggio e determinazione. La Variabilità Genetica presente oggi all'interno della razza, costituisce un patrimonio originale ed al contempo prezioso, da conoscere a fondo per essere gestito, ed assolutamente da difendere, da preservare e da far evolvere per gli anni a venire. L'evoluzione della Variabilità Genetica all'interno della razza, l'andamento del livello medio della Consanguineità nelle ultime generazioni ed il monitoraggio di questo stesso per il futuro così come l'incidenza di alcune patologie a base genetica, sono aspetti fondamentali per una corretta gestione della razza. Tali obiettivi di studio riguardano sia le popolazioni a ridotto effettivo numerico che quelle aventi consistenze più importanti ma che possono ugualmente utilizzare in maniera intensiva un numero ristretto di stalloni. Lo studio della Variabilità Genetica intra-popolazione e tra popolazioni, permette di valutare sia l'originalità genetica di una razza che i legami genetici che possono intercorrere tra razze diverse ed appartenenti alla stessa specie *Canis Familiaris*.

Il Bracco italiano è una delle razze più antiche di cani utilizzati per la caccia fin dal tempo del Rinascimento ed è stata ufficialmente registrata dall'ENCI (Club Cinologico Italiano) nel 1949.

Il Bracco Italiano è una piccola popolazione, la cui gestione genetica necessita di accorgimenti particolari in quanto è concreto il rischio al suo interno, di una forte riduzione della variabilità genetica. Gli animali possono andare incontro agli effetti negativi conseguenti ad eccessivi livelli di consanguineità ed agli effetti importanti della deriva genetica, cioè della variazione casuale delle frequenze alleliche. In maniera particolare la perdita del polimorfismo genetico corrisponderebbe alla eccessiva fissazione in omozigosi di molti caratteri e questo da origine alla depressione da inbreeding ovvero alla perdita di vitalità e di fertilità degli animali.

La volontà di interrogarsi sullo stato di "salute genetica" della razza ha mosso il consiglio della SABI a commissionarci questa ricerca. Questo al fine di mettere sotto controllo genetico la razza e vedere se fattori quali: l'impiego abbastanza frequente di alcuni riproduttori maschi, insieme alla pratica degli accoppiamenti in consanguineità, effettuata come per molte altre razze riconosciute, è stata eseguita al fine fissare alcune caratteristiche fenotipiche, ed abbastanza diffusa anche in un recente passato, ed infine un effettivo numerico relativamente ridotto, con un conseguente numero non elevato di cuccioli registrati ogni anno (circa 700), non avessero contribuito a determinare un livello di consanguineità tale da causare drastici effetti sulla variabilità genetica della popolazione. Il consiglio della SABI ha deciso inoltre, di commissionare la presente ricerca per dare concretezza al miglioramento genetico della razza in quanto questo stesso costituisce di per se uno dei principali obiettivi prefissati dallo statuto stesso della SABI. Il miglioramento genetico della razza non poteva prescindere dalla conoscenza della variabilità genetica della razza, nell'ottica di apportare conoscenze e fornire agli allevatori strumenti utili e direttamente fruibili, per un concreto sostegno, fondato su basi scientifiche solide, al fine di guidare le loro scelte selettive ed al fine di produrre un Bracco Italiano geneticamente sano.

Tutti gli aspetti del progetto di ricerca sono stati discussi e concordati con la SABI in quanto nessuna finalità può essere perseguita senza l'accordo dell'associazione e senza la volontà degli allevatori.

Grazie all'utilizzo di concreti indicatori della variabilità genetica esistente all'interno della razza supportati mediante i risultati ottenuti da un approccio di studio di genetica molecolare si fornisce alla SABI un mezzo potentissimo, con il quale gestirà per il futuro le scelte selettive che si tradurranno in chiare e precise linee guida da proporre agli allevatori iscritti al Club di Razza. Nelle relazioni della SABI con gli altri Club e con l'ENCI stessa, costituirà una pietra miliare che aiuterà a comprendere quali relazioni esistano a livello interrazziale tra tutte quelle razze che si confronteranno in futuro con il Bracco Italiano, mediante il calcolo delle distanze genetiche si potrà stimare se ne esistano alcune più simili geneticamente al Bracco Italiano rispetto ad altre. A livello della razza stessa saremo in grado di

attribuire con efficacia l'identità genetica di razza di un singolo soggetto a partire da un qualsiasi campione biologico pelo, saliva, sperma, sangue (attribuzione dell'identità razziale) ed al contempo sarà ugualmente possibile determinare il livello di affidabilità di un test di paternità. Questi due punti potrebbero rivelarsi di un'importanza cruciale in materia di riconoscimento ufficiale dei riproduttori e di iscrizione di un individuo alla razza a titolo iniziale oppure in caso di provenienza estera del soggetto.

La presente monografia riassume i risultati del programma di ricerca svolto nell'ambito della convenzione fra la Società Amatori Bracco Italiano (S.A.B.I.) e il Centro Interuniversitario di Ricerca e di Consulenza sulla Genetica del Cane volto all'applicazione delle moderne tecniche scientifiche alla gestione genetica della razza Bracco Italiano. Il programma si basa su tre linee principali, caratterizzate rispettivamente da un approccio genetico-molecolare, da un approccio genealogico, e da un approccio biometrico:

- .1 Definizione dei parametri genetici della popolazione e analisi della variabilità genetica;
- .2 Stima dei valori di consanguineità e di parentela;
- .3 Stima dei parametri fenotipici e genetici dei caratteri quantitativi selezionati a livello di razza e degli indici fenotipici e genetici dei riproduttori.

La ricerca risponde a determinate domande che si pongono sia i singoli allevatori che i Club di razza, a partire dai dati di tipo genealogico e molecolare. In particolare, i risultati riguardanti la variabilità genetica indagata mediante metodiche di Genetica Molecolare in parte non sono altro che lo specchio della storia della razza Bracco Italiano nota a tutti. Nella discussione dei risultati, sia i dati ottenuti a partire dai dati anagrafici, sia quelli prodotti dalle analisi di Genetica molecolare effettuate sul Genoma dei Bracchi campionati, verranno analizzati e discussi in parallelo al fine di consigliare gli allevatori della SABI nelle loro scelte future.

1.1 VARIABILITA' GENETICA

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

In tal senso, gli strumenti forniti dalla biologia molecolare consentono di approfondire le conoscenze relative al livello di variabilità ed alla stratificazione genetica della popolazione allo studio. Negli ultimi anni è stato avviato un numero crescente di studi volti alla caratterizzazione molecolare delle principali razze canine. Le razze canine, infatti, sono state tradizionalmente classificate in base al loro ruolo nelle attività umane, in base a caratteri fenotipici e ad un insieme di informazioni di natura storico-evolutiva. Gli studi più recenti, realizzati mediante tecniche di indagine genomica, pur confermando, in generale, le relazioni filogenetiche tradizionalmente accettate, consentono, in alcuni casi, di evidenziare anche nuove inattese connessioni tra razze o gruppi di razze. In aggiunta, lo studio diretto del genoma consente di integrare le informazioni genealogiche relative alla struttura genetica presente in seno ad una popolazione. Questo permette di raggiungere elevati livelli di accuratezza nella stima dei principali parametri demo-genetici che, soprattutto per popolazioni a contenuto effettivo numerico, quali quelle oggetto del presente studio, costituiscono gli indicatori fondamentali per la verifica di una corretta gestione delle risorse disponibili. L'adozione di strategie ottimali di selezione rappresenta, infatti, un requisito fondamentale per il recupero, la salvaguardia e la valorizzazione delle popolazioni canine e con esse, dell'insieme di valori, storico-culturali ed ecologici associati alla loro attività di utilizzazione primaria.

Interrogarsi sulle cause che determinano la perdita della Variabilità Genetica costituisce il primo passo

per gestire responsabilmente il futuro di una razza. Quando una razza si avvia verso una condizione di ridotta variabilità genetica, il Club di Razza che la gestisce ha tutto l'interesse a cercare di capire quali siano le cause di questo stato di cose, ma ha anche il dovere di gestire coscientemente la razza di cui è responsabile per cercare di invertire la rotta, se questa porta verso una direzione sbagliata, e per cercare di trovare dei rimedi finché si è ancora in tempo. Le attuali conoscenze e la possibilità di indagare direttamente il genoma degli animali, al fine di evidenziare, sia il reale livello di variabilità genetica oggi esistente nella popolazione, sia la possibilità di monitorarne l'andamento negli anni a venire, costituiscono un mezzo potentissimo che ci fornisce la Genetica Molecolare per attuare concretamente un fattivo piano di salvaguardia della razza Bracco Italiano.

Nel mondo della cinofilia esistono situazioni in cui non si può più fare molto, come ad esempio nel caso di razze che un tempo erano specializzate per una determinata attività, che oggi non esiste quasi più, e che quindi hanno pochissime chances di riconversione. Questo è il caso del Berger de Crau, che accompagnava le greggi durante la transumanza. Questa razza esiste ancora, ma oggi le si preferiscono altre razze. Riguardo alle possibilità di una sua "riconversione" come razza da compagnia, sussistono poche speranze, in quanto mal si adatta alle nuove condizioni di vita che le si prospettano soprattutto riguardo agli ambienti ristretti, alle abitudini ed alle tempistiche serrate della vita che l'uomo conduce oggi nonché a causa della gestione comportamentale e del mantenimento della pulizia del pelo.

Per fortuna sappiamo esattamente che cosa si può e si deve fare per invertire questo stato di cose finché si è in tempo.

Un aspetto importante nella salvaguardia delle razze a ridotto effettivo numerico, è quello relativo alle modalità di gestione della riproduzione ai fini del mantenimento e dell'ampliamento della variabilità genetica.

L'esigenza di salvaguardia della variabilità genetica nasce:

- 1) dalla necessità di conservare forme alleliche utili e di scongiurare l'eccessiva fissazione in omozigosi di varianti alleliche che determinino il manifestarsi di patologie a base genetica. Le piccole popolazioni, infatti, sono maggiormente soggette alle fluttuazioni della deriva genetica, per azione delle quali alcune forme alleliche possono essere casualmente fissate nella popolazione ed altre possono, invece, andar perdute, con una complessiva riduzione della variazione genetica ed un aumentato rischio di mutational meltdown (accumulo di mutazioni deleterie, con conseguente riduzione della fitness ed ulteriore, conseguente, declino della numerosità della popolazione);
- 2) dalla necessità di preservare una variabilità utile nei confronti di possibili cambiamenti degli obiettivi selettivi;
- 3) dalla necessità di scongiurare un impoverimento di variabilità che si traduce anche in una riduzione della fertilità e della prolificità. Nelle piccole popolazioni, in aggiunta, aumenta infatti anche la probabilità che soggetti imparentati tra di loro si accoppino, originando individui consanguinei (caratterizzati da un aumento dei livelli di omozigosità e, maggiormente soggetti al fenomeno della depressione da inbreeding).
- 4) per motivazioni di ordine storico e culturale ed etico, in quanto la variabilità genetica non rappresenta esclusivamente un bene da difendere e da trasmettere a chi si troverà a gestirla per il futuro ma anche un bene in se e per se in quanto qualsiasi riduzione della variabilità genetica si rivela una pericolosa perdita sia per la razza canina allo studio che per l'intera specie ed infine per i responsabili della gestione genetica di una razza e per la biodiversità in generale.

Le azioni generali da intraprendere in un piano di conservazione genetica dovrebbero prevedere:

- 1) l'identificazione e caratterizzazione delle razze, evidenziandone peculiarità e potenzialità in termini di contributo al mantenimento della biodiversità, utilizzo attitudinale, rilevanza culturale ed ecologica;
- 2) il monitoraggio dei parametri demografici e la valutazione del rischio di estinzione (razze a rischio, reliquia...);

- 3) lo sviluppo di azioni che favoriscano, dove possibile, anche la valorizzazione economica della razza, quale strumento efficace di incentivazione alla salvaguardia (ad esempio, attraverso la valorizzazione del legame col territorio e con le tradizioni storico-culturali legate al suo allevamento che favoriscano nuovo impulso alla valorizzazione e diffusione della razza stessa);
- 4) l'adozione di strategie di conservazione del materiale genetico congelamento del seme e di ovuli;
- 5) lo sviluppo di azioni di sostegno per la sensibilizzazione e l'educazione alla conservazione della biodiversità, l'adozione di politiche e strumenti normativi appropriati, il coinvolgimento e la ricerca di sinergie tra tutte le parti in causa (privati, Club di razza, ENCI e mondo accademico...);
- 6) La caratterizzazione e la valutazione della variabilità delle indagini within-breed al fine di una corretta gestione e conservazione della variabilità genetica intra-razza. Da ciò dovrebbe risultare chiara l'importanza che il monitoraggio e la gestione dei parametri genetici e demografici di una popolazione rivestono in un piano di conservazione genetica.

Nella realtà odierna non si può più parlare di "fatalità" nel caso di una razza ad effettivo numerico ridotto, dal momento che gli studi di genetica molecolare ci indicano la reale riserva di variabilità genetica riscontrabile all'interno della popolazione, e dal momento in cui esistono dei concreti mezzi per poterla gestire ed ampliare con mirati piani di accoppiamento. Nel caso di una popolazione realmente a rischio di estinzione un'azione di prima emergenza consiste nel far accoppiare il maggior numero di riproduttori maschi possibile, in condizioni drastiche praticamente tutti i riproduttori esistenti escludendo per ovvi motivi coloro che risultassero portatori di tare. In questo stato di cose la selezione della razza passa in secondo piano e si è costretti ad accettare in qualità di riproduttori quei soggetti che, in condizioni normali, non sarebbero stati ammessi alla riproduzione.

In campo zootecnico, nel caso di specie da reddito, sono noti diversi esempi di popolazioni insulari che sono riuscite a raggiungere degli effettivi numerici importanti a partire da uno stock di poche decine di riproduttori maschi fondatori. Dal momento in cui l' effettivo numerico della razza da salvaguardare sarà sufficientemente reincrementato, risulterà nuovamente possibile ridurre progressivamente il numero di maschi riproduttori senza purtroppo poter pretendere di ritornare ad una situazione integralmente normale prima di un periodo di tempo relativamente lungo, e di poter quindi di nuovo riattuare degli schemi selettivi per obiettivi mirati.

Se la variabilità genetica dei soggetti ri-fondatori di una razza risulta ancora troppo ridotta, il successo dell'operazione di « salvataggio » della razza diventa oggettivamente problematico ed in quel caso il ricorso all'incrocio con una razza geneticamente vicina «reinsanguamento» diviene quasi inevitabile. Tale pratica estrema deve appunto essere effettuata con una razza geneticamente vicina e comunque in modo che il processo abbia alla fine un' ampiezza limitata in modo da ridurre il più possibile l' impatto della seconda razza sulla prima ed al fine di «diluire» il meno possibile i genotipi della popolazione che si intende salvaguardare. Questo processo viene definito come un «reinsanguamento a mezzo-sangue» limitato nel tempo ad una sola generazione; in questo modo si deve poter riuscire a re-introdurre sufficiente eterozigosità. Le banche del seme costituiscono un mezzo molto interessante per raggiungere l'obiettivo di salvaguardare una popolazione a rischio di estinzione. Quando si tratta di salvaguardare delle popolazioni si ha purtroppo la tendenza a considerare l'opportunità di stoccare seme ed ovuli come un estremo ricorso a biotecnologie estreme e lontane dal modo cinofilo. Le banche del seme invece, costituiscono un mezzo estremamente interessante a questo scopo e gli allevatori hanno al contrario tutto l' interesse ad anticiparne l'impiego ed a non arrivare ad aspettare la quasi scomparsa della loro razza per ricorrere allo stoccaggio di seme e di ovuli per conservare quanto rimane del patrimonio genetico da poter ancora salvare. Una tale operazione e modalità di salvataggio non potrà trovare facilmente un finanziamento da parte degli allevatori. La situazione che si prospetta in questo caso è quindi più difficile rispetto a quella di una razza ad effettivo numerico adeguato, congelare riserve di seme e di ovuli diventa comunque prioritario nell' interesse a lungo termine

comune a tutti gli allevatori di salvaguardare la razza. Per le razze aventi effettivi numerici ridotti non resta che un'azione concreta e fattiva da parte dell' E.N.C.I.

L'uso di marcatori genomici si è rivelato uno strumento estremamente utile in conservation genetics, consentendo, a partire direttamente dalle informazioni molecolari, la stima di parametri fondamentali quali la taglia effettiva di popolazione, l'individuazione della presenza di bottleneck e la determinazione del contributo dei fondatori (founder effect) nella storia della popolazione, la stima del livello di inbreeding degli individui, la presenza di flusso genico ed admixture con altre razze, la presenza di stratificazione genetica all'interno della popolazione ed ancora la stima di parametri per la valutazione della variabilità intra-razza quali gene diversity ed allelic diversity.

Prima dell'avvento delle moderne tecniche di indagine della genetica molecolare, molti dei parametri sopra elencati erano stimati a partire soltanto da analisi di pedigree. Oggi è auspicabile l'uso congiunto dei due approcci, considerando che l'apporto della informazione molecolare per la stima di tali parametri è tanto più significativo quanto meno ampie ed accurate sono le registrazioni genealogiche disponibili per le popolazioni in esame. Proprio a tal proposito, inoltre, l'uso di marcatori molecolari può fornire un prezioso supporto: il ricorso a genotipizzazioni individuali ed alla ricostruzione e/o alla conferma delle relazioni di parentela mediante test di paternità con marcatori STR consente, infatti, di ottenere la massima accuratezza ed affidabilità dalle informazioni di pedigree.

Le moderne tecniche di genetica possono fornire un utile strumento di indagine per l'individuazione di adeguate strategie nella corretta gestione del patrimonio genetico delle popolazioni canine.

In tal senso, gli strumenti forniti dalla biologia molecolare consentono di approfondire le conoscenze relative al livello di variabilità ed alla stratificazione genetica delle popolazioni.

Negli anni recenti è stato avviato un numero crescente di studi volti alla caratterizzazione molecolare delle principali razze canine.

Le razze canine, infatti, sono state tradizionalmente classificate in base al loro ruolo nelle attività umane, in base a caratteri fenotipici e ad un insieme di informazioni di natura storico-evolutiva. Lo studio diretto del genoma consente di integrare le informazioni genealogiche relative alla struttura genetica presente in seno ad una popolazione; ciò permette di raggiungere elevati livelli di accuratezza nella stima dei principali parametri demo-genetici che, soprattutto per popolazioni a contenuto effettivo numerico, quali quella oggetto del presente studio, costituiscono gli indicatori fondamentali per la verifica di una corretta gestione delle risorse disponibili.

Lo studio del polimorfismo genetico a livello del DNA genomico mediante l'impiego di un set di marcatori microsatelliti permette di valutare il polimorfismo di una parte sufficientemente ampia e rappresentativa dell'intero genoma e di studiare la variabilità genetica fornendo la stima del livello di eterozigoti e della consanguineità.

1.2 ININCROCIO E PARENTELA

L'inincrocio risulta dall'accoppiamento di animali parenti. Maggiore è il grado di parentela dei due genitori e maggiore sarà l'inbreeding presentato da un loro figlio.

L'inincrocio è espresso da un coefficiente che può assumere qualunque valore compreso tra zero (nessuna consanguineità) ed uno (massima consanguineità teoricamente possibile con l'autoriproduzione e quindi in campo vegetale).

Il coefficiente di inincrocio di un soggetto (F_X), che è uguale alla kinship dei genitori o alla metà del coefficiente di parentela additiva tra i suoi genitori, indica la percentuale media di loci omozigoti per discendenza. In altre parole, esso esprime la frazione media del patrimonio genetico che un individuo riceve, identico, sia dal padre che dalla madre in virtù del fatto che i genitori erano tra loro imparentati.

Il calcolo del coefficiente di inincrocio degli individui (F_X) è molto utile e deve essere condotto e monitorato in un allevamento, onde evitare gli effetti deleteri che sorgono in seguito ad un uso

eccessivo della consanguineità.

Gli effetti deleteri della consanguineità sono noti universalmente e riassumibili brevemente in tre punti fondamentali:

1) Geni recessivi rari e indesiderati che in condizioni normali sono allo stato eterozigote e che quindi non disturbano eccessivamente, hanno una maggiore probabilità di esprimersi allo stato omozigote con la comparsa di patologie ereditarie (soprattutto scheletriche, oculari e cardiovascolari).

Il data base aggiornato su patologie a base ereditaria si trova sul seguente sito: <http://www.angis.org.au/Databases/BIRX/omia/>;

2) L'inbreeding riduce la variabilità genetica entro la popolazione che quindi risulta meno suscettibile al miglioramento genetico.

E' chiaro che se tutti gli individui di una popolazione sono geneticamente uguali tra loro, nessuna scelta sensata potrà essere operata con fini selettivi;

3) Produce un fenomeno chiamato "Depressione da inbreeding": si tratta di una generale diminuzione delle performance medie dei soggetti consanguinei per caratteri produttivi ma soprattutto per i caratteri riproduttivi (nati vivi, tasso di concepimento, fertilità), con evidenti ripercussioni negative sull'allevamento.

Il coefficiente di consanguineità si accumula se gli accoppiamenti tra parenti vengono ripetuti nelle generazioni. Ad esempio, accoppiando un maschio e una femmina figli dello stesso cane e di madri diverse (mezzi fratelli di padre) il coefficiente di consanguineità dei loro figli sarà 0,125. Se ripetiamo nuovamente un tale accoppiamento, il coefficiente di consanguineità raggiungerà il valore di 0,219 alla seconda generazione, di 0,305 alla terza, di 0,381 alla quarta, di 0,449 alla quinta e così via.

Normalmente l'allevatore cerca di evitare di accoppiare tra loro parenti di primo o secondo grado (parenti stretti), ma non dobbiamo dimenticarci del cosiddetto "Back-ground Inbreeding" ovvero della consanguineità che si accumula di generazione in generazione. Sarebbe quindi necessario monitorare almeno 4-5 generazioni antecedenti proprio per evitare di raggiungere un livello critico di consanguineità. C'è da precisare però che la consanguineità di un soggetto non si trasferisce alla progenie se questo viene accoppiato ad un soggetto non parente: se due soggetti consanguinei ma non parenti vengono accoppiati la loro progenie avrà consanguineità zero.

Su quale sia il coefficiente di consanguineità ritenuto pericoloso, ovvero oltre il quale sarebbe bene non andare, ci sono pareri contrastanti. In linea generale dobbiamo ricordarci che nessun coefficiente di consanguineità è esente dalla depressione da inbreeding, ovvero, gli effetti deleteri sono proporzionali a tale coefficiente, e valori superiori a 0,100 devono essere tenuti sotto controllo.

E' bene pertanto che gli allevatori, quando decidono gli accoppiamenti in purezza per produrre la propria rimonta, controllino la parentela esistente tra il maschio e la femmina destinati all'accoppiamento per una razionale gestione dell'allevamento.

Gli obiettivi principali di questa parte della ricerca sono stati quelli di stimare i valori di consanguineità (F) di ogni singolo soggetto e di parentela tra i soggetti per la valutazione del grado di variabilità genetica esistente, utilizzando il database completo dell'ENCI, e conseguentemente consegnare un mezzo agli allevatori per la definizione di accoppiamenti programmati volti al controllo della consanguineità. Inoltre, come applicazione dello studio dei valori di parentele, sono stati individuati i riproduttori aventi maggior peso genetico nella razza.

1.3 CARATTERI QUANTITATIVI

La terza parte del programma ha avuto l'obiettivo di caratterizzare morfologicamente il Bracco Italiano e confrontare i dati raccolti con le informazioni riportate nello standard di razza. A partire dai dati raccolti per le misure biometriche e di quelli del libro genealogico, è stato quindi possibile stimare il valore genetico dei soggetti analizzati per il parametro "Altezza al garrese", costruendo un appropriato Indice di selezione.

Non essendo stato possibile calcolare l'ereditabilità dei parametri morfologici in quanto il numero degli animali misurati non è stato sufficiente per una sua stima appropriata ed accurata [si dovrebbero considerare circa 400 mezzi-fratelli (20 figli ognuno di 20 genitori), o un numero di coppie di genitore-figlio non inferiore a 300] , è stata considerato un valore di ereditabilità dell'altezza al garrese riportato in letteratura sulla specie canina ($h^2 = 0,60$).

L'ereditabilità di un carattere è un parametro genetico ben preciso e stimabile, con valori compresi tra 0 ed 1. Questo coefficiente ha due utilizzazioni principali nel miglioramento genetico. Serve a stimare il valore genetico additivo (A) dei genitori e a predire, in funzione della strategia di miglioramento scelta, il progresso genetico atteso nella popolazione o incremento genetico (ΔG).

L'indice genetico è una stima del vero valore genetico di un animale per un determinato carattere. La misura tal quale di un carattere dipende infatti da una componente genetica, trasmissibile alla discendenza, e da una componente ambientale, che non può essere trasmessa e che può essere modificata nel tempo. Tra i fattori ambientali si ricordi per esempio l'effetto dell'alimentazione, della gestione aziendale che dipendono soltanto dall'abilità dell'allevatore e non da una capacità intrinseca e trasmissibile dell'animale.

Il calcolo di indici genetici ha l'obiettivo di separare la componente genetica da quella ambientale in modo da fornire una classifica dei migliori animali in base al loro valore genetico.

Uno degli obiettivi di selezione di interesse per la SABI è quello di ottenere un "animale ideale" che ha caratteristiche morfologiche "medie". Ogni allevatore potrà quindi fare determinati accoppiamenti per raggiungere, nella progenie, quei dati biometrici desiderati. Ad esempio un allevatore che ha un soggetto femminile basso al garrese, potrà consultare gli indici dei soggetti maschili disponibili per l'accoppiamento in modo da selezionare quello che trasmette un'altezza al garrese al di sopra della media.

2 L'ARCHIVIO ELETTRONICO ENCI DEL BRACCO ITALIANO

2.1 ACQUISIZIONE E CONSISTENZA DEL DATABASE BRACCO ITALIANO

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

Come atto preliminare necessario per lo svolgimento della ricerca è stato quindi richiesto all'ENCI, per tramite del consiglio direttivo della SABI, di fornire le informazioni genealogiche disponibili sulla razza Bracco Italiano tramite una apposita interrogazione dell'archivio elettronico. Il database risultante, trasmesso al Centro Universitario il 24/10/2007 per l'analisi genealogica, riportava le seguenti informazioni disponibili per ciascun animale registrato:

Codice identificativo ENCI del cane
Nome del cane
Codice razza (202_A, 202_B o 202)
Sesso
Data di nascita
Data di registrazione
Data di iscrizione
Codice ENCI della fattrice
Nome della fattrice
Codice ENCI dello stallone
Nome dello stallone
Descrizione del mantello del cane
Codice ENCI del proprietario
Indirizzo del proprietario

Il database consiste di 20.499 cani nati fra il 30 luglio 1970 e il 5 aprile 2007, e registrati fra il 23 novembre 1989 e il 10 ottobre 2007. Escludendo gli anni 1970-1975, per i quali sono stati registrati soltanto 211 cani e il 2007 per il quale i dati sono parziali (Fig. 1), la media di iscritti all'ENCI per anno è risultata pari a 646,4 cani (il valore più basso è stato registrato nel 1983 con 411 iscritti ed il più alto 2002 con 836 iscritti) con una deviazione standard di 106,9.

L'andamento delle iscrizioni annuali all'ENCI è crescente (figura 1); siamo infatti passati da 5.503 iscritti (media pari a 550,3) degli anni '80 a 7.015 soggetti iscritti complessivi (media pari a 701,5) negli anni '90. La media degli iscritti riferiti agli anni 2000-2007 è risultata superiore rispetto ai periodi precedenti con il valore medio di 737,4.

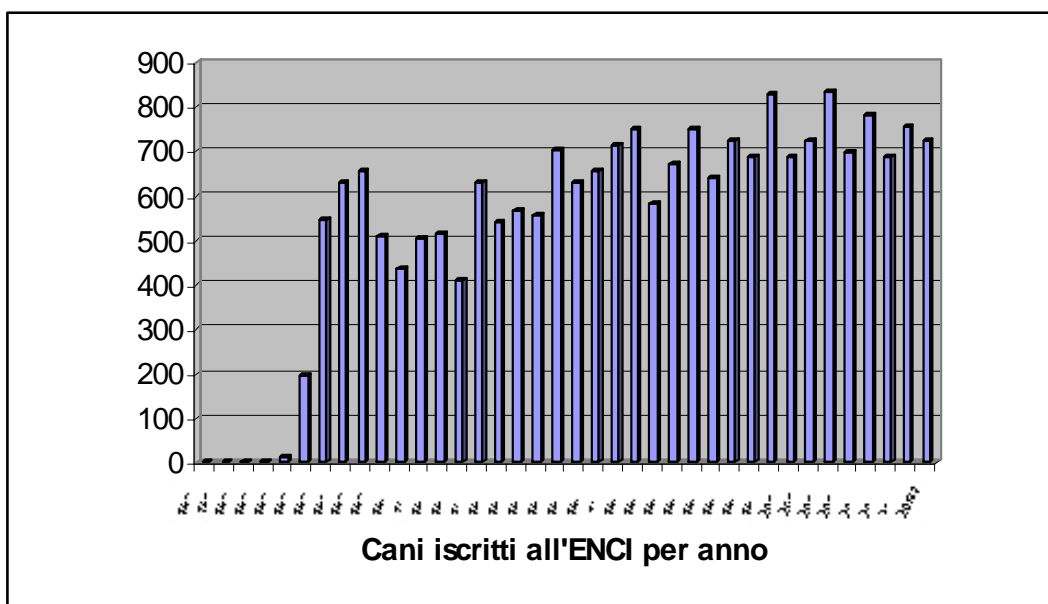


Figura 1 – Numero di iscritti all'ENCI per anno di nascita.

Confrontando il Bracco Italiano con le altre razze appartenenti allo stesso gruppo FCI, la consistenza negli ultimi anni del Bracco Italiano è comparabile soltanto a quella dello Spinone Italiano e al Setter Irlandese Rosso (dati riportati sul sito dell'ENCI: <http://www.enci.it/libroorigini/statistiche.php>).

2.2 QUALITÀ DELL'INFORMAZIONE GENEALOGICA

Il numero totale di animali presenti nel database (compresi i 20.499 records e stalloni e fattrici senza indicazione dei genitori) include 21.062 animali (10365 femmine e 10134 maschi). Pertanto i soggetti fondatori, dei quali non sono noti i genitori, sono 563 (2,7%); a questi vanno aggiunti i soggetti che mancano dell'indicazione di uno dei genitori, portando quindi il numero dei fondatori assoluti (f_t : animali con uno o entrambi i genitori sconosciuti) a 621 (2,9%); questa bassa percentuale indica la buona conoscenza della struttura genetica della razza. Il numero medio di generazioni tracciate in modo completo è risultato 6, mentre il numero massimo di generazioni, riscontrate in 49 soggetti, è stato pari a 14.

L'informazione utile per l'analisi genealogica è riassunta nella figura 2. Per intervalli di nascita di 5 anni (tranne l'ultimo periodo) viene mostrata la proporzione del numero degli antenati noti per ciascuna generazione di antenati. Si può notare ad esempio che per gli ultimi nati (2005-2007) l'informazione è praticamente completa fino alla quinta generazione e che alla settima generazione sono ancora noti il 70% degli antenati (che sono in totale 128 per ciascun individuo a questo livello). Via via che si risale indietro nel tempo, l'informazione sugli antenati necessariamente diminuisce.

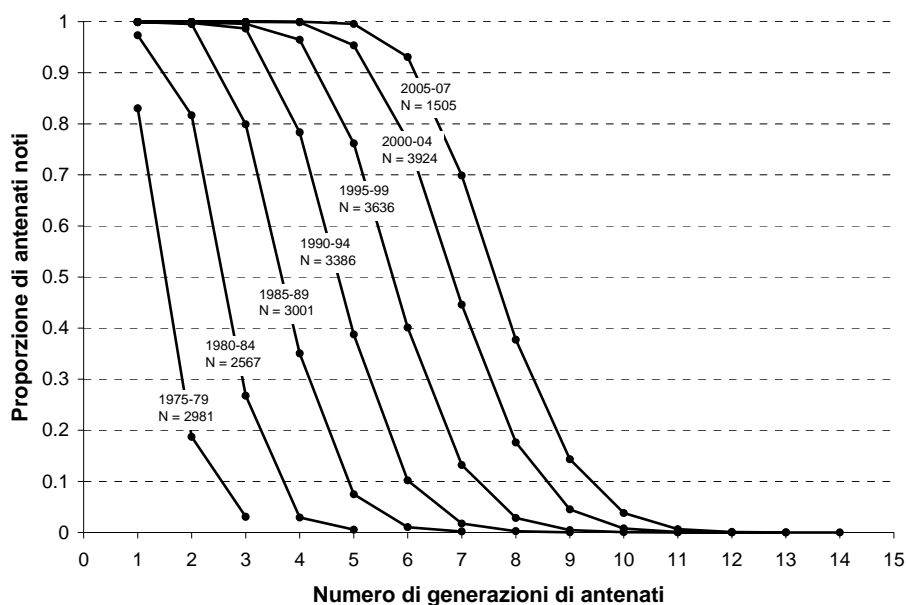


Figura 2- Profondità dell'informazione genealogica del Bracco Italiano per quinquennio di nascita.

La qualità dell'informazione genealogica si può anche stimare con il calcolo della media del numero di generazioni complete equivalenti, che è definito come la somma, su tutte le generazioni degli antenati, della proporzione degli antenati noti a ciascuna generazione; un altro indice rilevante è il numero totale medio di antenati noti (Tabella 1).

Anno	N° nati	N° generazioni complete equivalenti	N° medio di antenati noti
1975	249	0.8	1.6
1976	688	0.8	1.6
1977	735	0.9	2.1
1978	744	1.1	2.7
1979	565	1.3	3.7
1980	474	1.6	4.9
1981	523	1.9	6.4
1982	521	2.1	7.4
1983	417	2.3	9.3
1984	632	2.6	11.6
1985	542	2.8	14.4
1986	570	3.0	17.1
1987	559	3.2	20.5
1988	700	3.4	23.7
1989	630	3.7	30.2
1990	657	3.8	32.7
1991	717	4.1	40.8
1992	751	4.3	48.0
1993	588	4.5	58.4
1994	673	4.7	62.2
1995	751	4.9	79.0
1996	645	5.0	88.7
1997	723	5.4	110.1
1998	688	5.5	123.6
1999	829	5.6	132.4
2000	687	5.9	170.9
2001	723	6.2	208.8
2002	836	6.3	227.0
2003	897	6.6	285.0
2004	781	6.9	335.7
2005	690	7.0	369.1
2006	759	7.2	448.0
2007	56	7.4	497.8
Media	636.4	4.2	106.9

Tabella 1 - Numero totale medio di antenati noti per anno di nascita.

3. ANALISI DELLA VARIABILITA' GENETICA

3.1 CAMPIONAMENTO DEGLI ANIMALI E COSTITUZIONE DELL' ARCHIVIO GENOMICO

3.1.1 CAMPIONAMENTO

Il campionamento del materiale biologico si è basato sul prelievo di sangue periferico al fine di estrarre, a partire dai Leucociti, il DNA Genomico, materiale alla base delle analisi di Genetica Molecolare oggetto della ricerca. Come matrice di partenza si è preferito il sangue, perché materiale facile da poter prelevare ed inoltre perché la quantità di DNA che si estrae da questo tessuto è notevole insieme ad una qualità ed una purezza ottime e necessarie per lo stoccaggio e la conservazione del campione. Il DNA Genomico estratto con questi criteri, può essere conservato ed utilizzato anche per obiettivi futuri di ricerca per i prossimi anni a venire.

L'organizzazione logistica della campagna dei campionamenti è stata impostata con l'obiettivo di ottenere il maggior numero di campioni utili alla ricerca nel minor tempo possibile e conseguentemente, con l'imperativo di razionalizzare il flusso dei campioni che pervenivano in laboratorio, ed al contempo, di razionalizzare le i prelievi. Tutto questo rispettando le tempistiche necessarie all' avvio ed allo svolgimento della ricerca che era impostata su 2 anni solari.

Tenendo conto di quanto suddetto, la campagna dei campionamenti è stata fatta coincidere con i più importanti raduni nazionali organizzati dalla SABI in occasione delle prove di caccia ed in esposizioni di bellezza. Il campionamento ha preso avvio in occasione del raduno tenutosi a Caldes nel Giugno del 2007 e del Trofeo Bello e Bravo tenutosi a Terni nel Luglio del 2007. Sempre nel Luglio del 2007 e nei primi mesi del 2008 sono stati prelevati altri campioni sia in occasione di altri raduni, Albinia Febbraio 2008, Coltano Marzo 2008, sia presso singoli allevamenti rappresentativi della Razza Bracco Italiano per un totale di 150 DNA estratti e stoccati presso il Laboratorio di Biotecnologie Genetiche dell' Università di Pisa.

A questo punto si è trattato di selezionare tra i 150 campioni collezionati almeno 70 soggetti non imparentati tra di loro, che fossero rappresentativi, per caratteristiche fenotipiche e di attitudine venatoria, nonché per provenienza geografica, dell' intera Razza Bracco Italiano. A tale scopo, a partire dalle informazioni raccolte dai dati anagrafici forniti in formato digitalizzato da parte dell'ENCI, è stato individuato il campione dei soggetti non parenti che rispondeva ai criteri sopra elencati necessari per lo studio della Variabilità Genetica con metodiche di Genetica Molecolare. Sono stati selezionati 77 cani in base ad un programma che ha saggiato tutti i soggetti presenti nel database di razza determinando il loro coefficiente di parentela per tutte le possibili coppie di animali.

Per l'analisi della variabilità genetica presente nella popolazione attuale del Bracco Italiano sono stati esclusi i parenti di primo grado presenti nell'archivio del DNA (esclusi: Tuta di Cascina Croce, Querida Polcevera's, Albinia Althaea dei Sanchi, Gim di Cascina croce, Budapest dell'Oltrepò).

Il campione finale utilizzato per l'analisi della variabilità genetica comprendeva quindi 72 soggetti.

Il file completo di 77 soggetti (compreso quindi i parenti di primo grado) è stato invece impiegato per confrontare i dati molecolari con quelli anagrafici.

3.1.2 ARCHIVIO GENOMICO

I 150 campioni di DNA stoccati e conservati presso il Laboratorio di Biotecnologie Genetiche dell'Università di Pisa, vanno a costituire una banca di DNA fondamentale per la creazione di un Archivio Genomico della razza Bracco Italiano. L' Archivio Genomico non solo concretizza e fissa un'immagine reale e conservabile per il futuro della popolazione campionata ed attualmente esistente, ma può e deve essere costantemente arricchito ed ampliato con l'aggiunta di nuovi campioni negli anni a venire. In questo modo si potranno, non solo collezionare i DNA di soggetti non imparentati tra di

loro che ci aiuteranno a monitorare nel tempo l'andamento della variabilità Genetica all'interno della popolazione, ma potranno essere collezionati i DNA di intere famiglie, al fine di poter seguire la trasmissione di patologie a base genetica qualora si verificassero in maniera più evidente all'interno di un allevamento o fossero trasmesse e diffuse nella popolazione da uno stallone molto utilizzato o da una fattrice. Inoltre potrà essere seguita, attraverso le varie generazioni, la trasmissione di caratteristiche fenotipiche, attitudinali/venatorie, che la SABI intende ottenere mediante il raggiungimento degli obiettivi selettivi. Attualmente il risultato della selezione per le caratteristiche suddette si può solo riscontrare attraverso la valutazione del fenotipo e delle prove attitudinali dei nuovi cani, confrontando i punteggi e le valutazioni ottenute per le stesse caratteristiche possedute dai loro genitori ed antenati, e seguendo dati anagrafici alla mano, le genealogie dei soggetti che più si avvicinano a quanto richiesto dalla selezione. Come risultato della selezione, le attuali razze da caccia, presentano mirate e sviluppate caratteristiche per le quali vengono allevate quali: attitudine venatoria, traccia, punta, ferma, riporto, ed acquaticità. Fino ad un anno fa era impensabile indagare la base genetica, della venaticità in generale, e più in dettaglio, attitudine alla punta, oppure l'eccitabilità e l'intraprendenza nell'affrontare la preda, nonché l'addestrabilità. Oggi grazie alle informazioni fornite dalla mappa genomica del cane, per le suddette caratteristiche vengono indicate addirittura precise regioni cromosomiche e geni candidati quali probabili obiettivi di studio. I risultati della stessa ricerca hanno evidenziato una chiara correlazione inversa esistente tra il peso corporeo e la longevità del cane e localizzano su precisi cromosomi, una serie di QTL che si dimostrano essere coinvolti in maniera statisticamente significativa, sia nella correlazione inversa esistente tra la taglia e la longevità, sia nella capacità di influenzare o solo la longevità o solo la taglia corporea. Per studiare proprio nel Bracco Italiano la base genetica di queste stesse caratteristiche, in un imminente futuro sarà fondamentale poter attingere ai campioni collezionati e conservati nell'Archivio Genomico grazie alla ricerca finanziata dalla SABI.

Un Archivio genomico che non ha solo funzione di memoria storica ma che assume un valore fondamentale se viene aggiornato con il passare delle generazioni in maniera continua e costante, dal quale poter attingere informazioni genetiche preziose a partire dal DNA di Bracchi che tra qualche anno non esisteranno più. La SABI in questo modo potrà realmente seguire e guidare con mezzi potenti e concreti l'andamento ed il raggiungimento degli obiettivi selettivi che si propone di raggiungere.

3.2 SCELTA MARKERS GENOMICI

Lo studio del polimorfismo genetico che è alla base della stima della Variabilità Genetica svolta mediante metodiche di Genetica Molecolare, è stato effettuato a livello di DNA Genomico, utilizzando marcatori genomici Short Tandem Repeats (STR), definiti anche come Microsatelliti. L'impiego di un set di marcatori permette di valutare il polimorfismo di una parte sufficientemente ampia e rappresentativa dell'intero genoma e di studiare la Variabilità Genetica intra e tra popolazione, fornendo la stima del livello di eterozigosi, della consanguineità e delle distanze genetiche tra popolazioni. Nella scelta del panel di marcatori, sono stati selezionati 21 Microsatelliti per la caratterizzazione genetica del Bracco Italiano e per l'analisi della Variabilità Genetica. Tali Marcatori microsatelliti, distribuiti su 15 cromosomi diversi compreso il cromosoma X, (Tabella 2) sono stati scelti a partire da un panel di marcatori proposti dalla Commissione ISAG/FAO per la "Measurement of Domestic Animal Diversity (2004). Per tali marcatori sono state valutate *in silico* delle reazioni di amplificazione mediante l'organizzazione di *Multiplex* PCR che vengono riportate nella loro organizzazione operativa sempre in tabella 2.

Marcatori Microsatelliti Utilizzati per la ricerca Bracco Italiano

CFA	Size range	Locus	Dye	Forward Sequence	Reverse Sequence
		Panel 1 2005	Dye		
CFA13	68-118	AHT121	FAM	TAT TgC gAA TgT CAC TgC TT	ATA gAT ACA CTC TCT CTC Cg
CFA21	87-111	INRA21	PET	ATg TAg TTg AgA TTT CTC CTA Cgg	TAA Tgg CTg ATT TAT TTg gTg g
CFA06	215-239	AHTb171	VIC	Agg TgC AgA gCA CTC ACT CA	CCC ATC CAC AgT TCA gCT TT
CFA23	277-297	AHTk253	FAM	ACA TTT gTg ggC ATT ggg gCT g	TgC ACA Tgg Agg ACA AgC ACg C
CFA22	109-133	CXX279	NED	TgC TCA ATg AAA TAA gCC Agg	ggC gAC CTT CAT TCT CTg AC
		FH2001	FAM	TCC TCC TCT TCT TTC CAT Tgg	TgA ACA gAg TTA Agg ATA gAC ACg
CFA12	135-179	FH2054	NED	gCC TTA TTC ATT gCA gTT Agg g	ATg CTg AgT TTT gAA CTT TCC C
CFA26	83-101	AHTk211	VIC	TTAgCAgCCgAgAAATACgC	ATT CgC CCg ACT TTg gCA
		FH2328	VIC	ACC Agg TAg TTT TCA gAA ATg C	AgT TAT ggg ACT TgA ggC Tg
CFA18	224-242	REN54P11	FAM	gggggAATTAACAAAgCCTgAg	TgCAAATTCtAgCCCCACTg
		Panel 2 2005	Dye		
CFA11	231-249	REN105L03	FAM	ggAATCAAAAgtggCTCTCT	gAgATTgCTgCCCTTTTACC
CFA12	143-157	INU030	FAM	ggCTCCATgCTCAAgTCTgT	CATTgAAAgggAATgCTggT
CFA10	204-220	INU055	FAM	CCAgtgCgTCCCTATCCATCT	gCACCACTTTgggCTCCTTC
CFA29	154-170	REN169O18	NED	CACCCAACTTgTCTgTTCCCT	ACTgTgTgAgCCAATCCCTT
CFAX	182-217	Amelogenin	NED	gTg CCA gCT CAg CAg CCC gTg gT	TCg gAg gCA gAg gTg gCT gTg gC
		LEI004	NED	CATCATgCATCAAgCAgAgC	TCATgTAAgCAgAgACTgAC
CFA14	199-221	REN169D01	PET	AgTgggTTgCAAgTggAAC	AATAgCACATCTTCCCCACg
CFA16	236-254	AHTb260	PET	CgCTATACCCACACCAggAC	CCACAgAggAAgggATgC
CFA15	268-282	REN247M23	VIC	TggTAACACCAAggCTTTCC	TgTCTTTTCCATggTggTgA
CFA02	228-244	FH2848	VIC	CAAAACCAACCCATTCACTC	gTCACAAggACTTTTCTCCTg
CFA11	126-156	AHT137	VIC	TAC AgA gCT CTT AAC Tgg gTC C	CCT TgC AAA gTg TCA TTg CT
		Panel 3 2005	Dye		
CFAD7	192-212	REN162C04	PET	TTCCCTTTgCTTTAgTAggTTTTg	TggCTgTATTCTTTggCACA
CFA33	104-136	INU005	FAM	CTTTCTACCAgCAAggTTAC	TTCCCATTTAATTgCCTCT
CFA36	111-141	AHTH130	NED	gTTTCTCTCCCTTCgggTTC	gACgTgTgTTCACgCCAgt
CFA34	139-155	REN64E19	PET	TgTATTTAATgTgqCAgTTT	gACAAggACAgtCAATACAgt

Tabella 2 – Marcatori microsatelliti utilizzati per la ricerca sul Bracco Italiano.

Buona parte dei marcatori STR utilizzati in questa ricerca vanno a costituire il panel dei Microsatelliti che sono impiegati in un *Ring Test International Comparison Test*, indetto con cadenza biennale dall'International Society for Animal Genetics I.S.A.G. a cui partecipano i più importanti laboratori iscritti alla Società stessa, tra cui il Laboratorio di Biotecnologie Genetiche dell' Università di Pisa. Il nostro laboratorio ha partecipato con successo all' **International Comparison Test** 2006 e 2008. Nella ricerca sul Bracco italiano, abbiamo ritenuto opportuno utilizzare i marcatori dell' **International Comparison Test**, per 2 motivi molto importanti:

1. per ciascun Bracco Italiano analizzato, potevamo allineare e confrontare il profilo allelico ottenuto con ciascun marcatore testato, con quello di ciascuno dei 20 cani appartenenti alle 11 razze più un meticcio, analizzato da tutti i più importanti laboratori di Genetica animale a livello mondiale che hanno partecipato all' **International Comparison Test**. I 20 cani di cui sopra appartenevano alle seguenti razze: Labrador, German Shepherd, Schnauzer, Newfoundland, Alaskan Malamute, Golden Retriever, Montagne des Pirenées, Dogue Bordeaux, Rottweiler, Grosser Schweizer Sennenhund, Epagneul Breton,
2. per ciascun Bracco italiano Analizzato, potevamo effettuare la categorizzazione del risultato finale e rendere il profilo genomico di ciascun Bracco Italiano in qualsiasi momento direttamente confrontabile con quello dei 20 cani oggetto dell' **International Comparison Test**.

3.3 CATEGORIZZAZIONE ALLELICA

Un capitolo a parte merita questa importantissima fase dell'analisi. Infatti, per poter calcolare le frequenze alleliche all'interno di una popolazione e fra popolazioni è necessaria una nomenclatura uniforme dei marcatori STR utilizzati.

Tale uniformità è ancor più necessaria qualora vengano considerati dati provenienti da diversi laboratori e/o da strumentazioni diverse per l'analisi dello stesso panel di microsatelliti: a tal fine i dati che emergono da entrambi gli ISAG Comparison Test 2006 e 2008, possono essere utilizzati allo scopo di categorizzare e standardizzare i vari alleli di ciascun marcatore.

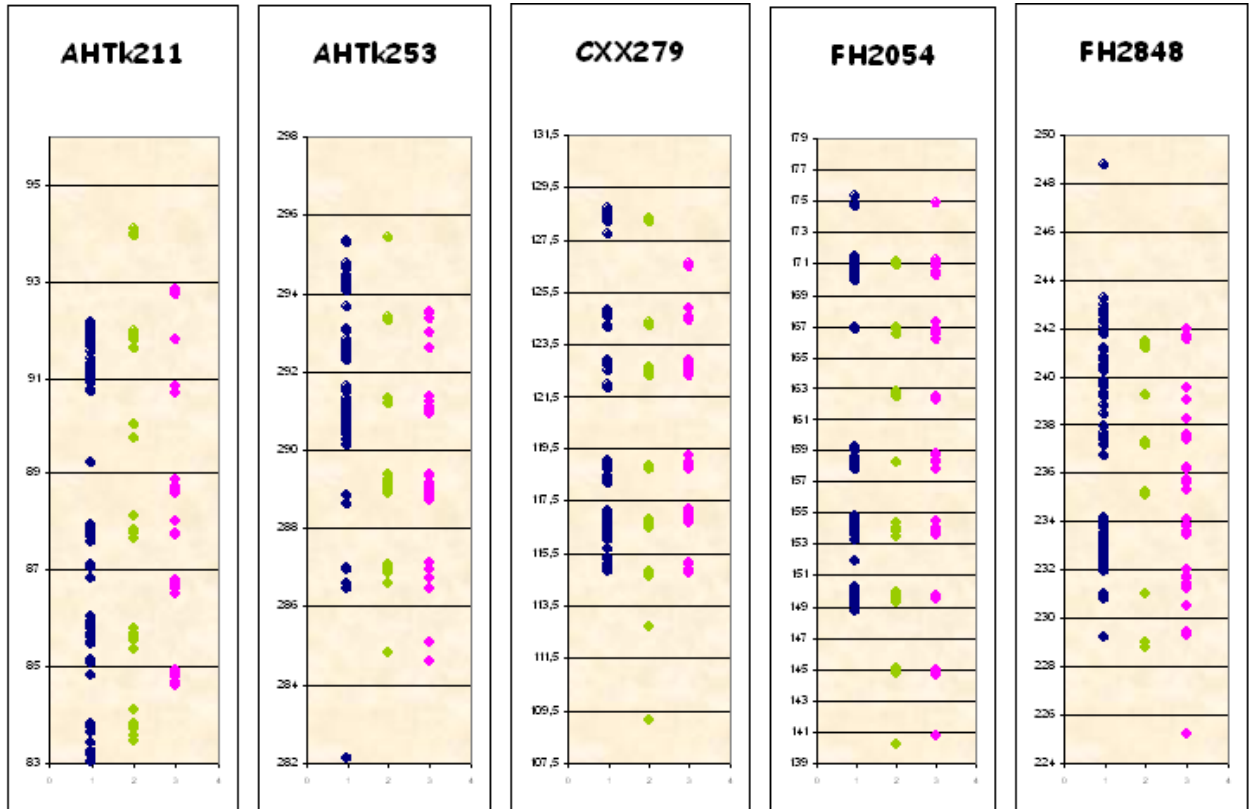
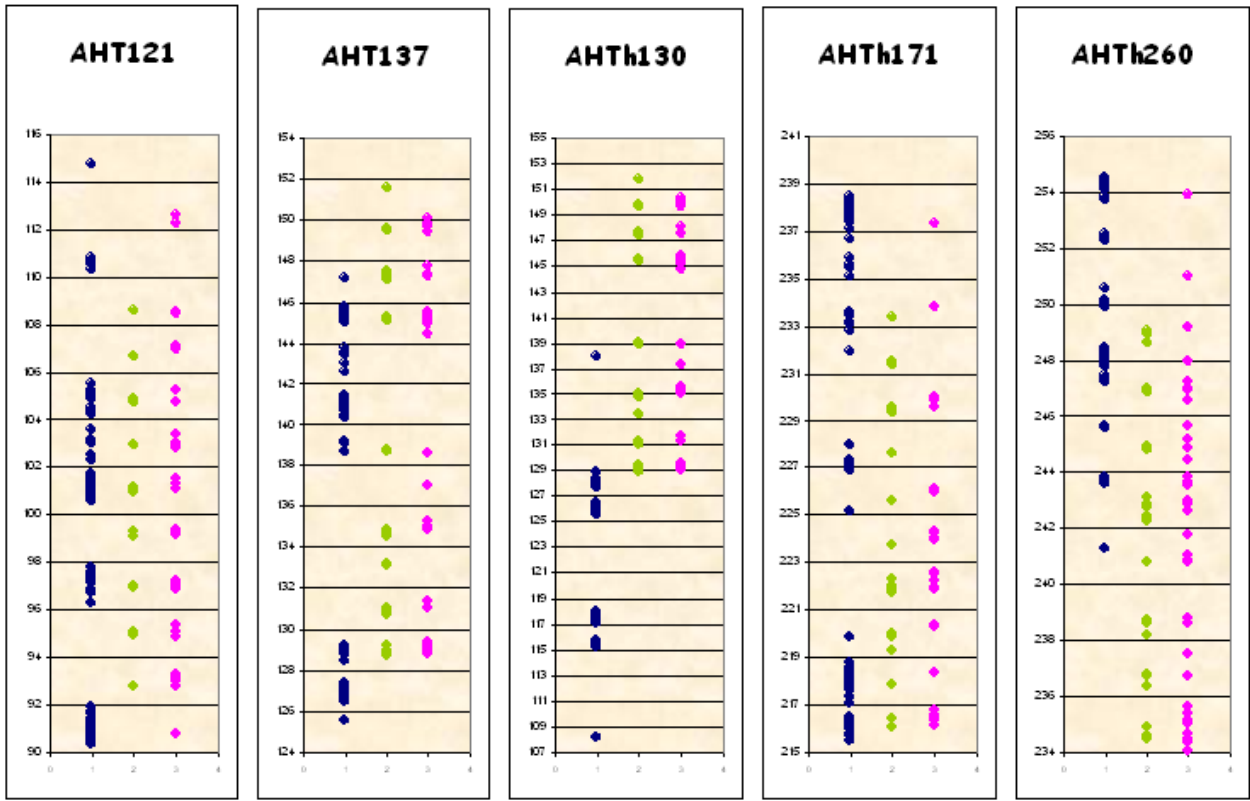
La prima fase di questa elaborazione consiste nell'analizzare ogni singolo marcatore per ciascun soggetto studiato: si procede al calcolo dei valori massimi e minimi di taglia allelica osservati per ciascun marcatore ed al confronto con il valore di *range* allelico noti da letteratura. La seconda fase della categorizzazione consiste nella codifica degli alleli di ogni singolo marcatore. Tale codifica consiste nella costruzione di un grafico a partire dai dati ottenuti e nella suddivisione successiva dei vari alleli presenti. Nel grafico vengono quindi inseriti i dati provenienti dal Comparison Test, ovvero i campioni che sono stati analizzati in contemporanea da tutti i laboratori Internazionali e Nazionali che hanno partecipato e superato l'esame biennale a cui la International Society of Animal Genetics ISAG sottopone i laboratori di genetica Molecolare che sono iscritti ed accreditati dalla Società stessa. I dati relativi ai campioni dell' Interational Comparison Test, vengono inseriti all' interno di ogni corsa elettroforetica contestualmente ai campioni del Bracco Italiano, al fine di poter successivamente valutare la presenza di eventuali fenomeni di slittamento (*shift*) nei valori di taglia allelica per uno stesso frammento tra corse elettroforetiche diverse. Tale "slittamento" dei dati è comunque prevedibile e presente, quindi da tenere costantemente in considerazione, in quanto le analisi dell'International Comparison Test vengono effettuate da laboratori diversi, sparsi nel Mondo e con attrezzature diverse ed in condizioni climatiche diverse. Questi fattori hanno un peso notevole sul "risultato grezzo" fornito dall' analizzatore di Sequenze, in quanto è un'attrezzatura sensibilissima alle condizioni ambientali e climatiche.

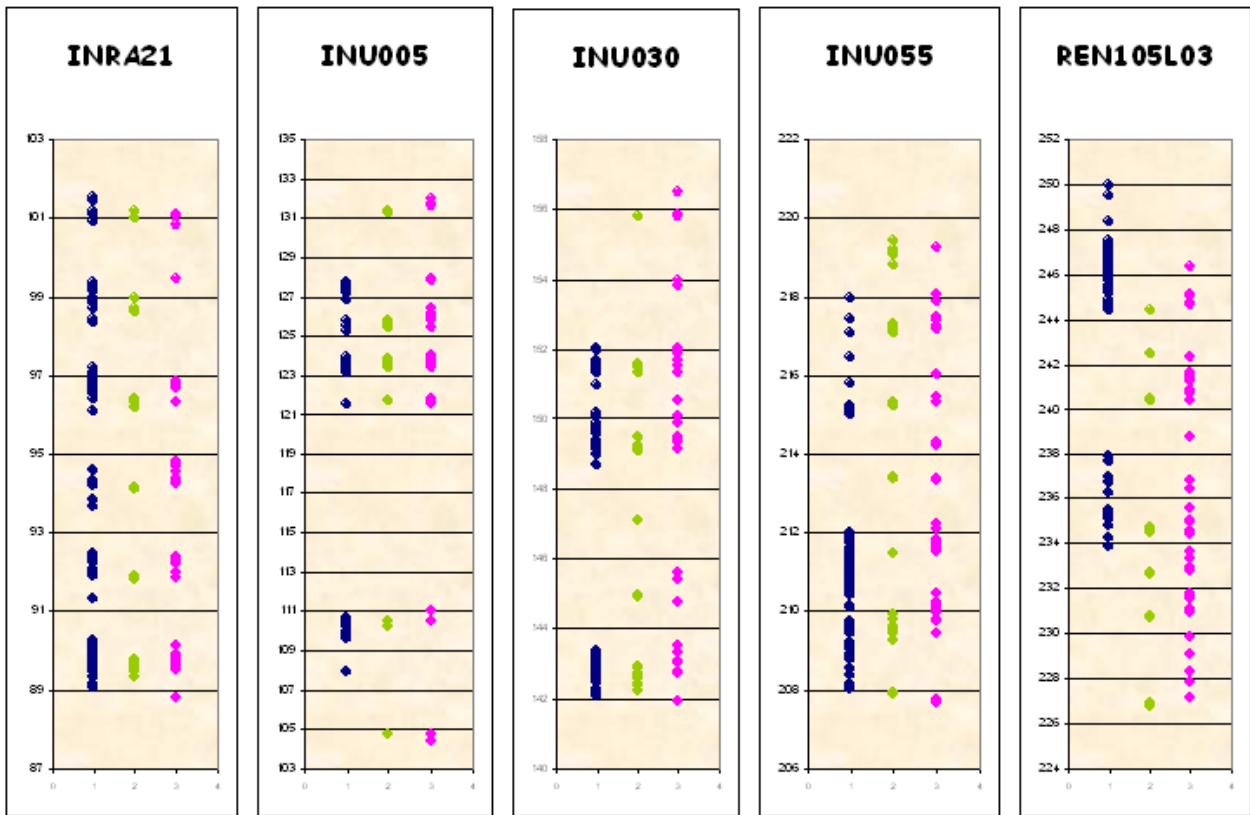
La terza fase di questa procedura di categorizzazione ha previsto il calcolo dello slittamento (*shift*) in termini di taglia allelica, dei dati di ciascun campione analizzato nell'International Comparison Test dai singoli laboratori rispetto allo stesso campione analizzato dal Laboratorio di Biotecnologie Genetiche dell' Università di Pisa. Sulla base di tale slittamento, considerato come "*fattore di allineamento*", sono stati "corretti" tutti i dati ottenuti dai campioni allo studio..

In seguito all'applicazione dei fattori di correzione a tutti i loci analizzati, si è passati alla quarta fase della categorizzazione che prevede per ciascun allele di ciascun campione la relativa categoria di appartenenza, ovvero la vera e propria attribuzione allelica; in tal modo è possibile ottenere una nomenclatura allelica univoca e coerente. Tale nomenclatura è stata ottenuta operando dei tagli che potessero comprendere tutti i campioni all'interno dello stesso allele, ed ha tenuto conto principalmente dei campioni analizzati nell' International Comparison Test, in quanto unici campioni ad essere stati analizzati in contemporanea dai diversi laboratori a livello internazionale per i marcatori genomici Microsatelliti del cane.

La quinta fase consiste nella sostituzione del dato molecolare grezzo relativo a ciascun campione analizzato dall' Analizzatore di sequenze in laboratorio, con gli alleli definiti e rinominati attraverso l'accurato procedimento di Categorizzazione allelica, al fine di poter utilizzare il dato allelico direttamente nei software di analisi statistica specifici per lo studio della Variabilità Genetica.

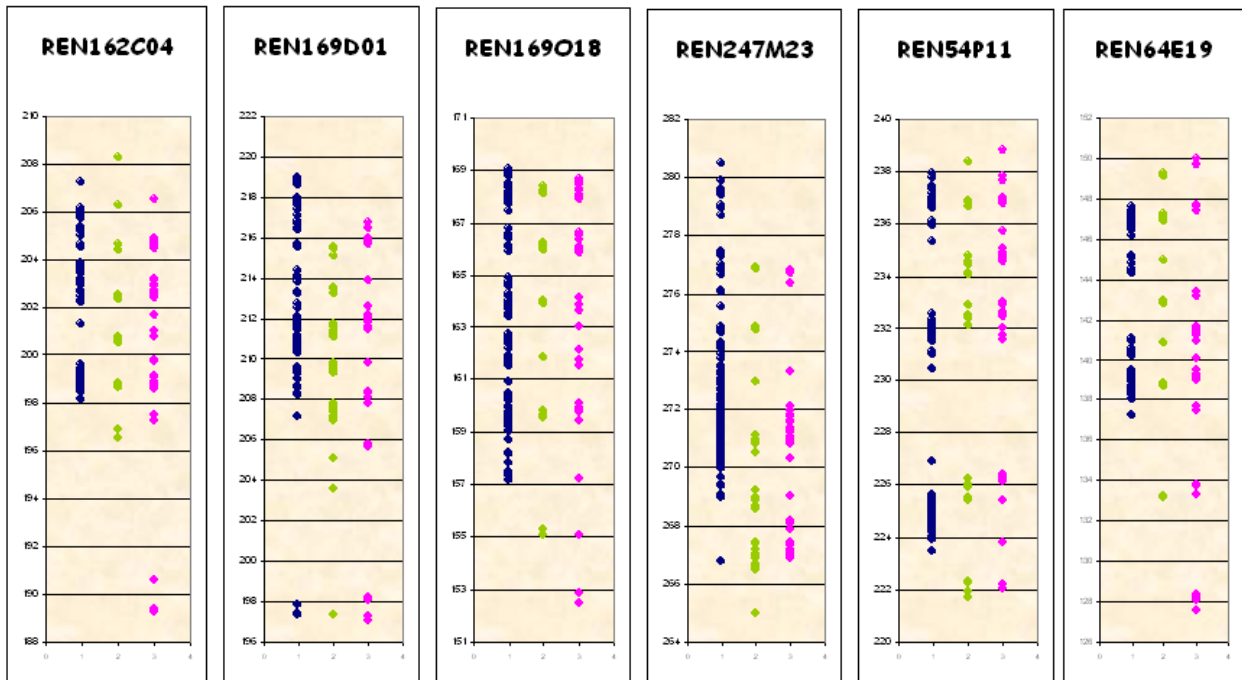
Un esempio di grafico e di taglio allelico viene riportato di seguito:





La categorizzazione degli alleli è stata basata su un'analisi dei dati grezzi generati dal sequenziatore ABI Prism 310 e dei dati relativi agli International Comparison Test utilizzati come ancora. I dati grezzi sono stati infatti riprodotti graficamente per visualizzare e l'allineamento degli alleli nelle diverse corse elettroforetiche. La taglia allelica in paia di basi (pb) è stata determinata utilizzando come riferimento i dati degli International Comparison Test.

I grafici visualizzano l'allineamento degli alleli attraverso le diverse corse. In colore blu gli alleli del Bracco, in rosa gli alleli degli International Comparison Test 2006 e in verde del 2008.



Ogni corsia comprende tutti i dati grezzi ottenuti dall'analizzatore di sequenze per un intero campione di animali. Questi grafici consentono di apprezzare la variabilità che esiste sia all'interno della razza analizzata Bracco Italiano, che tra gli alleli per ciascun campione, così come la variabilità che esiste tra esperimenti effettuati in tempi diversi.

3.1 TIPIZZAZIONE GENETICA E STIMA DEI PARAMETRI POPOLAZIONISTICI

L'analisi del polimorfismo di marcatori genomici STR offre un potente strumento per l'indagine diretta del livello di variabilità genetica esistente nell'ambito di una popolazione animale.

Tra i parametri utilizzati per la stima della diversità genetica si annovera, tra gli altri, il numero di alleli per locus (N_a). Molteplici sono le cause che possono determinare riduzione del numero di alleli di un marcatore STR (marcatore neutrale). Tra queste, la selezione può agire in maniera indiretta, per effetto di "trascinamento selettivo", allorché un marcatore neutrale STR risulta associato ad un gene di interesse. In tali casi, tuttavia, la riduzione del numero di alleli è solitamente circoscritta ad uno o pochi marcatori tra tutti quelli che costituiscono il panel analizzato.

Fluttuazioni nel numero di alleli per locus possono essere imputabili anche al fenomeno della deriva genetica; in tal caso, le ripercussioni saranno tanto più gravi quanto minore è la dimensione della popolazione. In piccole popolazioni, infatti, il rischio che alcuni alleli possano andare perduti per deriva risulta sensibilmente più elevato rispetto a popolazioni di dimensioni maggiori. In aggiunta, soggetti che appartengono a piccole popolazioni presentano spesso elevati livelli di imparentamento, condividendo per discendenza una ampia porzione del loro patrimonio genetico.

Ciò contribuisce all'osservazione di un ridotto numero di alleli a carico di tutti i loci analizzati, quale indicatore di una ridotta variabilità genetica della popolazione.

Nel caso specifico la popolazione analizzata è composta da 72 soggetti (5 soggetti sono stati esclusi dall'analisi di variabilità in quanto avevano un grado di parentela elevato con altri soggetti del campione esaminato, ma sono stati utili per l'analisi della condivisione all'elica per fare il confronto con il coefficiente di Kinship).

Dall'analisi molecolare dei 21 marcatori si evidenzia che il numero medio di alleli per locus risulta piuttosto basso (media 6,43), con un *range* che oscilla tra un minimo di 3 (locus INU030) ad un massimo di 9 alleli (locus AHTh171) rispetto a quanto osservato negli altri cani del Comparison test (6 e 13 come range e 9,33 come media; tabella 3).

Gli unici loci per i quali si osserva uno stesso numero di alleli nelle due popolazioni sono l'AHTk253 (6 alleli) e il locus FH2848 (8 alleli).

Soltanto i loci INRA21 ed il REN54P11 hanno un numero di alleli superiore nel Bracco Italiano rispetto a quanto osservato negli "Altri Cani" (7 alleli vs. 6).

Questa ridotta variabilità genetica è comprensibile se comparata ad un campione costituito da cani di diverse razze, sebbene una differenza di 2,90 alleli come valore medio per locus sia certamente un valore elevato.

Questi risultati potrebbero essere ascrivibili essenzialmente alla presenza di fenomeni di inbreeding.

Analogamente al parametro N_a , anche l'eterozigosità osservata (ed il confronto di quest'ultima con l'eterozigosità attesa in condizioni di equilibrio di Hardy-Weinberg) fornisce utili indicazioni circa le caratteristiche di variabilità genetica delle popolazioni in esame, risultando, ad esempio, ridotta in presenza di suddivisione di popolazione (cosiddetto "effetto di Wahlund") e inbreeding.

L'eterozigosità attesa, considerando locus per locus, varia tra 0,444 a 0,807 (media 0,639) nei "Bracchi", comparata con i valori 0,511-0,891 (media 0,808) negli "Altri cani" (tabella 4) mentre l'eterozigosità osservata varia tra 0,364 a 0,792 (media 0,594) nei "Bracchi", rispetto ai valori 0,442-0,791 (media 0,617) negli "Altri cani" confermando ancora una volta una bassa variabilità genetica nei "Bracchi". Interessante notare come la differenza tra l'eterozigosità attesa e quella osservata sia più bassa nei "Bracchi" rispetto e quanto osservato negli "Altri cani" ($0,639 - 0,594 = 0,046$ vs. $0,808 - 0,617 = 0,191$).

L'analisi dell'equilibrio di Hardy-Weinberg conferma quanto sopra delineato, in quanto soltanto 6

marcatori mostrano valori di disequilibrio altamente significativi (AHTH130, AHTH260, CXX279, REN105L03, REN162C04 ed il REN54P11).

Numero Alleli e Media Allelica			
Locus 21 μ sat	BRACCO ITALIANO	Cani del	
		Comparison Test	Differenza
AHT121	7	11	-4
AHT137	8	10	-2
AHTH130	6	11	-5
AHTh171	9	11	-2
AHTH260	7	10	-3
AHTk211	5	6	-1
AHTK253	6	6	0
CXX279	6	9	-3
FH2054	8	9	-1
FH2848	8	8	0
INRA21	7	6	1
INU005	6	9	-3
INU030	3	8	-5
INU055	5	7	-2
REN105L03	5	10	-5
REN162C04	5	9	-4
REN169018	6	13	-7
REN169D01	8	13	-5
REN247M23	8	12	-4
REN54P11	7	6	1
REN64E19	5	12	-7
Media	6,43	9,33	-2,90
min	3	6	
max	9	13	

Tabella 3 – Numero alleli per locus nel Bracco Italiano e nei cani del Comparison Test.

HW ed eccesso e difetto di eterozigosi					
Locus 21 μ sat	BRACCO ITALIANO			Cani del Comparison Test	
	H _{obs}	H _{exp}	P.	H _{obs}	H _{exp}
AHT121	0,649	0,719	0,1976	0,605	0,891
AHT137	0,740	0,643	0,2735	0,698	0,862
AHTH130	0,597	0,668	0,0328	0,605	0,841
AHTH171	0,675	0,743	0,1334	0,791	0,855
AHTH260	0,364	0,444	0,0000	0,674	0,840
AHTk211	0,597	0,528	0,8161	0,636	0,511
AHTK253	0,481	0,574	0,2441	0,488	0,674
CXX279	0,597	0,665	0,0079	0,744	0,805
FH2054	0,714	0,740	0,1123	0,791	0,853
FH2848	0,597	0,601	0,7146	0,535	0,844
INRA21	0,792	0,768	0,3594	0,605	0,760
INU005	0,571	0,642	0,0850	0,465	0,752
INU030	0,506	0,532	0,8662	0,605	0,770
INU055	0,442	0,472	0,6756	0,721	0,813
REN105L03	0,338	0,560	0,0000	0,628	0,832
REN162C04	0,675	0,665	0,0094	0,512	0,778
REN169018	0,727	0,807	0,2039	0,651	0,849
REN169D01	0,675	0,708	0,1129	0,651	0,868
REN247M23	0,675	0,686	0,1677	0,442	0,831
REN54P11	0,532	0,664	0,0000	0,581	0,857
REN64E19	0,519	0,597	0,0725	0,535	0,881
Media	0,594	0,639		0,617	0,808

Tabella 4 – Eterozigosità attesa ed osservata nel Bracco Italiano e nei cani del Comparison Test.

3.5 CORRELAZIONE OMOZIGOSITA' – ININCROCIO

I livelli dell'inincrocio calcolato dalle genealogie dovrebbe corrispondere ai livelli di omozigosità calcolato dai marcatori genetici, a meno della variabilità stocastica dovuta al campionamento di un numero necessariamente limitato dei marcatori stessi. Tuttavia ci si attende di riscontrare una certa correlazione fra i due valori. La figura seguente (figura 3) mostra la dispersione dei valori ottenuti per i 77 cani tipizzati. La retta di regressione è $f(x) = 0,68x + 0,38$, e risulta significativamente diversa da zero al livello di 0,05.

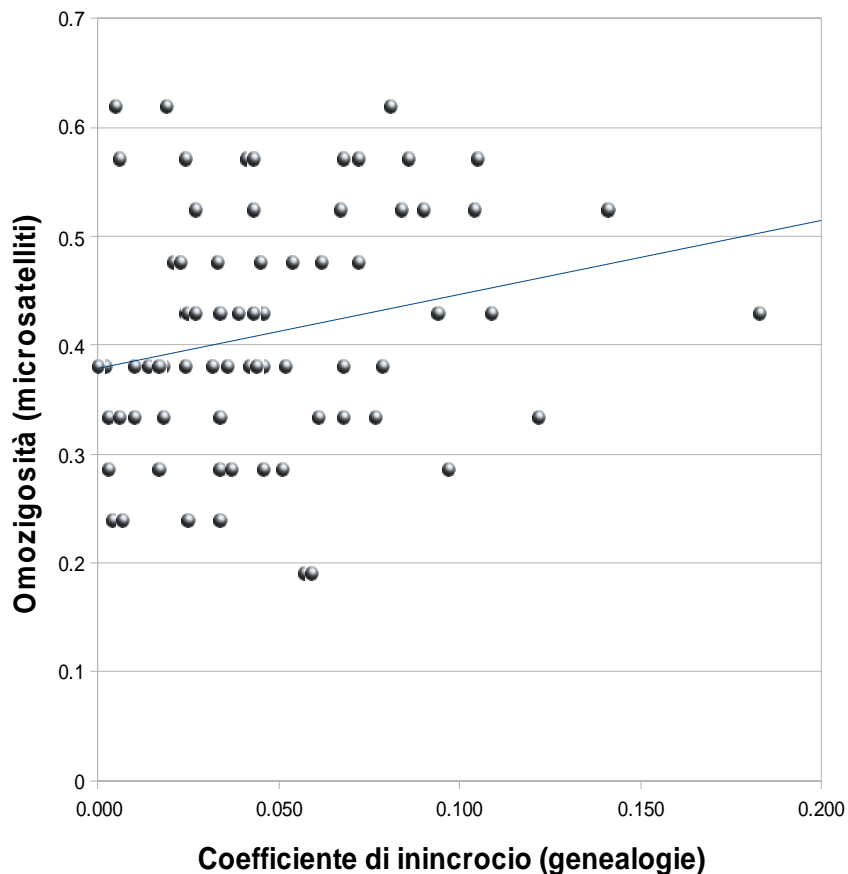


Figura 3 - Correlazione fra il coefficiente di inincrocio calcolato dalla genealogia e l'indice di omozigosità calcolato dai microsatelliti

Si notano tuttavia alcuni dati fuori scala (outliers) particolarmente nella regione di bassi valori di inbreeding e alti valori di omozigosità. Se si eliminano dall'analisi questi quattro dati la retta di regressione diventa $f(x) = 1,0 x + 0,35$, testimoniando quindi una linearità quasi perfetta fra le due misure statistiche. Si può concludere che il livello di omozigosità misurato dai 21 microsatelliti tipizzati fornisce una stima di massima del livello di inincrocio degli animali derivante dall'imparentamento dei genitori.

3.6 ININCROCIO E PARENTELA NEL CAMPIONE

La parentela media ed il coefficiente di inincrocio medio dei 77 soggetti su cui stata effettuata l'analisi molecolare, è di 0,078 e 0,0463 rispettivamente. Quest'ultimo valore è risultato più basso rispetto ai valori medi dei soggetti nati a partire dal 1995 (tabella 24). Interessante notare che soltanto 1 soggetto non è risultato inincrociato. Nella tabella 5 è riportata la distribuzione dei coefficienti di inincrocio (F) per i 77 soggetti consanguinei:

	n°
0,00 < F < 0,02	18
0,02 < F < 0,05	30
0,05 < F < 0,10	22
0,10 < F < 0,15	5
0,15 < F < 0,20	1

Tabella 5 – Distribuzione del coefficiente di consanguineità nella popolazione analizzata.

Come possiamo rilevare, 18 soggetti hanno un coefficiente di inincrocio inferiore a 0,02, e quindi accettabile, mentre 6 soggetti hanno un coefficiente di inincrocio compreso tra 0,10 e 0,20.

L'analisi dei dati molecolari effettuata con il programma Molkin ha invece fornito i risultati riportati in tabella 6.

I parametri "Self molecular coancestry", "Inbreeding" e "Molecular coancestry medio" risultano elevati ed il valore della "Distanza media di Kinship" risulta alquanto basso.

Il totale di queste osservazioni fornisce una evidenza alquanto chiara della ridotta variabilità genetica presente all'interno della popolazione considerata; ciò è anche supportato dall'elevato valore di similarità genetica ottenuto nel campione analizzato (0,455; Tabella 7). Tale parametro esprime la proporzione di alleli comuni tra due individui in relazione al numero massimo possibile (pari a due volte il numero di loci esaminati).

N°	77
Self molecular coancestry (s_i)	0,703
Inbreeding	0,406
Molecular coancestry medio dell'intera popolazione (f_{ij})	0,337
Distanza media di Kinship (D_k)	0,336

Tabella 6 – Coefficiente di Inbreeding, molecular coancestry e distanza di Kinship nella popolazione esaminata.

	Genetic similarities within breed		
	Average values	DevSt	Range
BRACCO ITALIANO n. 72 sogg	0,455	0,018	0,21 - 0,71

Tabella 7 – Similarità genetica della popolazione esaminata.

3.7 CONDIVISIONE ALLELICA E PARENTELE BIOLOGICHE NEL CAMPIONE

In totale risultano tipizzati con marcatori genetici 77 individui. Dall'analisi delle genealogie questo insieme di soggetti include due coppie di fratelli pieni e tre coppie genitore-figlio, oltre ad alcune coppie o terne di mezzi fratelli.

È stato calcolato il coefficiente di kinship per tutte le coppie possibili di questi soggetti (N = 2926), utilizzando l'intera genealogia. La tabella 7 mostra le 34 coppie con coefficiente > 0,15, ordinate in senso decrescente. Si può notare che le 5 coppie di parenti di primo grado hanno i valori più alti del coefficiente, che risulta in effetti maggiore di 0,25 (questo è il valore teorico per parenti di primo grado nel caso che non vi sia ulteriore parentela dovuta ad antenati remoti), con una punta massima di 0,295 per una coppia di fratelli pieni. Molte delle altre coppie incluse nella tabella sono costituite da fratellastri (coefficiente di kinship teorico 0,125); si può notare tuttavia che anche molte coppie che non condividono nessuno dei due genitori (parentela codificata come “non nota” in tabella 8) raggiungono un valore elevato del coefficiente.

<u>Nome Cane</u>	<u>Loi</u>	<u>Nome Cane</u>	<u>Loi</u>	<u>Parentela</u>	<u>Kinship</u>
vienna dell'oltrepò	1LO0516237	budapest dell'oltrepò	1LO0516242	Fratelli pieni	0.295
althaea dei sanchi	1LO0042631	asta dei sanchi	1LO9877653	Madre-figlia	0.288
gim di cascina croce	LO06131278	grisu' di cascina croce	LO06131279	Fratelli pieni	0.283
tuta di cascina croce	11LO037811	argine dell'oltrepò	LO99155957	Padre-figlia	0.271
fessa dell'oltrepo'	1LO0370025	querida polcevera's	1LO0734227	Madre-figlia	0.265
gionni trebisonda	11LO071755	ambra trebisonda	LO05118349	Non nota	0.194
toni trebisonda	1LO0668341	giorgia trebisonda	1LO0776177	Fratellastri	0.193
peppa del boscaccio	1LO0333331	toro dell'oltrepò	1LO0778634	Fratellastri	0.191
gionni trebisonda	11LO071755	giorgia trebisonda	1LO0776177	Non nota	0.185
frate	1LO0634264	quasimodo di casamassima	LO03104705	Fratellastri	0.185
astore di cascina croce	1LO0733891	gim di cascina croce	LO06131278	Fratellastri	0.183
astore di cascina croce	1LO0733891	grisu' di cascina croce	LO06131279	Fratellastri	0.183
pauso dei bricchi	1LO0290126	astore di cascina croce	1LO0733891	Non nota	0.182
imperatore del cigliolo	11LO008735	dali del cigliolo	1LO0376726	Non nota	0.173
malga della croccia	1LO0277740	lory	LO01168513	Fratellastri	0.170
dali del cigliolo	1LO0376726	lodula	1LO9884691	Fratellastri	0.170
medea	LO05127013	argine dell'oltrepò	LO99155957	Non nota	0.169
arco dei sanchi	1LO0654028	calisto	1LO0778869	Fratellastri	0.168
victor dell'angelo del summan	1LO0622041	tito	LO99170214	Non nota	0.165
peppa del boscaccio	1LO0333331	lodula	1LO9884691	Non nota	0.164
peppa del boscaccio	1LO0333331	polcevera's bernarda	LO03105559	Fratellastri	0.164
toro dell'oltrepò	1LO0778634	polcevera's bernarda	LO03105559	Fratellastri	0.163
timba	11LO061759	polcevera's conte	1LO0397937	Fratellastri	0.161
fedra di cascina croce	1LO0510460	gim di cascina croce	LO06131278	Non nota	0.160
fedra di cascina croce	1LO0510460	grisu' di cascina croce	LO06131279	Non nota	0.160
lodula	1LO9884691	polcevera's althea	LO02152720	Non nota	0.158
imperatore del cigliolo	11LO008735	orso della croccia	LO02125337	Non nota	0.158
arco dei sanchi	1LO0654028	achille	1LO0681969	Fratellastri	0.157
pauso dei bricchi	1LO0290126	gim di cascina croce	LO06131278	Non nota	0.154

pauso dei bricchi	1LO0290126	grisu' di cascina croce	LO06131279	Non nota	0.154
africa	1LO0235798	brunilde	LO01186893	Fratellastri	0.153
achille	1LO0681969	calisto	1LO0778869	Fratellastri	0.152
malga della croccia	1LO0277740	sharonstone della croccia	1LO0373117	Fratellastri	0.151
taramàt	1LO0420941	gina di montericco	1LO0719428	Non nota	0.150

Tabella 8 – Condivisione allelica per coppie di animali testati.

Il livello di imparentamento biologico fra coppie di individui può anche essere stimato dal livello della condivisione di alleli per loci genetici. L'indagine di paternità basata sul DNA è una tipica applicazione di questo approccio. Nel caso di coppie genitore-figlio, almeno un allele deve essere condiviso a ciascun locus; è però possibile che siano condivisi ambedue gli alleli, se per caso il figlio ha ricevuto dall'altro genitore lo stesso allele presente nel primo genitore. Pertanto l'indice di condivisione allelica, definito come numero di alleli condivisi diviso per il numero totale di alleli tipizzati, non può essere < 0,5 per coppie genitore figlio, e può essere anche considerevolmente maggiore di 0,5 se la variabilità genetica dei loci considerati è bassa o se i due genitori sono imparentati. Lo stesso valore di 0,5 contraddistingue le coppie di fratelli pieni; in questo caso tuttavia si tratta di un valore atteso, in quanto due fratelli possono condividere teoricamente zero alleli ($z = 0$, con probabilità 25%) 1 allele ($z = 1$, con probabilità 50%) e 2 alleli ($z = 2$, con probabilità 25%). Anche nel caso dei fratelli l'indice di condivisione allelica può essere maggiore di 0,5 se la variabilità genetica del locus è bassa o se i genitori sono imparentati fra loro. La figura 4 mostra il grafico della correlazione fra l'indice di kinship calcolato dalla genealogia e l'indice di condivisione allelica calcolato sui 21 loci tipizzati per le 20 coppie di individui, 5 di primo grado e 15 di secondo grado, presenti nella tabella 8. Si può notare che le cinque coppie dichiarate come parenti di primo grado (tre coppie genitore-figlio e due coppie di fratelli pieni) sono caratterizzate da indici di condivisione allelica mediamente vicini a 0,65, mentre l'indice di condivisione dei parenti dichiarati di secondo grado è molto variabile, essendo incluso fra circa 0,38 e 0,67.

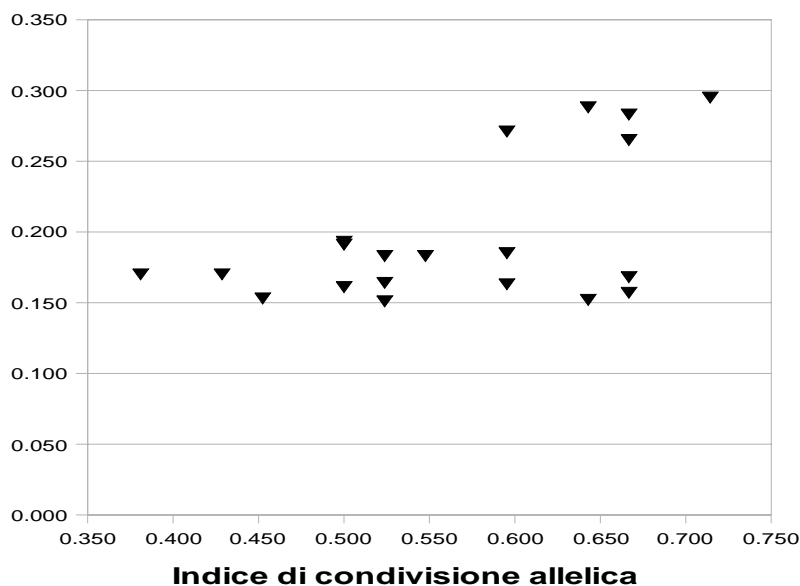


Figura 4 - Correlazione fra il coefficiente di kinship calcolato dalla genealogia e l'indice di condivisione allelica

Procedendo in analogia con quanto visto sopra (coppie ordinate per coefficiente di kinship decrescente), si possono ordinare le coppie per indice di condivisione allelica "S". La tabella 9 mostra

il risultato di tale ordinamento per le coppie con S maggiore di 0,64 (almeno 27 alleli condivisi su 42 totali); sono anche riportati i singoli valori, per ciascuna coppia, del numero di loci per i quali $z = 0$, $z = 1$, e $z = 2$. Una numerosità 0 nella colonna $z = 0$ significa che non vi sono “esclusioni”, cioè che i due soggetti condividono almeno un allele a tutti i loci.

Rango	Soggetto 1	Soggetto 2	z=0	z=1	z=2	Tot	S	K
1	1	2	2	8	11	30	0.714	0.295
2	3	4	3	7	11	29	0.690	0.128
3	5	6	4	5	12	29	0.690	0.085
4	7	4	2	9	10	29	0.690	0.062
5	8	4	0	13	8	29	0.690	0.048
6	9	8	4	5	12	29	0.690	0.041
7	10	11	2	9	10	29	0.690	0.039
8	12	13	1	12	8	28	0.667	0.283
9	13	14	0	14	7	28	0.667	0.265
10	15	16	1	12	8	28	0.667	0.168
11	15	21	1	12	8	28	0.667	0.157
12	1	27	1	12	8	28	0.667	0.111
13	2	27	1	12	8	28	0.667	0.111
14	17	15	2	10	9	28	0.667	0.083
15	10	28	2	10	9	28	0.667	0.077
16	18	10	3	8	10	28	0.667	0.056
17	10	29	1	12	8	28	0.667	0.053
18	3	16	2	10	9	28	0.667	0.039
19	19	30	3	8	10	28	0.667	0.038
20	11	3	3	8	10	28	0.667	0.031
21	20	31	0	15	6	27	0.643	0.288
22	21	16	1	13	7	27	0.643	0.152
23	22	32	3	9	9	27	0.643	0.110
24	23	33	3	9	9	27	0.643	0.106
25	24	32	1	13	7	27	0.643	0.073
26	6	4	3	9	9	27	0.643	0.071
27	25	34	2	11	8	27	0.643	0.065
28	9	35	4	7	10	27	0.643	0.052
29	26	30	3	9	9	27	0.643	0.050
30	9	11	2	11	8	27	0.643	0.035
31	11	4	4	7	10	27	0.643	0.030
32	39	4	3	9	9	27	0.643	0.028
33	18	15	2	11	8	27	0.643	0.025
34	17	11	1	13	7	27	0.643	0.025
35	8	11	2	11	8	27	0.643	0.021
36	36	40	2	11	8	27	0.643	0.019
37	27	34	1	13	7	27	0.643	0.017
38	27	9	2	11	8	27	0.643	0.016
39	38	41	2	11	8	27	0.643	0.016
40	20	42	2	11	8	27	0.643	0.015
41	9	38	4	7	10	27	0.643	0.012

Tabella 9 – Ordinamento per le coppie con S maggiore di 0,64

Questa è una forte indicazione di un rapporto di parentela genitore-figlio. In effetti, le tre coppie genitore-figlio identificate dai dati genealogici (**13 - 14**, kinship = 0,265, **20 - 31**, kinship = 0,288; **23 - 34**, kinship = 0,271) non hanno esclusioni, e le prime due si trovano alle posizioni 9 e 21 della tabella

9, mentre la terza non è presente in tabella in quanto ha un coefficiente di sharing = 0,595. Scorrendo i dati della tabella 9 si nota che alla quinta posizione c'è una coppia che ha zero esclusioni e un alto indice di condivisione (0,690), mentre il calcolo del coefficiente di kinship dall'albero genealogico risulta molto basso, 0,048. Si tratta della coppia 8 - 4, per i quali la genealogia riporta un bisnonno come più recente antenato comune: quindi è molto verosimile che questi due animali siano padre figlio, o parenti di primo o al limite di secondo grado, e che l'indicazione della parentela nella genealogia sia frutto di un errore di attribuzione.

Lo stesso dubbio riguarda una buona parte delle coppie evidenziate nella tabella 9. Analizzando il numero delle volte in cui i singoli soggetti sono presenti nella tabella si evidenzia un gruppo di cani, ciascuno presente in almeno tre coppie, che sembrerebbero fortemente imparentati fra loro, molto di più di quanto non farebbe supporre il calcolo del coefficiente di kinship (Tabella 10). Tale conclusione resta comunque ipotetica, in quanto solo una apposita indagine di paternità applicata su famiglie nucleari (stallone, fattrice, progenie) consentirebbe di ottenere una elevata probabilità di attribuzione.

Soggetto	No. di coppie
4	6
11	6
9	5
10	4
15	4
3	3
16	3
8	3

Tabella 10 – Gruppo di cani, ciascuno presente in almeno tre coppie, che sembrerebbero fortemente imparentati fra loro

3.8 GIUDIZI DI BELLEZZA E BRAVURA VS/PROFILO GENOMICO

43 soggetti analizzati geneticamente sono stati valutati anche da 3 Giudici di razza relativamente all'aspetto "Bravura" e alla prova in esposizione.

Per tali soggetti è stata costruita una tabella riportante il numero di alleli che condividono nel loro profilo allelico genomico ottenuto mediante i marcatori STR con lo stesso profilo genomico ottenuto per ciascun cane appartenente al resto della popolazione analizzata dal punto di vista molecolare ed il proprio giudizio dato dagli esperti di razza, espresso anche come punteggio (tabella 11).

I soggetti che hanno un numero di alleli in comune con il resto della popolazione analizzata maggiore a 19 sono quelli geneticamente più simili agli altri, mentre coloro che hanno un numero di alleli in comune al resto della popolazione inferiore o uguale a 19 sono quelli più variabili per profilo genetico rispetto agli altri.

Per questi motivi questi ultimi soggetti potrebbero essere i più adatti per la selezione indirizzata verso la bellezza e/o il lavoro in quanto associano ad una buona variabilità genetica anche un giudizio eccellente o ottimo.

Tabella 11 – Numero di alleli condivisi da ogni soggetto con il resto della popolazione esaminata con i marcatori e giudizio complessivo dato da 3 Giudici negli aspetti "Bravo e Bello"

42alleli della BGF1	Matricola lab	Punteggio Giudizio	Giudizio
21	V2181	10,00	INC
21	V2196	9,63	DIS
21	V2206	10,00	INC
21	V2213	10,00	DIS
21	V2227	8,25	INC
21	V2228	8,75	MB
21	V2254	8,50	INC
21	V2275	10,00	INC
21	V2344	10,00	INC
20	V2177	10,00	DIS
20	V2192	10,00	ECC
20	V2201	9,70	ECC
20	V2224	9,40	ECC
20	V2229	8,25	INC
20	V2285	9,70	ECC
20	V2330	10,00	INC
20	V2332	10,00	INC
20	V2341	9,00	INC
20	V2343	9,00	INC
19	V2171	9,63	OTT
19	V2178	10,00	INC
19	V2221	10,00	ECC
19	V2225	10,00	ECC
19	V2236	9,70	ECC
19	V2262	10,00	INC
19	V2273	9,63	OTT
19	V2283	8,25	INC
18	V2163	10,00	DIS
18	V2176	10,00	ECC
18	V2187	10,00	INC
18	V2216	10,00	INC
18	V2237	10,00	DIS
18	V2241	10,00	OTT
17	V2272	9,33	DIS
17	V2333	8,00	INC

4 ANALISI GENEALOGICA DEL DATABASE ELETTRONICO

4.8 INTERVALLO DI GENERAZIONE

L'intervallo di generazione è un parametro importante per derivare vari indici demografici delle popolazioni. La tabella 12 mostra l'intervallo di generazione calcolato separatamente per gli stalloni e le fattrici e limitato agli animali la cui progenie si è a sua volta riprodotta. A partire da metà degli anni 80 circa l'intervallo si stabilizza intorno a poco più di 4 anni e mezzo per i maschi e poco è più di 4 anni per le femmine.

Anno	Maschi	Femmine
1980	3.1	3.2
1981	3.8	3.4
1982	3.9	3.9
1983	4.5	4.0
1984	4.6	4.3
1985	4.7	4.0
1986	5.0	4.4
1987	5.0	4.0
1988	5.2	4.6
1989	5.3	4.1
1990	4.9	4.1
1991	4.3	4.2
1992	4.4	4.3
1993	4.4	4.0
1994	5.5	4.1
1995	4.9	3.7
1996	4.9	4.1
1997	4.4	4.6
1998	4.5	4.5
1999	5.2	4.4
2000	4.6	4.1
2001	4.6	3.8
2002	4.7	4.2
2003	4.6	4.0
2004	5.2	4.1
2005	5.6	4.0

Media 4.68 4.08

*Tabella 12 –Intervallo di generazione
calcolato per gli stalloni e le fattrici*

4.9 NUMEROSITA' EFFETTIVE

Il valore del numero effettivo dei fondatori (f_e : fondatori che contribuiscono alla variabilità genetica della razza, che tiene conto delle differenze del numero di figli), è risultato 65,7 e gli ascendenti effettivi (f_a : ascendenti che contribuiscono alla variabilità della popolazione) sono risultati 52,0. Di questi ultimi, 20,0 spiegano il 50% della variabilità genetica della popolazione attuale. I rapporti f_e/f_i e f_a/f_i sono risultati quindi pari a 0,106 e 0,084 rispettivamente. In pratica, a causa della struttura demografica della popolazione, ogni fondatore e ogni ascendente che ha contribuito effettivamente al pool genetico della popolazione attuale, degli altri 10 ($1/0,106$) e degli altri 12 ($1/0,084$) rispettivamente, si è persa ogni informazione genetica.

Il confronto tra il numero effettivo dei fondatori (f_e) e l'effettivo numero degli ascendenti (f_a) ci permette di rilevare una diminuzione di variazione genetica in popolazioni che sono passate attraverso un "collo di bottiglia" (il fenomeno identifica un particolare tipo di deriva genetica. Si verifica quando il numero di individui facenti parte di una popolazione viene ridotto drasticamente da forze atipiche nella selezione naturale. Solitamente comporta una riduzione critica della variabilità genetica, e tende ad eliminare del tutto alcuni alleli, ma soprattutto a far sì che altri vengano rappresentati in eccesso nel pool genico): l'alto valore del rapporto f_a/f_e (0,79) indicherebbe l'assenza di "colli di bottiglia" nella storia del Bracco Italiano.

4.10 FATTRICI E STALLONI

Dei 20.499 cani registrati, tutti hanno l'indicazione dello stallone (padre), mentre 79 (31 femmine, 48 maschi, nati fra il 7/7/75 e il 16/6/78) mancano dell'indicazione della fattrice (madre).

Le fattrici sono in totale 2510, con una media di 8,1 figli (minimo 1 – 153 fattrici –, massimi 67, 65 e 64, per rispettivamente Pimpa dei Sanchi (LO0181310), Idalia dei Bricchi (LO981464209 e Bora dei Ronchi (ci016437), v. tabella 13; il numero medio di figli per fattrice non cambia sensibilmente per anno di nascita della fattrice fra il 1976 e il 2002. L'intervallo di generazione delle fattrici (calcolato come età media della madre alla nascita di tutti i figli) risulta essere 3,91 anni; anche questo dato non cambia sensibilmente fra il 1975 e il 2000. Per 267 fattrici (10,6%) non sono noti i genitori, e sono pertanto considerate individui fondatori.

N° figli	N° femmine
1 - 10	1920
11 - 20	452
21-30	106
31-40	23
41-50	6
51-70	3

Tabella 13 – Distribuzione del numero di fattrici per numerosità della prole

Gli stalloni sono in totale 1524 (tabella 14), con una media di 13,4 figli per stallone.

N ° figli	N ° M a s c h i
1 - 10	1016
11 - 20	265
21 - 30	68
31 - 40	61
41 - 50	31
51 - 60	21
61 - 70	11
71 - 80	9
81 - 90	7
91 - 100	4
101 - 110	5
111 - 129	5
130-200	6

Tabella 14 – Distribuzione del numero di stalloni per numerosità della prole

La maggior parte dei riproduttori hanno un numero di figli registrati all'ENCI inferiore a 10 (1920 femmine e 1016 maschi), mentre 16 riproduttori maschi hanno un numero di figli compreso tra 101 e 200 e 9 femmine hanno un numero di figli compreso tra 40 e 70 (tabella 14).

In particolare i maschi che hanno prodotto più figli sono riportati nella tabella sottostante (tabella 15).

N° figli	LOI Maschio	Nome
142	CI024096	Fer
155	CI069995	Aiace di Cascina Croce
158	LO9991733	Rodi di Cascina Croce
165	CI067847	Titano del Trovese
183	CI057325	Tabar di Cascina Merigo
191	CI054207	Tano Dell'Asolano

Tabella 15 – LOI dei maschi con il n° maggiore di figli registrati.

I 2 stalloni con il maggior numero di figli sono Tano dell'Asolano (CI054207, n. 1/4/1986) con 191 figli e Tabar di Cascina Merigo (CI057325, n. 22/2/1987) con 183 figli. Gli altri stalloni con >130 figli sono Fer (CI24096, 142 figli), Aiace di Cascina Croce (CI069995, 155 figli), Rodi di Cascina Croce (LO9991733, 158 figli) e Titano del Trovese (CI067847, 165 figli).

Nella figura sottostante (figura 5) è riportata la distribuzione del numero dei loro figli per anno di nascita; come è possibile osservare l'anno con il numero maggiore di figli iscritti è risultato il 1992 (76 iscritti) per Tabar e l'anno 1996 (45 iscritti) per Tano.

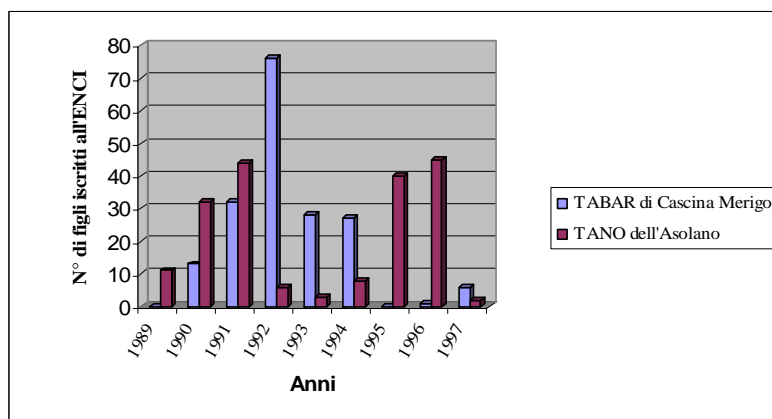


Figura 5 – Distribuzione nel numero dei figli di TABAR di CM e di TANO dell'Asolano per anno di nascita.

I legami di parentela, sia tramite linea diretta che indiretta, tra i 6 grandi stalloni della razza sono riportati nella figura 6, mentre i coefficienti di parentela sono riportati in tabella 16.

Tre stalloni sono risultati consanguinei, e precisamente Tano DA ($F=0,125$; i suoi genitori sono mezzi fratelli di padre), Aiace DCC ($F= 0,094$) e Rodi DCC ($F= 0,052$). Il soggetto che risulta essere parente di tutti gli altri riproduttori è Rodi DCC, mentre Fer risulta parente soltanto di Rodi e Aiace.

Tano è parente di Titano e Rodi perché è il nonno di Titano per via femminile (Giubba). I nonni paterni di Tano entrano nel pedigree di Rodi anche perché parenti di 5° grado della madre Tiffany di Cascina Croce.

Fer è parente, in linea diretta soltanto di Rodi e di Aiace; quest'ultimo è parente di Tabar in quanto una sua sorella piena è la nonna paterna di Aiace ed il padre di Tabar risulta essere anche il bisnonno di Aiace.

Tabar è il nonno di Rodi ($a_{ij} =0,348$), ma il loro coefficiente di parentela è molto superiore al valore atteso di 0,250 in quanto il padre di Tabar è anche parente stretto della madre di Rodi. Anche il coefficiente di parentela tra Titano e Rodi è superiore al valore atteso (tabella 17) di 0,500 ($a_{ij} =0,552$), in quanto alcuni parenti di Titano risultano anche presenti nella genealogia della madre di Rodi.

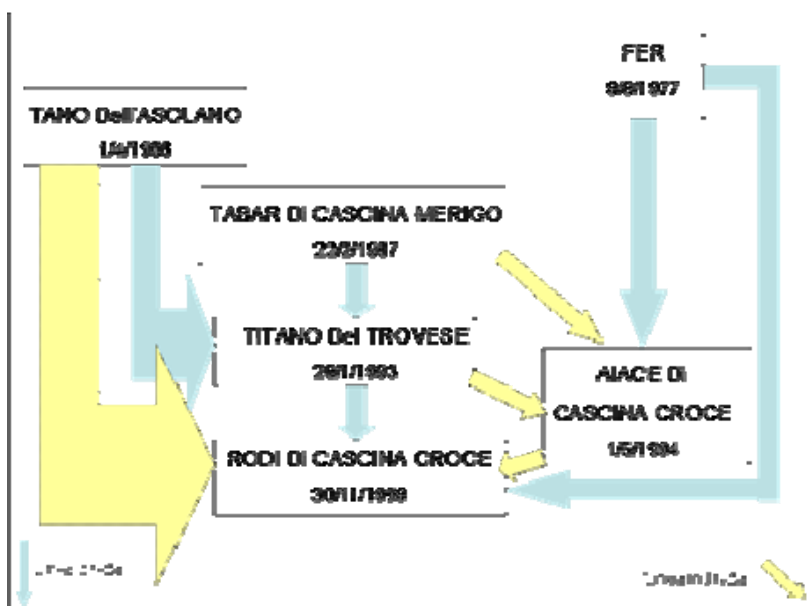


Figura 6 – Legami di parentela tra i principali stalloni della razza.

	Fer	Tano DA	Tabar DCM	Titano DT	Aiace DCC	Rodi DCC
Fer	1,000					
Tano DA	0,000	1,125				
Tabar DCM	0,000	0,000	1,000			
Titano DT	0,000	0,282	0,500	1,000		
Aiace DCC	0,062	0,000	0,266	0,133	1,094	
Rodi DCC	0,062	0,152	0,348	0,552	0,167	1,052

Tabella 16 – Coefficienti di parentela additiva tra i principali riproduttori della razza.

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

Tabella 17 – Esempi di parentele (parentela additiva) comuni con relativi coefficienti.

La tabella 18 riporta la distribuzione del numero di figli per anno dei riproduttori che nel periodo 1993-2006 hanno avuto un numero di figli superiore a 50 (33 stalloni); è interessante notare che l'attività riproduttiva di cinque dei sei principali stalloni della razza si è svolta in questo periodo.

Stallone	Nome	N° Figli periodo 1993/2006	N(1993)	N(1994)	N(1995)	N(1996)	N(1997)	N(1998)	N(1999)	N(2000)	N(2001)	N(2002)	N(2003)	N(2004)	N(2005)	N(2006)
CI070563	Tabasco di Trebisonda	50	0	0	30	16	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CI070822	Bruno	52	0	0	0	0	0	3	10	7	14	5	6	7	0	0
CI073213	Basco	52	0	0	0	0	0	2	13	26	0	11	0	0	0	0
CI070727	Robur di Villa Carla	53	0	0	0	0	0	1	21	2	19	10	0	0	0	0
LO99201630	Achille dei Sanchi	54	0	0	0	0	0	0	0	0	7	8	7	15	17	0
LO0063825	Picasso di Cascina Croce	55	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	36	13	0	0
LO0096120	Ciclone	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	15	10	2	3
LO99112069	Zorro	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	12	1	28
CI069984	Bagai	56	0	0	0	0	10	6	11	4	5	4	16	0	0	0
LO0181306	Pepe dei Sanchi	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	13	17	11	13
CI070199	Marc dei Sanchi	59	0	0	0	14	5	0	0	2	1	6	24	7	0	0
CI072464	Dattero della Crocchia	62	0	0	0	0	0	29	16	11	0	1	5	0	0	0
LO993695	Picaro	62	0	0	0	0	0	0	0	0	9	16	16	13	8	0
CI057325	Tabar di Cascina Merigo	62	28	27	0	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CI066410	Piombo dei Sanchi	65	0	0	13	5	9	1	30	7	0	0	0	0	0	0
CI072814	Serleo del Trovese	67	0	0	0	0	5	11	20	2	3	8	18	0	0	0
LO0360062	Fortunato	68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	12	23
LO98132983	Camillo di Cascina Croce	72	0	0	0	0	0	0	0	0	8	15	16	14	19	0
LO9830301	Val Bisenzio Barone	76	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	25	42	0	0
CI073807	Hunter III di Trebisonda	78	0	0	0	0	18	26	17	0	7	10	0	0	0	0
CI059206	Augusto	83	29	13	29	2	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0
LO0181307	Peppe dei Sanchi	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	40	19	3	0
LO0110542	Benhur	87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	10	0	21	38
CI062714	Mister dei Sanchi	88	25	13	36	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CI068265	Argento	91	0	3	0	0	5	19	8	19	15	9	1	12	0	0
LO00100275	Omar	97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	23	8	29	23
CI054207	Tano dell'Asolano	98	3	8	40	45	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CI064559	Sirlad di Cascina Merigo	108	0	12	37	23	12	10	9	0	5	0	0	0	0	0
CI074074	Tom III del Trovese	109	0	0	0	0	0	0	0	0	14	21	41	17	7	9
CI072362	Noè delle Cacete	129	0	0	0	0	0	0	15	47	33	11	12	6	5	0
CI069995	Aiace di Cascina Croce	155	0	0	0	12	20	42	25	24	7	23	0	2	0	0
LO9991733	Rodi di Cascina Croce	158	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	39	30	38	33
CI067847	Titano del Trovese	165	0	0	10	19	22	28	39	28	0	14	5	0	0	0

Tabella 18 - Numero di figli per anno degli stalloni che hanno avuto >50 figli nel periodo 1993-2006

4.11 ININCROCIO E PARENTELA

Considerando tutto il database, il coefficiente di in incrocio (consanguineità) medio è risultato pari al 3,6%. Questo dato include anche i fondatori, il cui coefficiente di inincrocio è per definizione = 0, mentre in effetti esso non è noto.

Considerando quindi il database completo, sono risultati consanguinei ben 13290 animali (6741 maschi e 6549 femmine).

Su 13290 animali, 8103 hanno presentato un coefficiente di inincrocio accettabile, ovvero inferiore al 5% (39,53% dell'intera popolazione), mentre ben 487 soggetti (2,51% del totale) hanno presentato un coefficiente di inincrocio superiore al 20% (Tabella 19).

	n°
0,00 < F < 0,05	8103
0,05 < F < 0,10	2880
0,10 < F < 0,15	1438
0,15 < F < 0,20	382
0,20 < F < 0,25	231
0,25 < F < 0,30	217
0,30 < F < 0,35	27
0,35 < F < 0,40	12

Tabella 19 – Distribuzione dei coefficienti di consanguineità.

Se analizziamo la distribuzione dei soggetti consanguinei negli ultimi anni (2003/2006) si osserva un aumento dei soggetti con un coefficiente di inincrocio inferiore al 5% (siamo infatti passati da un 50,28% nel 2003 ad un 55,47% nel 2006) e di quelli con un coefficiente di inincrocio compreso tra il 5 ed il 10% (28,43% nel 2003 fino ad un 31,75% nel 2006), ed una diminuzione dei soggetti con coefficiente di inincrocio tra il 10 ed il 20%.

Per contro, nel 2006, si osserva un aumento dei soggetti consanguinei con un coefficiente compreso tra il 30 ed il 35% (6 soggetti su un totale di 23 dell'intera popolazione, corrispondente ad un 26%) (Tabella 20; Figura 7).

Range	Anno 2003		Anno 2004		Anno 2005		Anno 2006		Anno 2007	
	n°	% sul totale	n°	% sul totale	n°	% sul totale	n°	% sul totale	n°	% sul totale
0,00 < F < 0,05	451	50,28	418	53,52	381	55,22	421	55,47	50	89,29
0,05 < F < 0,10	255	28,43	190	24,33	216	31,30	241	31,75	0	0,00
0,10 < F < 0,15	121	13,49	139	17,80	63	9,13	66	8,70	5	8,93
0,15 < F < 0,20	56	6,24	20	2,56	19	2,75	18	2,37	1	1,79
0,20 < F < 0,25	11	1,23	4	0,51	6	0,87	6	0,79	0	0,00
0,25 < F < 0,30	3	0,33	9	1,15	5	0,72	1	0,13	0	0,00
0,30 < F < 0,35	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	0,79	0	0,00
0,35 < F < 0,40	0	0,00	1	0,13	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Tabella 20 – Distribuzione dei coefficienti di inincrocio nel periodo 2003- Aprile 2007.

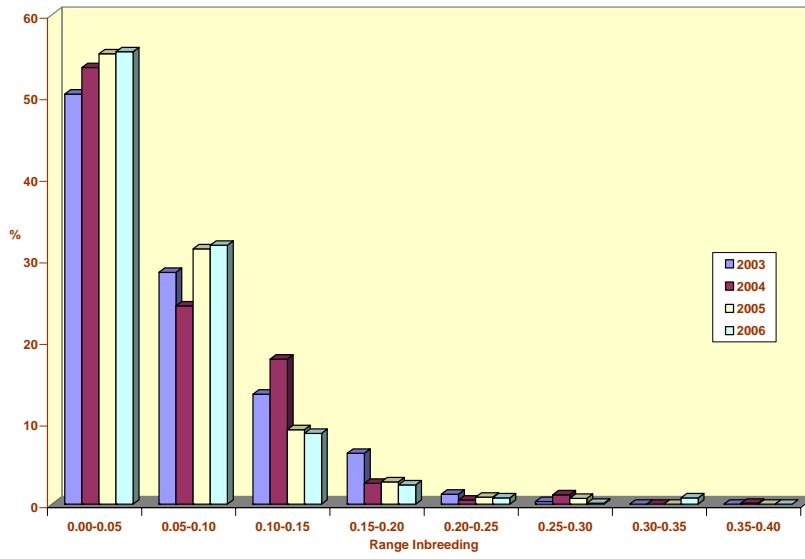


Figura 7 – Distribuzione dei coefficienti di inincrocio per i nati tra il 2003 ed il 2006.

4.4.1 ININCROCIO PER GENERAZIONE

Come riportato sopra, il numero massimo di generazione tracciate è risultato 14 (Tabella 21).

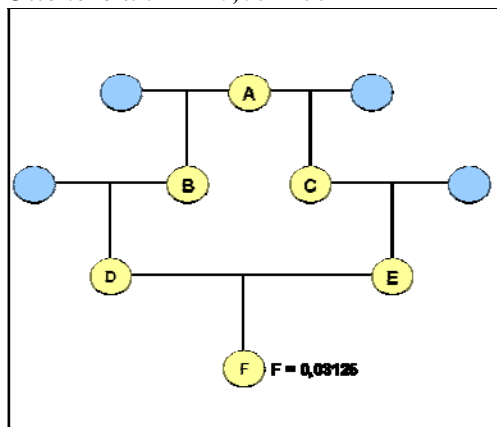
Generazione	N° soggetti	Consanguineità media (%)	% di soggetti consanguinei	Consanguineità media dei soggetti consanguinei (%)	Parentela media (%)
0	563	0,00			0,19
1	1860	0,00			0,55
2	1739	0,70	4,26	16,55	1,20
3	1502	2,29	19,31	11,84	1,78
4	1562	3,06	41,42	7,38	2,43
5	1814	3,80	62,24	6,10	2,89
6	1738	3,55	73,30	4,85	3,35
7	1789	4,27	85,58	4,99	3,68
8	1738	4,66	94,13	4,95	3,85
9	1755	5,31	97,26	5,46	4,08
10	1952	5,52	99,90	5,53	4,27
11	1651	6,38	100,00	6,38	4,41
12	985	5,54	100,00	5,54	4,38
13	367	4,50	100,00	4,50	4,29
14	49	6,61	100,00	6,61	5,05

Tabella 21 – Inincrocio per generazione tracciata.

Il trend dell'inincrocio è crescente con valori piuttosto alti rispetto a quelli rilevati per altre razze italiane (Sabbioni et al., 2006, Lubas et al., 2008 etc) ed estere (Leroy et al. 2006), ma più bassi rispetto a quanto osservato nel Bolognese (Sabbioni et al., 2008).

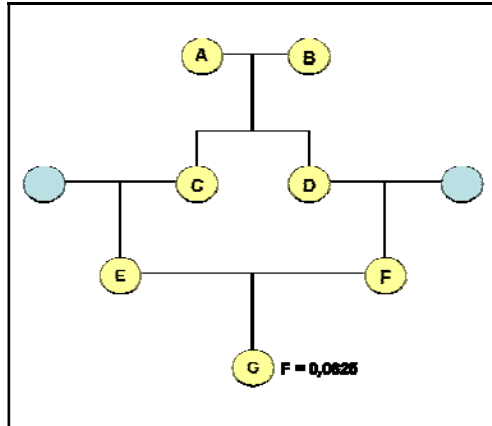
A partire dai soggetti con 5 generazioni tracciate, il coefficiente di inincrocio è più alto del valore del 3,125%, che risulterebbe dall'accoppiamento di due animali che condividono un singolo nonno (soggetti D e E con in comune il nonno A; figura 8).

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



Il coefficiente di inincrocio assume il valore più alto per i 49 soggetti con 14 generazioni tracciate ($F=0,0661$); tale valore è più alto rispetto a quello ottenuto accoppiando due animali che condividono i due nonni (in termini umani due cugini: E con F con in comune i due nonni A e B; figura 9).

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



In tutte le generazioni il coefficiente medio di inincrocio è sostanzialmente più alto rispetto al coefficiente di parentela di kinship dei genitori che come è noto dà una indicazione di quanto dovrebbe essere il grado di inincrocio nella generazione successiva (Pagnacco, 2005); se coincidono il loro rapporto deve essere uguale ad uno.

Il rapporto tra l'inincrocio della prole ed il coefficiente di parentela di kinship dei genitori ($F_{\text{medio}} \text{ generazione } n / \text{kinship generazione } n-1$) assume un valore medio pari a 1,41 ed un range compreso tra un minimo di 1,03 ed un massimo di 1,91.

La percentuale dei soggetti consanguinei aumenta con l'aumentare del numero di generazioni tracciate, e a partire dai soggetti con 11 generazioni tracciate, tutti i soggetti risultano consanguinei.

4.4.2 TREND DI F NEL CORSO DEGLI ANNI

Nelle tabelle 22 e 23 e nelle figure 10 e 11 è riportata l'evoluzione del coefficiente di inincrocio dei cani secondo il loro anno di nascita.

Tabella 22 – Numero consanguinei e dati sull'inincrocio per i nati dal 1970 al 1989.

Anno	n° Soggetti	n° consanguinei	Consanguinei		F medio		
			% per anno	F medio	nei consanguinei	F massimo	F minimo
1970/1975	211	0	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000
1976	548	0	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000
1977	629	0	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000
1978	657	1	0,15	0,000	0,250	0,250	0,250
1979	512	11	2,15	0,005	0,239	0,250	0,125
1980	439	56	12,76	0,021	0,167	0,250	0,031
1981	505	29	5,74	0,005	0,094	0,250	0,031
1982	515	79	15,34	0,017	0,110	0,250	0,031
1983	411	88	21,41	0,020	0,093	0,125	0,016
1984	632	146	23,10	0,023	0,101	0,281	0,016
1985	540	174	23,22	0,027	0,083	0,281	0,004
1986	570	240	42,11	0,032	0,076	0,266	0,004
1987	559	234	41,86	0,030	0,073	0,391	0,004
1988	702	388	55,27	0,035	0,064	0,312	0,004
1989	630	384	60,95	0,029	0,047	0,266	0,004

Tabella 23 - Numero consanguinei e dati sull'inincrocio per i nati dal 1990 al 2007.

Anno	n° Soggetti	n° consanguinei	Consanguinei		F medio		
			% per anno	F medio	nei consanguinei	F massimo	F minimo
1990	657	451	68,65	0,031	0,045	0,266	0,004
1991	717	513	71,55	0,029	0,041	0,25	0,001
1992	749	597	79,71	0,037	0,046	0,258	0,001
1993	586	506	86,35	0,033	0,038	0,327	0,002
1994	673	567	84,25	0,033	0,04	0,266	0,001
1995	751	688	91,61	0,051	0,055	0,375	0,0001
1996	643	565	87,87	0,051	0,058	0,288	0,001
1997	723	687	95,02	0,051	0,054	0,285	0,001
1998	687	652	94,91	0,058	0,061	0,304	0,0002
1999	829	819	98,79	0,056	0,057	0,312	0,001
2000	687	685	99,71	0,054	0,054	0,277	0,001
2001	723	721	99,72	0,057	0,057	0,293	0,002
2002	836	826	98,80	0,057	0,058	0,395	0,003
2003	897	897	100,00	0,066	0,066	0,298	0,002
2004	781	781	100,00	0,062	0,062	0,396	0,003
2005	690	690	100,00	0,057	0,057	0,271	0,003
2006	759	759	100,00	0,056	0,056	0,345	0,004
apr-07	56	56	100,00	0,051	0,051	0,191	0,023

Figura 10 – Trend dell'inincrocio per anno di nascita.

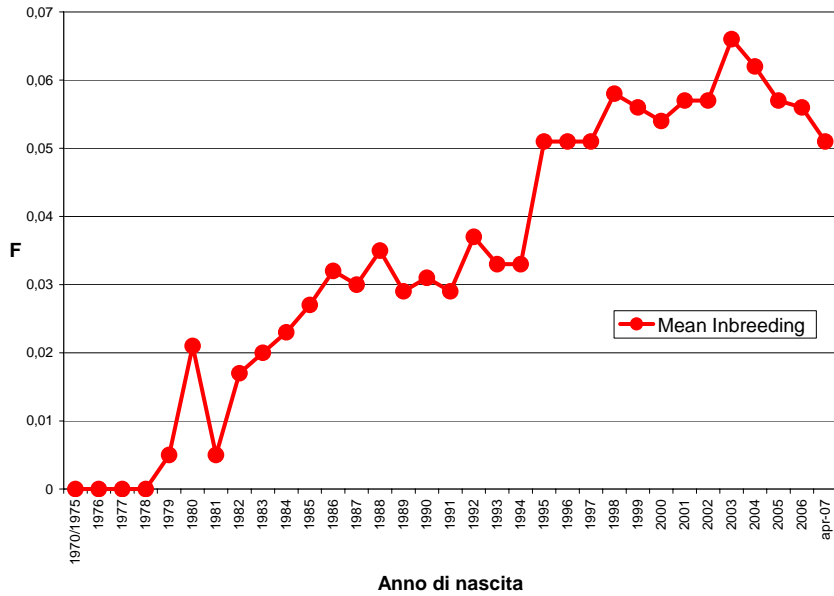
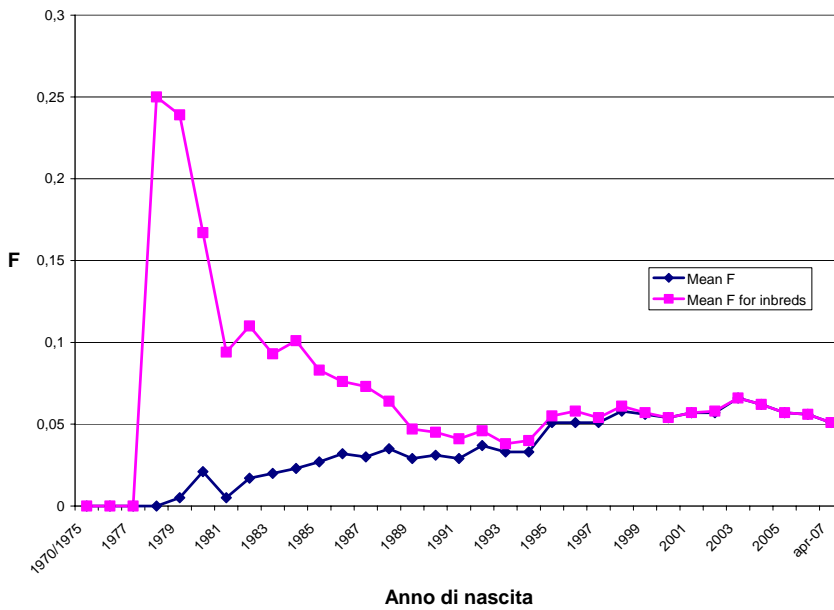


Figura 11 - Confronto tra l'inincrocio medio dei nati per anno e l'inincrocio medio dei soggetti consanguinei.



Fino al 1978 si osserva un valore nullo del coefficiente di inincrocio e questo è dovuto essenzialmente alla mancanza di accuratezza dei dati genealogici; successivamente si osserva un trend crescente fino a raggiungere valori superiori a 0,05 a partire dai nati del 1995.

Tutti i nati dopo il 2003 compreso risultano consanguinei, con un coefficiente di inincrocio medio compreso tra un minimo di 0,051 per i nati nel 2007 fino ad un valore massimo di 0,066 per quelli nati nel 2003.

La velocità di accrescimento dell'inincrocio medio per l'intero periodo (1970-2007) è di 0,163% punti per anno (con un conseguente numero effettivo della popolazione $N_e=306,75$), valore comparabile con quanto osservato nella razza Lagotto Romagnolo (Sabbioni et al., 2006) o nella razza francese Barbet (Leroy et al., 2006) e decisamente inferiore a quanto osservato in altre razze francesi (Leroy et al., 2006).

Se invece consideriamo gli anni 1995-2006, periodo in cui il coefficiente medio di inincrocio si è attestato intorno al valore del 5%, l'incremento annuo medio è pari allo 0,0455% (con un conseguente numero effettivo della popolazione $N_e=1099$).

Nel Bracco Italiano si osserva un incremento di inincrocio per generazione pari a 0,39%, che corrisponde ad un numero effettivo realizzato della popolazione N_{er} di 128,20

5 ANALISI BIOMETRICHE

5.1 CAMPIONAMENTO DEGLI ANIMALI PER LA VALUTAZIONE MORFOLOGICA.

Sono stati effettuati rilievi morfologici su un totale di 121 cani di razza Bracco Italiano (56 Femmine e 65 maschi) di età compresa tra i 7 mesi ed i 10 anni, ed ogni cane è stato fotografato insieme con una palina per effettuare *le rilevazioni somatiche anche tramite software*.

Le misurazioni sono state effettuate durante l'anno 2008, in occasione di raduni o in visite presso alcuni allevamenti (Tabella 24). I rilevamenti sono stati effettuati da 6 operatori diversi.

Tabella 24 – Numero animali campionati per allevamento o raduno.

	All. A	All. B	Raduno A	Raduno B	Raduno C	Raduno D	Raduno E	All. C
Femmine	2	9	10	1	11	7	10	6
Maschi	2	3	5	11	10	9	23	4
Totali	4	12	15	12	21	16	33	10

Su ciascun soggetto in stazione eretta e su terreno piano, con il cinometro e con il metro, sono state effettuate le seguenti misurazioni biometriche:

- altezza al garrese (misurazione da terra al punto più alto del garrese) (Con Cinometro);
- circonferenza del torace (misurata caudalmente alle scapole);
- larghezza agli ilei (misurata tra le punte esterne dell'ala iliaca);
- larghezza ischiatica (misurata tra le punte esterne della tuberosità ischiatica).
- lunghezza della groppa (misurata lungo la linea obliqua, dalla punta dell'ala iliaca al punto caudale della tuberosità ischiatica);
- circonferenza dello stinco;
- circonferenza metacarpale.

Su ogni soggetto sono state effettuate, da un singolo operatore, rilevazioni biometriche tramite software "Image Measure vers. 0.1" (2008) (Figura 12):

- altezza al garrese;
- altezza alla groppa (misurazione da terra al punto più alto della groppa);
- altezza del torace (misurata caudalmente alle scapole);
- lunghezza del tronco (misurata lungo la linea obliqua, dall'articolazione scapolo – omerale alla tuberosità ischiatica);
- lunghezza orecchio;
- lunghezza testa.



Figura 12 – Esempio di foto analizzata tramite software.

5.2 VARIABILITÀ FENOTIPICA MISURAZIONI DIRETTE

L'elaborazione delle misurazioni analitiche ha messo in evidenza che l'età del soggetto non è risultata mai significativa (i pochi soggetti con età inferiore all'anno non hanno mostrato differenze con gli animali adulti) mentre l'operatore è risultato significativo per alcune misurazioni, e questo è dovuto essenzialmente al fatto che alcuni operatori hanno misurato un diverso numero di maschi o femmine.

Come possiamo osservare dalla tabella 25, che riporta le differenze tra i sessi, differenze altamente significative si rilevano per l'altezza al garrese (circa 3-4 cm di differenza tra i due sessi; $P < 0,01$), la circonferenza al torace (circa 2-3 cm di differenza tra i sessi; $P < 0,01$) e la circonferenza metacarpo (circa 1 cm di differenza tra i sessi; $P < 0,01$); anche la circonferenza dello stinco risulta significativamente diversa tra i sessi ma ad un grado inferiore (meno di un cm di differenza; $P < 0,05$).

Lo standard di razza riporta un'altezza al garrese variabile tra i 55 ed i 67 cm, e precisamente da 58 cm a 67 cm per i maschi e da 55 cm a 62 cm per le femmine, per cui i nostri dati medi rientrano perfettamente nei valori medi delle due categorie. Soltanto una femmina e quattro maschi presentano un'altezza al garrese con valori che si collocano al di fuori dei limiti riportati nello standard di razza.

L'altezza al garrese è inoltre omogenea in quanto la deviazione standard è piuttosto limitata, mentre la circonferenza al torace è molto più variabile, soprattutto nelle femmine, e questo potrebbe essere attribuibile essenzialmente a fattori ambientali.

Non sono state rilevate differenze significative nelle misure relative alla groppa, ed i valori sono praticamente coincidenti nei due sessi.

Tabella 25 – Misurazioni biometriche per sesso.

Parametro		FEMMINE			MASCHI		
		N°	media	d.s.	N°	media	d.s.
Altezza al Garrese	cm	33	59,00 B	2,954	37	62,81 A	2,732
Circonferenza Torace	cm	56	71,26 B	5,46	64	73,93 A	3,973
Circonferenza Stinco	cm	56	13,75 a	2,201	64	14,60 b	2,2089
Circonferenza Metacarpo	cm	46	12,58 B	0,983	49	13,62 A	0,904
<i>Misure della groppa:</i>							
Larghezza agli ilei	cm	56	8,49	2,562	59	8,25	2,166
Larghezza ischiatica	cm	56	12,99	2,001	63	13,05	1,887
Lunghezza groppa	cm	46	15,7	1,573	56	15,62	1,844

Lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative: A,B: $P < 0,01$ a,b: $P < 0,05$.

Alla lettera A è associato il valore significativamente più alto, mentre alla lettera B è associato il valore significativamente più basso

Nelle figure 13, 14 e 15 vengono messe a confronto le diverse misure morfologiche nei due sessi.

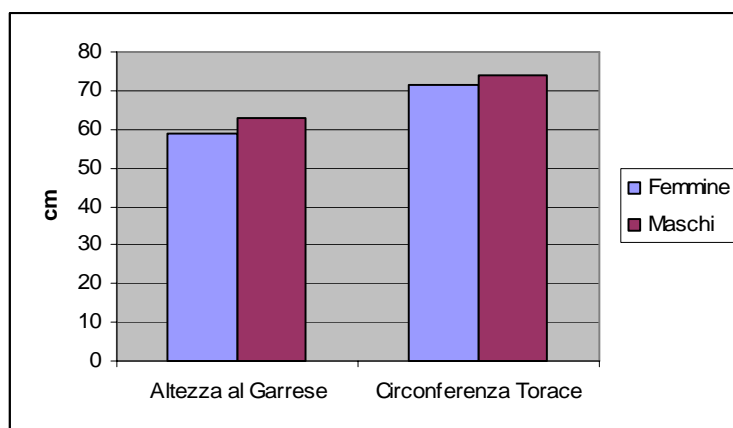


Figura 13 -Altezza al garrese e Circonferenza al torace nei due sessi.

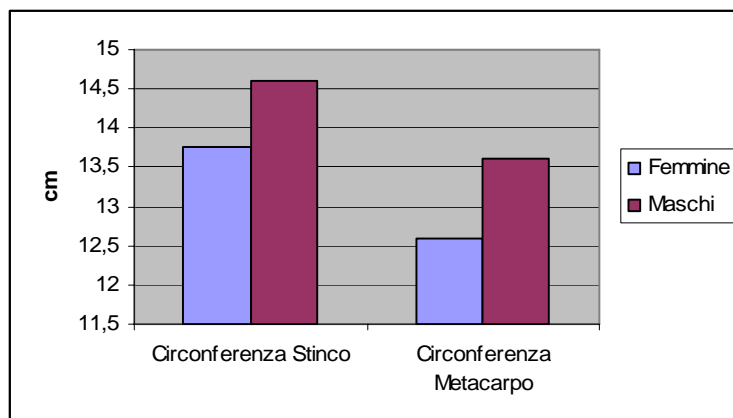


Figura 14 - Circonferenza dello Stinco e Metacarpo nei due sessi.

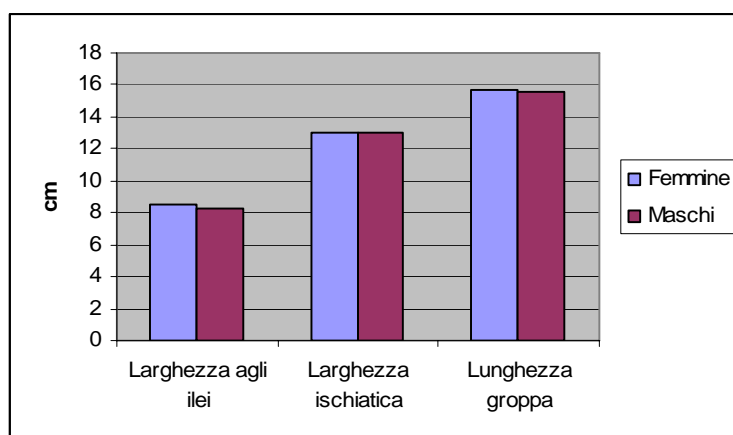


Figura 15 - Misure della Groppa nei due sessi.

Tabella 26 – Correlazioni fenotipiche tra i vari parametri morfologici.

	Alt. Garrese	Circ. Torace	Circ. Stinco	Circ. Metacarpo	Largh. agli ilei	Largh. ischiatica	Lungh. groppa
Alt. Garrese	1,000						
Circ. Torace	0,574**	1,000					
Circ. Stinco	0,407**	0,146	1,000				
Circ. Metacarpo	0,382**	0,388**	0,260*	1,000			
Largh. agli ilei	0,279*	0,042	-0,117	0,090	1,000		
Largh. ischiatica	0,133	0,298**	-0,380**	0,298**	0,392**	1,000	
Lungh. groppa	0,249*	0,126	0,335**	-0,028	0,316**	-0,106	1,000

**P<0,01; *: P<0,05.

Molte sono risultate le correlazioni fenotipiche significative tra i vari caratteri misurati (tabella 26). In particolare osserviamo che l'altezza al garrese risulta correlata positivamente ed in maniera altamente significativa con la Circonferenza al Torace, la Circonferenza allo stinco e al metacarpo ed in maniera minore con la larghezza della groppa rilevata agli ilei e la sua lunghezza. Questo significa che con l'aumentare dell'Altezza al garrese, si osserva un aumento di tutti gli altri parametri.

Altra correlazione positiva ed altamente significativa risulta quella tra la Lunghezza della Groppa e la sua larghezza rilevata agli ilei.

5.3 USO DEL SOFTWARE DEDICATO PER IL RILEVAMENTO DELLE MISURAZIONI.

1) *La riproducibilità.* La riproducibilità tra la misura analitica dell'altezza al garrese e quella effettuata tramite software è risultata pari all'84,84% e l'elaborazione statistica non ha evidenziato differenze significative tra i due valori dell'altezza al garrese (tabella 26);

Tabella 27 - Altezza al garrese: riproducibilità e differenze tra misure analitiche e misure effettuate tramite software.

		Misura analitica		Misura con software		Riproducibilità
		media	d.s.	media	d.s.	
Altezza al Garrese	cm	61,01	3,41	61,67	4,248	84,84%

2) *Differenze tra i sessi.* L'analisi della varianza (tabella 28) condotta sulle misure rilevate tramite software ha evidenziato un effetto significativo del sesso su tutti i parametri: tutte le misurazioni morfologiche sono risultate maggiori nei maschi, ed in particolare le tre altezze (P<0,01) e la lunghezza del tronco (P<0,01).

Se analizziamo le proporzioni, la lunghezza del tronco è leggermente superiore all'altezza al garrese; tale differenza risulta lievemente più evidente nelle femmine, ma il rapporto lunghezza del tronco/altezza al garrese è risultato coincidente nei due sessi e prossimo al valore di 1 (1,02 nelle femmine vs. 1,01 nei maschi; tabella 29), come richiesto nello standard della razza.

La lunghezza totale della testa risulta 4/10 (tabella 29) dell'altezza al garrese (0,40 nelle femmine e 0,39 nei maschi), come riportato nello standard della razza, mentre il rapporto larghezza della groppa/altezza al garrese è inferiore rispetto a quanto riportato nello standard (circa 1/4 = 0,26-0,27 nelle femmine e 0,25 nei maschi rispetto al valore atteso di 1/3 = 0,33).

A differenza di quanto rilevato per le misurazioni, il dimorfismo sessuale non ha coinvolto le proporzioni e gli indici.

Tabella 28 - Misure morfologiche rilevate mediante software: differenze tra i sessi.

Parametro	N°	FEMMINE		MASCHI		
		media	d.s.	media	d.s.	
Altezza al Garrese	cm 44	59,02 B	3,067	58	63,28 A	3,544
Altezza alla Groppa	cm 40	57,67 B	3,214	53	62,12 A	3,648
Altezza del Torace	cm 46	26,47 B	2,029	61	28,02 A	1,916
Lunghezza del Tronco	cm 39	60,78 B	5,945	54	64,32 A	5,680
Lunghezza della Testa	cm 34	23,56 b	2,735	46	25,09 a	2,301
Lunghezza Orecchio	cm 43	19,31 b	1,781	56	20,11 a	1,755

Lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze significative: A,B: P<0,01 a,b:P<0,05.

Alla lettera A è associato il valore significativamente più alto, mentre alla lettera B è associato il valore significativamente più basso

Tabella 29 - Indici e proporzioni morfologiche: differenze tra i sessi.

	N°	FEMMINE		MASCHI		
		media	d.s.	media	d.s.	
<i>Indici</i>						
Indice di conformazione laterale del corpo	33	94,20	19,012	50	96,81	16,547
Indice corporale relativo	33	86,67	10,266	50	87,14	8,144
<i>Proporzioni</i>						
Lunghezza del tronco-altezza al garrese	S 37	1,02	0,078	52	1,01	0,086
Lunghezza della testa- altezza al garrese	S 30	0,40	0,036	44	0,39	0,035
Lunghezza groppa - altezza al garrese	M 37	0,27	0,029	50	0,25	0,032
Lunghezza groppa - altezza al garrese	A 34	0,26	0,023	38	0,25	0,027

S = misure rilevate con software; M = miste; A = misure reali.

5.4 INDICE GENETICO PER L'ALTEZZA AL GARRESE.

Nella tabella 30 sono riportati gli indici genetici relativi all'altezza al garrese per i 70 animali misurati tramite cinometro.

Come è stato già sottolineato, ogni allevatore, dopo aver consultato tali indici, potrà fare determinati accoppiamenti per raggiungere, nella progenie, quei dati biometrici desiderati.

Esempi:

A) Supponiamo di volere un fenotipo medio: Se accoppiamo la Femmina Ombra (I = -2,48) con il maschio Rovo dei Bricchi (I= +2,00) i loro figli avranno un Indice $Pedigree$ pari a $\frac{1}{2} (-2,48+2,00) = +0,24$. Questo sta ad indicare che i figli saranno circa 0,24 cm sopra la media (dei maschi e delle femmine), ovvero avranno un'altezza che tende al valore medio.

B) Supponiamo di volere un fenotipo alto: Se accoppiamo la Femmina Nella delle terre Alliane (I=2,47) con Talamone (I= 3,90), i loro figli avranno un Indice $Pedigree$ $\frac{1}{2} (+2,47+3,90) = +3,185$. Questo sta ad indicare che i loro figli saranno circa 3 cm più alti rispetto alla media della popolazione (3+59cm = 62 cm per le femmine; 3+63 cm= 66 cm per i maschi).

C) Supponiamo di volere un fenotipo basso: Se accoppiamo la Femmina Ombra (I = -2,48) con il maschio Tiranno (I = -1,75), i loro figli avranno un Indice $Pedigree$ $\frac{1}{2} (-2,48 -1,75) = -2,085$. Questo sta ad indicare che i loro figli saranno circa 2 cm più bassi rispetto alla media della popolazione (59 - 2 = 57 cm per le femmine; 63 - 2 = 61 cm per i maschi).

nome cane	Altezza al Garrese (cm)	Indice AltGar
Achille	68	3,16
Adone d'Aleria	60,5	-1,48
Africa	62	1,82
Agamennone di CC	60,5	-1,44
Aiace di Villa Carla	63	0,12
Alba	58	-0,61
Alemanno	61	-1,11
Alma	56	-1,83
Argine dell'oltrepo'	60,5	-1,39
Argo	60	-1,72
Arpa	61	1,21
Astro	61	-1,11
Aurora	56	-1,83
Bella	56	-1,86
Berto	60	-1,75
Bobo	62	-0,51
Bosco	63	0,12
Briglia	61	1,23
Brina	58	-0,62
Bubul	65	1,35
Bullo	61,5	-0,82
Calisto	59	-2,33
Camilla	60	0,64
Carmen	58	-0,61
Caruso di CC	61	-1,31
Ceres	65	1,31
Cetra	58,5	-0,30
Circe Polceveras	60	0,60
Diamante	55	-2,47
Diva Trebisonda	61	1,26
Edi	57	-1,20
Febo di CC	62,5	-0,20
Fer	62	-0,51
Furia di CC	57	-1,25
Gastone di CC	63	0,12
Gerba	55,5	-2,10
Gilda	59	0,00
Gim di CC	67	2,60
Greco	62	-0,54
Guia	53	-3,60
Isotta	62,5	2,14
Kea	57	-1,24
Latina	60	0,60
Luna	57	-1,29
Luna	58	-0,60
Martino	66	2,00
Medea di Cascina Croce	58	-0,62
Megan	60	0,60
Morena Polceveras	62	1,89
Nella delle Terre Alliane	63	2,47
Ombra	55	-2,48
Pauso dei Bricchi	60,5	-1,42
Peni	62	1,80
Polcevera's Isidoro	62	-0,56
Polcevera's Raimondo	65	1,35
Poldo	67,5	2,81
Pomona dei Bricchi	65	3,69
Pul	60,5	-1,39
Quenta	60,5	0,91
Rogoredo della Bassa Bria	60	-1,78
Rovo dei Bricchi	66	2,00
Saturnino di CC	62	-0,53
Talamone	69	3,90
Tiranno della Bassa Brian	60	-1,75
Tito	64	0,73
Uragano	64	0,71
Winnie delle terre alliane	58	-0,68
Xeres delle terre alliane	61,5	-0,91
Zara	66	4,30
Zorba di Casamassima	60,5	-1,39

Tabella 30 - Indici genetici relativi all'altezza al garrese per i 70 animali misurati tramite cinometro.

5.5 ANALISI MULTIVARIATA DELLA VARIABILITÀ FENOTIPICA

Le varie applicazioni della Cluster Analysis sui dati morfologici hanno messo in evidenza l'esistenza due gruppi morfologici per ciascun sesso, come evidenziato nelle figure 16 e 17.

Uno dei due gruppi presenta una altezza al garrese media che corrisponde, in linea generale, al valore medio rilevato per il sesso, mentre l'altro gruppo ha un valore medio dell'altezza al garrese che si colloca nel limite massimo riportato nello standard di razza.

La conformazione morfologica è la stessa per tutti i soggetti, e questo è stato rilevato dall'analisi degli indici morfologici e delle diverse proporzioni analizzate, simili nei diversi gruppi. Quello che cambia è essenzialmente la taglia dell'animale.

Figura 16 – Esempio di dendrogramma ottenuto con la cluster analysis sulle misure morfologiche, per le femmine.

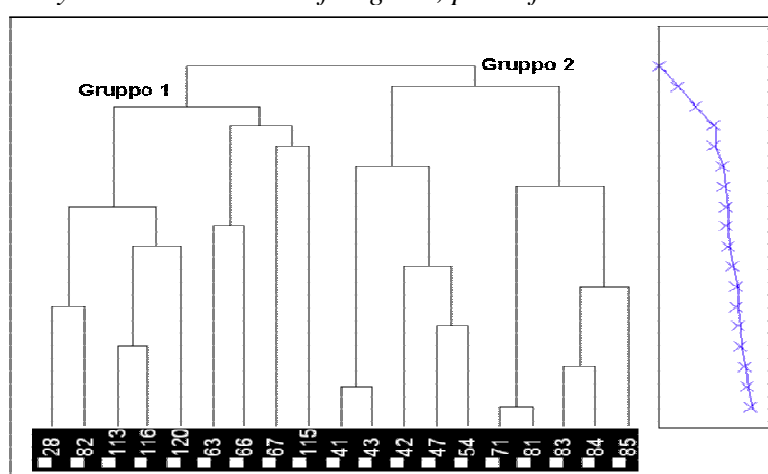
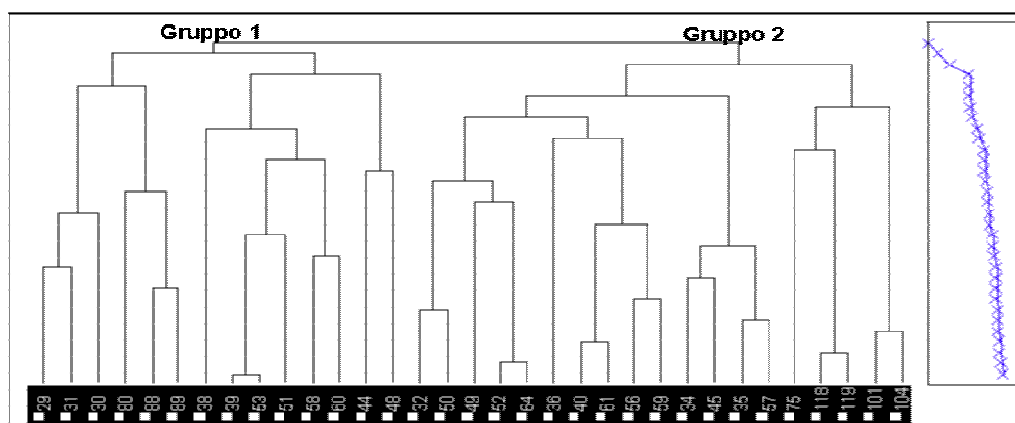


Figura 17 - Esempio di dendrogramma ottenuto con la cluster analysis sulle misure morfologiche, per i maschi.



6 Conclusioni e prospettive per la gestione della razza

Nonostante la scarsa numerosità (circa 646 cani come media annua), l'andamento delle iscrizioni annuali all'ENCI è crescente. La razza Bracco Italiano presenta un coefficiente di consanguineità medio che a partire dal 1995 non ha manifestato sostanziali variazioni, nonostante i valori piuttosto alti, compresi tra il 5 ed il 6%. La consanguineità dei soggetti con 14 generazioni tracciate è addirittura superiore al 6%.

Considerando sempre gli anni dopo il 1995, la velocità media annua dell'accrescimento della consanguineità pari allo 0,0455% si traduce in un incremento medio dell'1% in 22 anni (se invece facessimo riferimento al valore della velocità di accrescimento dello 0,163%, calcolato a partire dal 1970, lo stesso incremento medio dell'1% si otterrebbe in soli 6 anni).

Questi risultati, il valore dell'incremento di consanguineità per generazione pari a 0,39% ed i diversi valori calcolati di N_e ci confortano, ed indicano che attualmente la razza mantiene la sua vitalità e non è a rischio di estinzione. Secondo la guida FAO, infatti, per mantenere vitale la popolazione deve essere evitato un incremento della consanguineità per generazione superiore all'1% (che corrisponde ad un numero effettivo della popolazione di 50) (FAO, 1998).

L'aspetto negativo che scaturisce da questa analisi è che, oltre al valore piuttosto alto del coefficiente medio di consanguineità, tutti i nati a partire dal 2003 risultano consanguinei e pertanto è necessario tenere sotto controllo le variazioni del coefficiente di consanguineità e cercare di fare una maggiore attenzione nella gestione degli accoppiamenti per evitare un aumento eccessivo della consanguineità, superiore a quanto prevista su base statistica.

In particolare si è osservato negli ultimi anni la tendenza ad un aumento dei soggetti con coefficiente di consanguineità inferiore allo 0,05, e questo non può altro che essere considerato positivo. Purtroppo, però, sono aumentati anche i soggetti con un F superiore a 0,25, valore che scaturisce dall'accoppiamento di un genitore con il proprio figlio o dall'accoppiamento di due fratelli pieni.

Normalmente l'allevatore dovrebbe evitare di accoppiare tra loro parenti di primo o secondo grado (parenti stretti) per evitare di raggiungere un livello critico di consanguineità.

Sarebbe necessario controllare sempre il grado di parentela esistente tra due riproduttori, in quanto una gestione appropriata degli accoppiamenti potrebbe ridurre la consanguineità media nella popolazione e quindi aumentare la vitalità della stessa.

Per questo motivo è stato predisposto un servizio gratuito per gli allevatori che ne fanno richiesta, per il calcolo delle parentele tra due riproduttori precisando che la consanguineità di un soggetto non si trasferisce alla progenie se questo viene accoppiato ad un soggetto non parente: se due soggetti consanguinei ma non parenti vengono accoppiati la loro progenie avrà consanguineità zero e questo permetterebbe di ridurre drasticamente la consanguineità nella popolazione.

Un suggerimento che possiamo dare agli allevatori è quello di verificare il coefficiente di parentela e possibilmente accoppiare i soggetti con un valore inferiore a 0,05. Se questo dovesse assumere un valore maggiore di 0,10 (parentela additiva) evitare l'accoppiamento.

La ricerca ha permesso di evidenziare un gran numero di riproduttori che hanno inciso notevolmente sulla struttura genetica della razza, ma i riproduttori aventi il maggior peso genetico sono risultati essenzialmente tre, e precisamente Fer, Tano dell'Asolano e Tabar di Cascina Merigo.

Questi grandi stalloni non sono parenti, ma sono entrati nella genealogia di altri grandi stalloni quali Titano del Trovese (Tabar e Tano), Aiace di Cascina Croce (Fer, Tabar e Titano) ed in particolare Rodi di Cascina Croce, l'ultimo in ordine cronologico, nella cui genealogia sono presenti tutti gli altri stalloni.

Per quanto riguarda l'aspetto morfologico, i dati rientrano nei valori riportati nello standard di razza e

tutte le proporzioni sono rispettate tranne la lunghezza della groppa che risulta $\frac{1}{4}$ dell'altezza al garrese e non $\frac{1}{3}$ come invece riportato nello standard di razza.

Con l'impiego della Cluster analysis sono state rilevate due morfologie: una che rispecchia i valori medi e una con valori nel limite superiore.

Quanto ottenuto da questa ricerca è di fondamentale importanza e costituisce la base su cui costruire la conservazione ed il miglioramento genetico del Bracco Italiano. Una maggiore diffusione nella pratica delle registrazioni delle misurazioni somatiche (prese a diverse età) e delle performance di lavoro, in appositi registri tenuti in allevamenti, contribuirà sicuramente a favorire il lavoro di selezione insieme con l'uso di metodiche quantitative di valutazione dei riproduttori quali quelle in uso nelle specie da reddito.

Abbiamo parlato di selezione ma anche di conservazione, in quanto per il futuro della razza è di prioritaria importanza il monitoraggio ed il controllo dell'inincrocio. L'analisi molecolare ha infatti evidenziato una elevata omogeneità genetica degli animali campionati, rilevata sia come perdita di alleli in confronto ad un campione di cani di razze diverse utilizzato per la validazione dei microsatelliti tipizzati, sia come diminuzione dell'eterozigosità. Il dato molecolare conferma quindi un elevato livello di inincrocio del Bracco Italiano. Questo fenomeno è comune a tutte le razze canine mantenute da club di razza, che sono venute a costituirsi come popolazioni praticamente isolate le une dalle altre, con conseguente aumento dell'inincrocio per effetto del ridotto numero effettivo di individui e della selezione spinta dei riproduttori. Il confronto fra le razze non è ancora attuabile in modo esteso, in quanto la scelta dei marcatori e le tecniche di analisi devono ancora essere standardizzate a livello internazionale; i risultati della presente ricerca restano comunque validi come documentazione della variabilità genetica attualmente presente nella razza. Tali dati potranno essere confrontati sia con ulteriori analisi sulle nuove generazioni del Bracco Italiano, che la presente analisi suggeriscono di effettuare se non routinariamente almeno ad intervalli di pochi anni, sia con i dati analoghi che siano via via prodotti e pubblicati per altre razze canine.

Una delle applicazioni già ampiamente consolidate dell'analisi dei microsatelliti è l'attribuzione biologica di paternità/maternità. Da questo punto di vista l'analisi genetica ha mostrato in alcuni casi una discrepanza fra il grado di parentela desunta dalle genealogie del database elettronico e il livello di imparentamento risultante dai marcatori genetici. La determinazione delle effettive parentele biologiche fra gli animali animali non è obiettivo esplicito della presente ricerca; tuttavia l'evidenza sperimentale suggerisce che l'analisi del DNA può già essere uno strumento utilizzabile per una certificazione genetica dei pedigree di razza. Il valore aggiunto agli animali da tale certificazione è verosimilmente maggiore del costo della tipizzazione, che fra l'altro continua a diminuire per effetto del miglioramento delle tecniche di analisi. Una prospettiva concreta aperta dalla presente ricerca è quindi quella di suggerire al club di razza di procedere alla tipizzazione genetica degli animali iscritti all'ENCI o su una base di campionamento randomizzato o sulla base della richiesta degli allevatori.

Un'altra applicazione della tipizzazione genetica è la valutazione della combinabilità degli animali destinati all'accoppiamento. Il livello di variabilità genetica presente nel Bracco Italiano determinato nel corso della presente ricerca consente di determinare il livello di omozigosità di qualunque soggetto di interesse relativamente alla media della razza, anche in futuro (l'aumento dell'omozigosità misura direttamente il livello di inincrocio dei singoli soggetti). E' verosimile che i migliori riproduttori risultino mediamente più omozigoti della media per effetto della selezione spinta; una strategia di accoppiamento basata sull'analisi del DNA prevederebbe quindi di accoppiare fra loro i soggetti i cui profili genetici siano il più possibile diversi. Questa pratica utilizzerebbe sia il vantaggio dell'eterosi (aumento dell'eterozigosità della prole quando i riproduttori sono omozigoti per alleli diversi) sia il vantaggio di accoppiare fra di loro animali geneticamente molto eterogenei. Va tuttavia detto che i microsatelliti rappresentano un campione casuale del genoma dei singoli animali, ed è quindi soggetto

alle regole della fluttuazione stocastica. Lo studio della combinabilità degli animali attraverso l'analisi dovrà essere in futuro basato su un numero maggiore di microsattelliti rispetto a quelli utilizzati nella presente ricerca (oltre che all'utilizzo di altri marcatori genetici). I dati della presente ricerca costituiscono comunque una base utile per affrontare già ora tale problematica a livello sperimentale; il miglioramento delle tecniche di analisi e la diminuzione dei costi renderà peraltro praticabile un approccio di questo tipo nel corso dei prossimi anni.

7 Prodotti della ricerca

7.1 Archivio Genomico.

7.2 Caratterizzazione loci genetici.

7.3 Per programmare gli accoppiamenti volti a contenere o ridurre il valore di consanguineità sono stati consegnati alla SABI due programmi statistici per il calcolo dei coefficienti di parentela per coppie di animali:

- Software originale che individua il coefficiente di Kinship;
- Database preparato per l'analisi dei dati tramite programma statistico CFC, che calcola la parentela additiva tra gli animali.

7.4 Sono stati individuati i riproduttore aventi maggior peso genetico nella razza.

7.5 Archivio fotografico del Bracco Italiano, utile per il rilevamento dei dati morfologici tramite software. Sono stati fotografati 121 cani (56 femmine e 65 maschi).

7.6 Indice di selezione per l'Altezza al Garrese per i 70 animali per i quali è stata misurata l'altezza al garrese con il cinometro.

Qui di seguito vengono inserite delle tabelle riassuntive che riportano le analisi sui soggetti campionati.

Nome cane	LOI	Archivio Genomico	Tipizzazione Genetica	Archivio Fotografico	Mis. Diretta	Mis. Digitalizzata	I. Altezza Garrese	Valut. Giud./ Profilo genet.
MEDEA DI CASCINA CROCE	CI066139	X	X	X	X	X	X	X
ALBA DELL'ANGELO DEL SUMMANO	CI070844			X	X	X		
FURIA DI CASCINA CROCE	CI073351							
ULISSE DI COL PETROSA	CI073428	X		X	X	X		
LUNA	CI074277			X	X	X	X	
NELLA DELLE TERRE ALLIANE	LO00112549			X	X	X	X	
ALTHEA DEI SANCHI	LO0042631	X	X	X	X	X		
PICASSO DI CASCINA CROCE	LO0063825			X	X	X		
SELVA DI PALUDELONGA	LO0076540	X	X					X
IMPERATORE DEL CIGLIOLO	LO008735	X	X					X
LORY DELLA CROCCIA	LO01168513	X	X					
ZICO	LO01180720			X	X	X		
ARISTEO DELL'OLTREPO'	LO01184271	X	X					X
BRUNILDE	LO01186893	X	X					
AMBRO	LO01202567			X	X	X		
ISOTTA	LO0128886			X	X	X	X	
ROGOREDO DELLA BASSA BRIANZA	LO0141644			X	X	X	X	
AMELIA DELL'OLTREPO'	LO016318			X	X	X		
TIRANNO DELLA BASSA BRIANZA	LO02116476			X	X	X	X	
ORSO DELLA CROCCIA	LO02125337	X	X					
LUNA	LO02126233	X	X	X	X	X	X	
CETRA	LO02130572	X	X	X	X	X	X	
ZARA	LO02131690	X	X					
MALVASIA DI VILLA CARLA	LO02133298	X	X					X
BIMBA DI CASCINA CROCE	LO02142126			X	X	X		
PETRA	LO02144549	X	X					
ALEMANN0	LO02145002			X	X	X	X	
ARGO	LO02145003			X	X	X	X	
ASTRO	LO02145007			X	X	X	X	
ALBA	LO02145010			X	X	X	X	
ALMA	LO02145011			X	X	X	X	
AURORA	LO02145012			X	X	X	X	
POLCEVERA'S ALTHEA	LO02152720	X	X					
POLCEVERA'S ASIA	LO02152736	X		X	X	X		
RAMONA	LO022117440			X	X	X		
AFRICA	LO0235798	X	X	X	X	X	X	
PONGO DI MONTERICCO	LO0248075	X	X					
UBALDO DI COL PETROSA	LO0251806			X	X	X		
BUBUL	LO0253285	X	X	X	X	X	X	
ATENA DI CASCINA CROCE	LO0271922			X	X	X		
MALGA DELLA CROCCIA	LO0277740	X	X					
POMONA DEI BRICCHI	LO0290119	X		X	X	X	X	
PLUTONE DEI BRICCHI	LO0290122			X	X	X		
PAUSO DEI BRICCHI	LO0290126	X	X	X	X	X	X	X
AMOR TREBISONDA	LO0291948	X	X					X
QUASIMODO DI CASAMASSIMA	LO03104705	X	X					X
POLCEVERA'S BELNALDA	LO03105559	X	X	X	X	X		
WINNIE DELLE TERRE ALLIANE	LO03108424	X	X	X	X	X	X	X

Nome cane	LOI	Archivio Genomico	Tipizzazione Genetica	Archivio Fotografico	Mis. Diretta	Mis. Digitalizzata	I. Altezza Garrese	Valut. Giud./ Profilo genet.
BRAK DI CASCINA CROCE	LO03129935	X	X	X	X	X		
MIKINOS	LO03138104	X	X					
KEA	LO03138108	X		X	X	X	X	
ATTENTATION DELLA CROCCIA	LO03147230	X	X					
ZARA	LO03153789			X	X	X		
CARUSO DI CASCINA CROCE	LO03159281			X	X	X	X	
PEPPA DEL BOSCACCIO	LO0333331	X	X					X
OTELLO	LO0339126	X	X					
TOLDO DEI SANCHI	LO0367181	X	X					
FESSA DELL'OLTREPO'	LO0370025	X	X					
SHARONSTONE DELLA CROCCIA	LO0373117	X	X					
DALI DEL CIGLILOLO	LO0376726	X	X					X
FURIA D CASCINA CROCE	LO037808			X	X	X	X	
TUTA DI CASCINA CROCE	LO037811	X	X					
TEA DI CASCINA CROCE	LO037842			X	X	X		
TINA DI CASCINA CROCE	LO0383774			X	X	X		
POLCEVERA'S CONTE	LO0397937	X	X	X	X	X		X
CERES	LO0397939			X	X	X	X	
POLCEVERA'S CIRCE	LO0397946			X	X	X	X	
GRECO	LO04107549			X	X	X	X	
DIVA TREBISONDA	LO04134343			X	X	X	X	
TARAMOT DI MONTERICCO	LO0420941	X	X					
TEMA DI CASCINA CROCE	LO0423592			X	X	X		
SATURNINO DI CASCINA CROCE	LO043529			X	X	X	X	
ADONE D'ALERIA	LO0458672	X		X	X	X	X	
NIKE DELLA LEONILDA	LO0464372	X	X					
XERES DELLE TERRE ALLIANE	LO047135	X		X	X	X	X	
AGATA	LO0474338	X	X					X
BRICK DEL GUA'	LO0477636			X	X	X		
BULLO	LO0495100			X	X	X	X	
SIRIO	LO0498752			X	X	X		
FEDRA DI CASCINA CROCE	LO0510460	X	X					X
BOSCO	LO05105330			X	X	X	X	
CIRANO DI COLPETROSA	LO05109935			X	X	X		
QUENTA	LO05116967			X	X	X	X	
AMBRA TREBISONDA	LO05118349	X	X					
ROVO DEI BRICCHI	LO05121787			X	X	X	X	
ARNO	LO05122858			X	X	X		
FER	LO0514012			X	X	X	X	
VIENNA DELL'OLTREPO'	LO0516237	X	X	X	X	X		
BUDAPEST DELL'OLTREPO'	LO0516242	X	X	X	X	X		
BALTICO DELL'ANGELO DEL SUMMANO	LO0525760	X	X					X
VAMOS	LO0528903			X	X	X		
DELLE DUE SICILIE CATALANESCA	LO0533070	X	X					
BRINA	LO0564672	X		X	X	X	X	
DIANA DI MONTERICCO	LO0572335	X		X	X	X		
POLCEVERA'S ISIDORO	LO0575406			X	X	X	X	
UAPPA DI PALUDELONGA	LO0578962	X	X					X

Nome cane	LOI	Archivio Genomico	Tipizzazione Genetica	Archivio Fotografico	Mis. Diretta	Mis. Digitalizzata	I. Altezza Garrese	Valut. Giud./ Profilo genet.
CAMILLA	LO058483	X	X	X	X	X	X	
PAOLO DEI SANCHI	LO0589707	X	X					
ZENO	LO0597160	X	X					X
DESERTO DI COLLE OLIVA	LO06103410	X	X					
TARQUINIA DELL'OLTREPO'	LO06117516			X	X	X		
POLCEVERA'S URAGANO	LO06117820	X		X	X	X	X	
GIM DI CASCINA CROCE	LO06131278	X	X	X	X	X	X	
GRISU' DI CASCINA CROCE	LO06131279	X	X					
ORIONE DI CASCINA CROCE	LO06131281			X	X	X		
GASTONE DI CASCINA CROCE	LO06131300			X	X	X	X	
PRIMO DI CASCINA CROCE	LO06131307	X		X	X	X		
OTTONE DI CASCINA CROCE	LO06131314	X	X					
FEBO DI CASCINA CROCE	LO06131315			X	X	X	X	
TIMBA DEI SANCHI	LO061759	X	X					X
VICTOR DELL'ANGELO DEL SUMMANO	LO0622041	X	X					X
AMOR TREBISONDA	LO0627184	X	X					X
ARPA	LO0627390			X	X	X	X	
URANIA DELLA CROCCIA	LO0630363	X	X					
TUNDRA	LO0634264	X	X					
FRATE	LO0634266	X		X	X	X		
OMBRA	LO0637294			X	X	X	X	
BRIGLIA	LO0637659	X	X	X	X	X	X	
POLCEVERA'S MORENA	LO0646986	X		X	X	X	X	
POLCEVERA'S MEGAN	LO0646987	X		X	X	X	X	
ARCO DEI SANCHI	LO0654028	X	X					
MARTINO	LO0655346			X	X	X	X	
TONI TREBISONDA	LO0668341	X	X					
ACHILLE	LO0681969	X	X	X	X	X	X	
POLCEVERA'S RAIMONDO	LO0682959			X	X	X	X	
AVOCAT DELLA BASSA BRIANZA	LO0687681	X	X					
GILDA	LO0689554			X	X	X	X	
AGAMENNONE DI CASCINA CROCE	LO0691898	X		X	X	X	X	
AIACE DI VILLA CARLA	LO0714674			X	X	X	X	
GIONNI 2 TREBISONDA	LO071755	X	X					
GINA DI MONTERICCO	LO0719428	X	X					
CARMEN	LO072355			X	X	X	X	
RENO DELLA VAL CECINA	LO0727661	X		X	X	X		
TEO	LO0729555			X	X	X		
ASTORE DI CASCINA CROCE	LO0733891	X	X	X	X	X		
POLCEVERA'S QUERIDA	LO0734227	X	X					
CHARLY	LO0737162	X	X					
INDIAN	LO0740699	X	X					X
BOBO	LO0741487	X		X	X	X	X	
BERTO	LO0741489			X	X	X	X	
BELLA	LO0741490			X	X	X	X	
BRINA	LO0741493			X	X	X	X	
AMBRA TREBISONDA	LO0753107	X	X					
TALAMONE	LO0763818	X	X	X	X	X	X	

Nome cane	LOI	Archivio Genomico	Tipizzazione Genetica	Archivio Fotografico	Mis. Diretta	Mis. Digitalizzata	I. Altezza Garrese	Valut. Giud./ Profilo genet.
ZARA	LO0766843			X	X	X		
CAROL DE GUÀ	LO077514			X	X	X		
DRAC DEL GUA'	LO077521			X	X	X		
GIORGIA TREBISONDA	LO0776177	X	X					
POLCEVERA'S TUIA	LO07763816			X	X	X		
TORO DELL'OLTREPO'	LO0778634	X	X	X	X	X		
CALISTO	LO0778869	X	X	X	X	X	X	
POLCEVERA'S CIRCE	LO0779817	X						
POLCEVERA'S BRANDO	LO0779827	X		X	X	X		
ALCEO	LO0789066			X	X	X		
GUIA	LO0826871			X	X	X	X	
ZORBA DI CASAMASSIMA	LO0870304			X	X	X	X	
DIAMANTE	LO9827008	X	X	X	X	X	X	
ASTA DEI SANCHI	LO9877653	X	X	X	X	X		
LODULA DEL BOSCACCIO	LO9884691	X	X					
ARGINE DELL'OLTREPO'	LO99155957	X	X	X	X	X	X	
TITO	LO99170214	X	X	X	X	X	X	X
VENTO DI CASCINA CROCE	LO9917172323			X	X	X		
BOOK				X	X	X		
POLDO		X		X	X	X	X	
EDI				X	X	X	X	
ALTEA DEI TORI		X		X	X	X		
ARNO				X	X	X		
PUL				X	X	X	X	
LATINA				X	X	X	X	
URANO DEI SANCHI				X	X	X		
PENI				X	X	X	X	
GERBA				X	X	X	X	
ALDO				X	X	X		
LAICA DI CASCINA CROCE				X	X	X		
Totale		97	77	120	120	120	70	22

- In genetica, per **ALLELE** si intende ogni forma vitale di DNA codificante per lo stesso gene: in altre parole, l'allele è responsabile della particolare modalità con cui si manifesta il carattere ereditario controllato da quel gene. Ad esempio, un gene che controlla il carattere "colore degli occhi" può esistere in due alleli (cioè in due forme alternative): l'allele "occhio chiaro" e l'allele "occhio scuro". Occorre precisare che con allele si può indicare anche il diverso polimorfismo che un locus non codificante può avere.

Ciascun individuo definito diploide, come gran parte dei viventi, possiede per ciascun carattere, ovvero per ciascun gene, due alleli, ossia due copie; ognuno dei due alleli è presente su uno stesso locus (posizione), su ciascuno dei due cromosomi che costituiscono, nella cellula, una coppia di omologhi. Se sui cromosomi omologhi è una duplice copia dello stesso allele, si dice che l'individuo è omozigote per quel carattere; se gli alleli sono differenti, l'individuo è detto eterozigote. Ogni carattere, all'interno di una popolazione, può essere rappresentato anche da molti alleli (sebbene ogni individuo ne possa portare solo due).

L'insieme degli alleli presenti in una popolazione è detto pool genico. La variabilità della frequenza con cui gli alleli compaiono nel pool è l'oggetto di studio della branca della genetica detta genetica di popolazione. Non tutti gli alleli determinano un effetto visibile nell'individuo che ne è portatore. Se il carattere da essi controllato si manifesta, si parla di alleli dominanti; in caso contrario si parla di alleli recessivi. Un individuo può essere quindi omozigote dominante, se possiede due alleli dominanti; eterozigote, se possiede due alleli differenti; omozigote recessivo, se possiede entrambi gli alleli recessivi. Un allele dominante sarà espresso sempre, anche se l'individuo è eterozigote. Un allele recessivo potrà essere espresso solo in individui omozigoti recessivi. L'insieme dei caratteri visibili in un organismo prende il nome di fenotipo, mentre l'insieme del suo corredo di geni (comprendente quindi alleli dominanti e recessivi) è detto genotipo. Per convenzione, gli alleli sono indicati da una singola lettera, maiuscola per indicare l'allele dominante (ad esempio A) e minuscola per l'allele recessivo (ad esempio a). Gli eterozigoti (Aa) e omozigoti (AA) per un determinato gene hanno un fenotipo A, poiché mostrano l'effetto dell'allele dominante, mentre gli omozigoti (aa) mostrano l'effetto dell'allele recessivo e hanno fenotipo a.

- **COEFFICIENTE DI KINSHIP**: Fa riferimento a due individui diversi, e misura la probabilità che due alleli dello stesso locus scelti a caso, uno per ciascuno dei due soggetti, siano identici per discendenza.

- **COEFFICIENTE DI ININCROCIO** (inbreeding, consanguineità): Fa riferimento al singolo individuo, e misura la probabilità che un soggetto sia omozigote per un allele identico per discendenza. Il coefficiente di inincrocio di un individuo è uguale al coefficiente di kinship dei suoi genitori.

- **COEFFICIENTE DI PARENTELA** (relatedness): Fa riferimento a due individui diversi, e misura la probabilità che essi condividano un allele identico per discendenza sull'uno o sull'altro dei due cromosomi omologhi. Il coefficiente di parentela è il doppio del coefficiente di kinship.

- **EREDITABILITA'**: indice di trasmissibilità di un carattere quantitativo (h^2) e descrive il contributo relativo degli effetti genici riproduttivi o additivi (V_A) alla varianza fenotipica totale del carattere (V_P).

- In genetica, si definisce **ETEROZIGOSI**, la condizione genetica di una cellula o di un organismo costituita dalla presenza di una coppia di alleli diversi per un dato gene; gli alleli occupano gli stessi loci sui cromosomi omologhi corrispondenti

- **L'INTERVALLO DI GENERAZIONE (L)** è il tempo che intercorre tra la nascita di un riproduttore e quello dello stesso sesso che lo sostituisce.

- Il **GENE** è l'unità ereditaria degli organismi viventi. I geni sono contenuti nel genoma di un organismo, che può essere composto di DNA o di RNA, e dirigono lo sviluppo fisico e comportamentale dell'organismo. La maggior parte dei geni codifica proteine, che sono le macromolecole maggiormente coinvolte nei processi biochimici e metabolici della cellula. Molti geni non codificano proteine, ma producono RNA non codificante, che può giocare un ruolo fondamentale nella biosintesi delle proteine e nell'espressione genica.

- In biologia e in computazione evolutiva, il termine **LOCUS GENICO** (o può semplicemente LOCUS, plurale loci) designa la posizione di un gene o di un'altra sequenza significativa all'interno di un cromosoma.

- **IL NUMERO EFFETTIVO DEI FONDATORI (f_c) ED IL NUMERO EFFETTIVO DEGLI ANTENATI (f_a)**. Il primo rappresenta il numero dei fondatori che hanno contribuito in eguale misura e che ci aspettiamo che riproducano sempre la stessa diversità genetica.

Il secondo parametro (f_a) è il numero minimo di antenati, non necessariamente fondatori, che spiega la completa diversità genetica in una popolazione. Questo parametro non tiene completamente conto della perdita dei geni casuale dagli antenati alla popolazione di riferimento, ma completa l'informazione data da f_c in quanto tiene in considerazione la perdita di variabilità genetica prodotta da un uso sbilanciato dei riproduttori determinata dal "collo di bottiglia".

- **IL NUMERO EFFETTIVO DELLA POPOLAZIONE (N_e)**. Definisce il numero degli animali in allevamento che potrebbero incrementare la consanguineità se essi contribuissero ugualmente alle generazioni future.

- **L'OMOZIGOSI**, in contrapposizione all'eterozigosi, è la condizione genetica di una cellula o di un organismo costituita dalla presenza di alleli identici per un dato gene.

- Il termine **POLIMORFISMO** indica l'esistenza in una popolazione di più di un allele per un dato locus con frequenza superiore all'1%.

- **PARENTELA**: è la probabilità che 2 individui abbiano nel loro patrimonio genetico copie identiche dello stesso allele derivanti da un antenato comune.

- **PROGRESSO GENETICO**: Progresso Genetico per generazione o Incremento Genetico (ΔG) o Risposta alla Selezione (R) di una popolazione per un determinato carattere quantitativo è dato da prodotto del Differenziale produttivo per l'ereditabilità.

9 METODOLOGIE DI ANALISI

9.1 Analisi dei dati Molecolari

9.1.1 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA da tutti i campioni di sangue (circa 5 ml di ciascun campione) si è proceduto nel seguente modo:

A) pellet di linfociti. Dall'intero campione di sangue si sono separati i linfociti mediante aggiunta di un volume pari a tre volte quello del sangue di TE 20:5 (TRIS-EDTA) e successiva centrifugata a 3500 rpm per 15 min. Tale operazione è stata ripetuta fino a che il pellet di linfociti non è apparso privo il più possibile di globuli rossi.

B) digestione con Proteinasi K. Ciascun pellet di linfociti ottenuto è stato incubato over-night a 58° C con 14 ml di GHCL (Guanidine-Hydrochloride 6M), 1 ml di AcNH₄ (Acetato d'ammonio 7,5 M), 1 ml di NLS (N-Lauryl-Sarcosine al 20%) e 100 μ l di Proteinasi K (20 mg/ml).

C) precipitazione del DNA. A ciascun pellet di linfociti dopo digestione, sono stati aggiunti circa 30 ml di Etanolo Assoluto (100%) freddo. Dopo miscelazione e formazione della nubecola di DNA, ciascuna è stata ripescata con una pasteur, lavata più volte in Etanolo 70% e quindi sciolta in una quantità appropriata di acqua per biologia molecolare.

D) conservazione DNA. I campioni di DNA così ottenuti sono stati conservati a -20°C. Un'aliquota è stata portata alla concentrazione di lavoro di 20 ng/ μ l.

Sono state quindi messe a punto tre multiplex (due eptaplex e una octaplex) di 22 marcatori STR provenienti dal panel raccomandato per i due ISAG "Canine Comparison Test" 2006 e 2008.

Per convenzione si è scelto di marcare con il fluorocromo specifico i Primers Forward per ciascun microsatellite.

I Primers per l'analisi dei microsatelliti sono stati forniti dall'Applied Biosystems in forma liofilizzata e per un quantitativo complessivo di 80 pmoli. Ciascun Primer è stato risospeso e diluito in H₂O ad una concentrazione finale di 100 μ M (800 μ l di H₂O). Da ogni stock di Primer (100 μ M) è stata successivamente effettuata la diluizione finale di lavoro pari a 10 μ M.

Le multiplex di amplificazione sono riportate di seguito:

MULTIPLEX A

6,25 μ l di MasterMix (Qiagen)

0,1 μ l di (10 μ M) di AHT121 marcato col 6-FAM (blu)

0,1 μ l di (10 μ M) di AHT121

0,1 μ l di (10 μ M) di REN54P11 marcato col 6-FAM (blu)

0,1 μ l di (10 μ M) di REN54P11

0,1 μ l di (10 μ M) di AHTK253 marcato col 6-FAM (blu)

0,1 μ l di (10 μ M) di AHTK253

0,1 μ l di (10 μ M) di CXX279 marcato col NED (giallo)

0,1 μ l di (10 μ M) di CXX279

0,1 µl di (10µM) di FH2054 marcato col NED (giallo)
0,1 µl di (10µM) di FH2054
0,1 µl di (10µM) di AHTK211 marcato con HEX (verde)
0,1 µl di (10µM) di AHTK211
0,1 µl di (10µM) di AHTH171 marcato con HEX (verde)
0,1 µl di (10µM) di AHTH171
1,35 µl di H₂O
1 µl di DNA (2 ng/µl)

MULTIPLEX B

6,25 µl di MasterMix (Qiagen)
0,1 µl di (10µM) di INU030 marcato col 6-FAM (blu)
0,1 µl di (10µM) di INU030
0,1 µl di (10µM) di INU055 marcato col 6-FAM (blu)
0,1 µl di (10µM) di INU055
0,1 µl di (10µM) di REN105L03 marcato col 6-FAM (blu)
0,1 µl di (10µM) di REN105L03
0,1 µl di (10µM) di AMELOGENINA marcata col NED (giallo)
0,1 µl di (10µM) di AMELOGENINA
0,1 µl di (10µM) di REN169018 marcato col NED (giallo)
0,1 µl di (10µM) di REN169018
0,1 µl di (10µM) di FH2848 marcato con HEX (verde)
0,1 µl di (10µM) di FH2848
0,1 µl di (10µM) di AHTH137 marcato con HEX (verde)
0,1 µl di (10µM) di AHTH137
0,1 µl di (10µM) di REN247M23 marcato con HEX (verde)
0,1 µl di (10µM) di REN247M23
1,15 µl di H₂O
1 µl di DNA (2 ng/µl)

MULTIPLEX C

6,25 µl di MasterMix (Qiagen)
0,1 µl di (10µM) di INU005 marcato col 6-FAM (blu)
0,1 µl di (10µM) di INU005
0,1 µl di (10µM) di REN169D01 marcato col 6-FAM (blu)
0,1 µl di (10µM) di REN169D01
0,1 µl di (10µM) di REN162C04 marcato col NED (giallo)
0,1 µl di (10µM) di REN162C04
0,1 µl di (10µM) di AHTH130 marcato col NED (giallo)
0,1 µl di (10µM) di AHTH130
0,1 µl di (10µM) di REN64E19 marcato con HEX (verde)
0,1 µl di (10µM) di REN64E19
0,1 µl di (10µM) di AHTH260 marcato con HEX (verde)
0,1 µl di (10µM) di AHTH260
0,1 µl di (10µM) di INRA21 marcato con HEX (verde)
0,1 µl di (10µM) di INRA21

1,35 µl di H₂O
1 µl di DNA (2 ng/µl)

L'analisi dei marcatori microsatelliti è stata condotta mediante multiplex-PCR utilizzando il kit commerciale: Multiplex PCR Kit (Cat. N° 206143, QIAgen).

Le reazioni di amplificazione in multiplex per un volume finale pari a 10 µl ciascuna, sono state effettuate seguendo un protocollo di amplificazione che prevede un ciclo di pre-denaturazione a 95°C per 15 minuti seguito da 35 cicli alle seguenti condizioni:

94°C per 30 secondi, 60°C per 90 secondi, 72°C per 60 secondi.

L'amplificazione è stata quindi completata da un'elongazione finale di 30 minuti a 60°C. Tali condizioni si sono rivelate ottimali per tutte le 3 reazioni di multiplex-PCR.

9.1.2 Analisi degli amplificati

Una quantità di amplificato pari a 0,6 µl viene preparata con 12,5 µl di formammide denaturante e 0,5 µl di standard di corsa ROX-500 (Applied Biosystems) in provette da 0,5 ml.

I campioni vengono denaturati per 5 minuti a 95°C e caricati sul sequenziatore automatico ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Lo strumento sottopone il campione ad elettroforesi capillare e, attraverso un fascio laser accoppiato ad un sistema ottico, acquisisce il segnale di fluorescenza dell'amplificato marcato e dello standard di corsa costituito da porzioni di DNA di taglia nota.

Il computer dotato di software dedicati (Genescan 2.1 e Genotyper 2.0, Applied Biosystems), elabora il dato grezzo e restituisce la taglia del frammento oggetto di studio.

Il tempo di durata di ciascuna corsa è stato esteso a 28 minuti per permettere a tutti i frammenti di essere analizzati.

Il modulo e la matrice utilizzati sono la D.

Problematiche riscontrate

- AHTH171 (Mix A)
- REN105L03 (Mix B)
- AHTH130 e AHTH260 (Mix C)

Questi marcatori hanno mostrato problemi di amplificazione per interferenza degli altri marcatori presenti nelle loro Multiplex che non hanno dato alcun problema.

Questi marcatori sono quindi stati analizzati in singolo, ovvero in una reazione di simplex PCR, utilizzando come polimerasi la GoldTaq (Applied Biosystems)

Le condizioni di PCR per le analisi in singolo sono le seguenti:

ciascuna reazione è stata realizzata in un volume finale di 10 µl, in una miscela contenente 2 ng di DNA genomico (1 µl), 0,5 µl di Primer forward (10 µM) ed una pari quantità del primer reverse, 1,2 µl di una soluzione 100µM di dNTP, 1µl di buffer 10X fornito unitamente alla Taq Gold polimerasi 5U/µl (Applied Biosystems), utilizzata in una quantità di 0,1µl nella reazione.

Il tutto portato a volume con 5,7 µl di H₂O.

Il reazione di amplificazione ha previsto un ciclo di pre-denaturazione a 95°C per 15 minuti seguito da 35 cicli alle seguenti condizioni:

95°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 45 secondi.

L'amplificazione è stata quindi completata da un'elongazione finale di 10 minuti a 72°C.

9.2 ELABORAZIONI STATISTICHE PER L'ANALISI DEI DATI MOLECOLARI

L'elaborazione dei dati molecolari ha previsto la determinazione dei parametri classici di popolazione. Mediante il software Arlequin sono stati calcolati l'eterozigosità osservata e attesa e la significatività della differenza tra questi valori (deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg per ogni marcatore). Il numero di alleli per marcatore sono stati calcolati per conteggio diretto. Dal numero di alleli condivisi tra i soggetti sono state calcolate le similarità genetiche come parametro di omogeneità di popolazione.

Analisi dei marcatori

Per la valutazione del comportamento dei marcatori prescelti nelle popolazioni oggetto di studio, sono stati considerati i seguenti parametri:

- mediante il software Arlequin è stata testata la presenza di linkage disequilibrium tra coppie di marcatori.

Software utilizzati

Arlequin: si tratta di un software reperibile online che svolge analisi di genetica di popolazione. Utilizza dati aploipici o genotipici relativi a sequenze o marcatori. Le funzioni utilizzate nel corso di questo studio sono:

- Linkage disequilibrium: testa la presenza di associazioni tra coppie di loci. L'algoritmo utilizzato compara la probabilità di riscontrare un certo genotipo di un campione sotto l'ipotesi di assenza di associazione tra loci, con quella del campione in presenza di associazione. La significatività del rapporto tra questi valori è testata mediante l'uso di permutazioni (Slatkin e Excoffier, 1996).

Molkin: Le funzioni primarie eseguite da MolKin sono il calcolo del molecular coancestry coefficients (f_{ij}) intra popolazione (Caballero e Toro 2002), la distanza (D_k) di kinship a livello di popolazione. Il molecular coancestry tra due individui, i and j , è la probabilità che due alleli dello stesso locus in due individui siano identici per stato (Caballero and Toro 2002; Eding and Meuwissen 2001). Il molecular coancestry di un individuo i con se stesso è il self-coancestry (chiamato s_i), che collegato al coefficiente di inbreeding (F_i) dell'individuo i che è dato dalla formula $F_i = 2s_i - 1$. La distanza di kinship (chiamato D_k) tra due individui i and j è $D_k = [(s_i + s_j)/2] - f_{ij}$ (Caballero and Toro 2002). MolKin determina il molecular coancestry tra e intra razza e il D_k facendo la media semplicemente dei valori corrispondenti per tutte le coppie di individui intra o tra popolazioni.

9.3 ELABORAZIONI STATISTICHE PER L'ANALISI DEI DATI GENEALOGICI

Sono stati elaborati i dati presenti nel libro genealogico della razza canina Bracco Italiano. I dati, forniti dall'ENCI e riferiti al periodo 1970-Aprile 2007, sono stati elaborati con i programmi ENDOG (Gutiérrez e Goyache, 2005, ver. 4.0), CFC (Sargolzaei et al., 2006), JMP (2002) ed Microsoft Office EXCEL (2003) al fine di ottenere i parametri relativi alla struttura della popolazione, alla consanguineità e al numero di fondatori assoluti ed effettivi (f_t e f_e) e di ascendenti effettivi, le statistiche di natura demografica, e le rappresentazioni grafiche.

In particolare:

1) Il Programma Statistico CFC (Contribution, Inbreeding (F), Coancestry)

Questo programma statistico è stato utilizzato per:

- Analizzare la struttura generale del pedigree (n° maschi, n° femmine, soggetti con figli, soggetti senza figli, n° animali della "Reference Population", n° antenati, base della popolazione, coefficiente medio di consanguineità e parentela media);
- Individuare i soggetti consanguinei;
- Calcolare l'inincrocio medio, il numero dei soggetti consanguinei, l'inincrocio medio dei soggetti consanguinei con il valore minimo e massimo e questo all'interno dei principali allevamenti e per i soggetti suddivisi per anno di nascita.

2) Il Programma Statistico "Endog"

Con questo programma statistico sono stati calcolati i seguenti parametri demografici e genetici:

- Il numero effettivo dei fondatori (f_e) ed il numero effettivo degli antenati (f_a).
- Il numero effettivo della popolazione (N_e). Definisce il numero degli animali in allevamento che potrebbero incrementare la consanguineità se essi contribuissero ugualmente alle generazioni future.
- Completezza del pedigree. Al momento del calcolo dei coefficienti di F e AR. Endog calcola per ogni individuo il numero delle generazioni tracciate, il numero massimo ed il numero minimo delle generazioni tracciate e le equivalenti generazioni complete per ogni animale. L'ultimo parametro è calcolato come la somma di tutti gli antenati conosciuti corrispondenti a $(1/2)^n$ dove n è il numero delle generazioni che separano il soggetto dal proprio antenato conosciuto.
- Calcolare l'inincrocio medio, il numero dei soggetti consanguinei, l'inincrocio medio dei soggetti consanguinei e la kinship per generazione tracciata.

3) Il programma JMP.

Con questo programma sono state effettuate le statistiche di natura demografica come il numero delle iscrizioni annuali e per allevatore ed il numero di figli per riproduttore.

4) Il programma EXCEL.

Questo programma è stato utilizzato per costruire le figure ed i grafici riportati nel testo.

9.4 ELABORAZIONI STATISTICHE PER L'ANALISI DEI DATI MORFOLOGICI

a) *Misure rilevate in campo:* Le differenze morfologiche tra i sessi sono state saggiate tramite ANOVA considerando come effetti fissi il sesso ed il misuratore e come covariata l'età del cane al momento della misurazione.

Misurazioni effettuate con il software: il modello matematico utilizzato è stato lo stesso con esclusione

dell'effetto misuratore (per unico operatore).

b) Per calcolare le relazioni tra i diversi parametri sono state utilizzate le correlazioni semplici.

c) *Riproducibilità* delle misurazioni effettuate con il software rispetto alla misura analitica: l'altezza al garrese è stata utilizzata come misura di prova.

La riproducibilità è il grado di concordanza tra due misure di uno stesso misurando effettuate in condizioni diverse, in questo caso con metodiche diverse (misura analitica e software).

Per questa analisi è stato impiegato un modello per misure ripetute.

d) Dai dati rilevati tramite software ed i dati lineari sono stati poi calcolati alcuni indici morfologici:

- Indice di conformazione laterale del corpo (ICLC = Altezza al garrese *100/ Lunghezza del Tronco);
- Indice corporale relativo (ICR = Lunghezza del tronco*100/Circonferenza del torace).

Usando come confronto lo standard di razza sono state calcolate le seguenti proporzioni:

- Lunghezza del tronco-altezza al garrese;
- Lunghezza della testa- altezza al garrese;
- Lunghezza groppa – altezza al garrese.

e) *Calcolo dell'Indice Genetico "Altezza al Garrese"*.

A partire dai dati raccolti per le misure biometriche e di quelli del libro genealogico, è stato stimato il valore genetico dei soggetti analizzati per l'altezza al garrese, misurata tramite cinometro. Ogni allevatore potrà eventualmente avere gli indici dei propri animali.

Ogni allevatore potrà fare determinati accoppiamenti per raggiungere, nella progenie, quei dati biometrici desiderati. Ad esempio un allevatore che ha un soggetto femminile basso al garrese, potrà consultare gli indici dei soggetti maschili disponibili per l'accoppiamento in modo da selezionare quello che trasmette un'altezza al garrese al di sopra della media.

Può quindi essere calcolato un Indice Pedigree per i figli risultanti da tale accoppiamento tramite la formula:

Indice_{Pedigree} di un figlio = $\frac{1}{2}$ Indice_{padre} + $\frac{1}{2}$ Indice_{madre}

f) Al fine di stratificare la popolazione in eventuali differenti gruppi morfologici, è stata applicata la Cluster Analysis considerando le misure morfologiche analitiche separate per entrambi i sessi. Successivamente, è stata applicata una nuova Cluster Analysis, sempre a sessi separati, che ha considerato tutte le misurazioni, sia quelle analitiche che quelle calcolate tramite software, precisando che per l'altezza al garrese è stata considerata soltanto quella misurata con software.

10. Pubblicazioni inerenti la ricerca

Cecchi F., Ciampolini R., De Sanctis B., Casetti F., Presciuttini S., (2008). The trend of the inbreeding during the time in “Bracco Italiano” dog breed. XXXI Conference of the International Society for Animal genetics, Amsterdam 20-24 Luglio 2008, Abstract n° 5036.

Ciampolini R., Cecchi F., Bramante A., Casetti F., De Sanctis B., Presciuttini S. (2008). Genetic characterization of the Bracco Italiano (Italian Hound) breed: first results on 22 STRs from the ISAG Canine Comparison Test. XXXI Conference of the International Society for Animal genetics, Amsterdam 20-24 Luglio 2008, Abstract n° 2205.

Cecchi F. Ciampolini R., Presciuttini S., Casetti F. (2008). The "Bracco Italiano" Genetic and Genealogical Study (BIGGS). EAAP2008 Vilnius, Lithuania 24-27 Agosto 2008, pag. 112.

Ciampolini R., Cecchi F., Bramante A., Casetti F., Fusetti F., Presciuttini S. (2009). Morphological characteristics of “Bracco Italiano” dog. XVIII NATIONAL CONGRESS ASPA, Palermo (Sicily, Italy) 9–12 June 2009