



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE VETERINARIE**

**DIRETTORE PROF. SALVATORE NAITANA
Docente Guida Prof. Giuseppe Massimo Vacca**

**INDIRIZZO: Riproduzione, produzione e benessere animale (XXIX CICLO)
ANNO ACCADEMICO 2015 – 2016**

ANALISI DEI POLIMORFISMI DEL GENE DELLA MIOSTATINA (*MSTN*) E LORO ASSOCIAZIONE CON LE PERFORMANCE DEL CAVALLO ANGLO ARABO DA CORSA

Tesi di dottorato della dott.ssa Emanuela Pira





Università degli Studi di Sassari
Corso di Dottorato di ricerca in
SCIENZE VETERINARIE

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze Veterinarie (Indirizzo: Riproduzione, produzione e benessere animale) dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2015/2016 - XXIX ciclo, con il sostegno di una borsa di studio cofinanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".

La tesi è stata prodotta, altresì, grazie al contributo della Fondazione di Sardegna.

*Si dice, ed è vero,
che i cavalli da corsa
camminano con le gambe,
galoppano coi polmoni,
resistono col cuore,
ma vincono col cervello.*

Federico Tesio

Indice

1	Introduzione	Pag.	1
1.1	Le origini del cavallo Anglo Arabo in Sardegna	”	1
1.2	L’angolo arabo: libri genealogici e caratteristiche di razza.	”	16
1.3	La miostatina (MSTN)	”	25
1.4	Variazioni della sequenza del gene MSTN in cavalli sportivi.	”	33
2	Scopo della ricerca	”	41
3	Materiali e metodi	”	43
4	Risultati e discussione	”	51
5	Conclusioni	”	76
6	Bibliografia	”	80

Ringraziamenti

1. Introduzione

1.1 Le origini del cavallo Anglo Arabo in Sardegna.

Il cavallo Anglo Arabo allevato in Sardegna, largamente diffuso nel territorio regionale e nazionale, è il frutto di un massiccio lavoro di selezione iniziato circa un secolo fa. Non si può trattare dell'attuale cavallo senza fare una premessa storica, che appare doverosa anche nei confronti di quanti, allevatori e tecnici del settore, hanno operato per ottenere i risultati che oggi giorno conosciamo.

Gli storici ritengono che sia stato importato in età nuragica (fra il 1500 e il 238 a.C.) dal Mediterraneo meridionale, a questo stesso periodo risale anche il suo addomesticamento ed era ascrivibile al tipo dell'*Equus caballus asiaticus* (Gratani L., 1988a). Tali ipotesi vengono confortate dall'assenza di reperti fossili e dalla scarsa presenza di reperti archeologici databili all'età nuragica. Gli storici concordano anche sul fatto che in Sardegna le condizioni ambientali favorevoli facilitarono la sua diffusione nonostante il suo impiego non risultasse molto diffuso, Fin dopo il 1000 d.C. infatti, possedere cavalli era un privilegio per pochi.

Un primo accenno di miglioramento di quello che possiamo chiamare cavallo sardo viene documentato a seguito delle prime incursioni saracene avvenute attorno all'anno 700. Questi infatti possedevano stalloni arabi, che nell'incrocio con le fattrici autoctone conferirono ai puledri nati una certa armonia e resistenza fisica. Tralasciando periodi scarsamente documentati dobbiamo giungere alla dominazione aragonese per poter

parlare di vero e proprio allevamento. Infatti, Ferdinando il Cattolico (1479-1516) impartì un impulso decisivo nell'allevamento degli equini in Sardegna. Impegno che fu successivamente portato avanti dai suoi successori. Risale a questo periodo l'istituzione di Tanca Regia, con funzione di scuderia della Casa Reale e si hanno documenti che attestano la presenza di prestigiosi allevamenti diffusi in tutta l'Isola.

Col passaggio della Sardegna alla casa Savoia (1720) iniziò un lento e progressivo decremento delle produzioni allevatoriali. Fu soppresso il deposito cavalli di Tanca Regia e altri depositi di stalloni operanti nel territorio. Questa fase portò sicuramente ad un peggioramento del livello qualitativo del cavallo sardo che, non più considerato una fonte di reddito, regredì nella selezione attuata fino a quel momento acquisendo tuttavia un'ulteriore resistenza fisica.

Le prime note descrittive degli allevamenti e dei loro prodotti in Sardegna risalgono alla metà del 1800. Mimaut, in *Histoire de Sardaigne*, distingue la popolazione equina sarda in tre tipologie: il cavallo rustico, la razza distinta e la razza nobile. Il primo di taglia molto piccola, poco superiore a 1.20 mt al garrese veniva adibito per i lavori agricoli e, quasi certamente, entro tale tipologia gli accoppiamenti erano occasionali senza nessun principio di miglioramento genetico. Le altre due tipologie risultavano invece più curate avendo come scopo ottenere un miglioramento della taglia e nell'armonia morfologica dei prodotti. Si riconosceva in questi soggetti un certo insanguamento derivato dal cavallo andaluso, introdotto

sul finire del 1600, ma in linea di massima si può affermare che sia i soggetti presenti in Sardegna sia gli stalloni che furono importati per gli incroci erano riconducibili al tipo orientale.

Un altro passaggio importante nella genesi del cavallo nell'Isola fu il programma del colonello Antioco Porqueddu. Quest'ultimo nel 1851 cercò di dar vita a un progetto che prevedeva il cavallo arabo come unico riproduttore maschio da incrociare con le fattrici indigene. Lo scopo del suo lavoro risiedeva nella riorganizzazione dell'allevamento al fine di poter soddisfare le richieste del mercato. Il progetto mirava in particolare ad una selezione che portasse alla nascita di una razza ben precisa e definita, data dall'incrocio di un gruppo scelto di fattrici indigene con pregiati stalloni arabi. Per questa nuova razza il Porqueddu proponeva il nome di "arabo-sarda" e anche l'istituzione di un libro genealogico regionale. Purtroppo tale progetto, per una serie di criticità nell'elaborazione dei programmi genetici sia per le difficoltà applicative ambientali, non risultò incisivo nel miglioramento della razza equina presente in Sardegna.

Nel 1874 la richiesta di cavalli per l'esercito portò la classe politica dirigente a cercare di migliorare la situazione del cavallo presente in Sardegna, proponendo normative per incentivarne l'allevamento. Tra queste risulta di notevole importanza il trasferimento, da Pisa ad Ozieri, di un distaccamento del deposito stalloni, che nel 1886 diventerà sede definitiva in Sardegna.

Tale deposito pur con vari cambiamenti statutari e di dipendenza ha

rappresentato un punto di riferimento per l'allevamento e la selezione del cavallo in Sardegna ed è tutt'ora operativo.

Deodato Meloni in "Indirizzo Ippico in Sardegna" afferma che dal 1874 al 1936 operarono ad Ozieri e nelle diverse stazioni di monta ben 603 stalloni di origine orientale o inglese. Da questi riproduttori si generò sicuramente il substrato di partenza della razza anglo araba in Sardegna. Per tutti questi anni si contrapposero a volte anche aspramente due scuole di pensiero sull'indirizzo selettivo da seguire: una tendenza prevedeva l'utilizzo di stalloni Purosangue Inglese e, all'opposto, vi era chi, giudicando questi ultimi come peggioratori di razza, proponeva il Purosangue Arabo come unico riproduttore maschio. In linea di massima fu la tendenza "arabista" a dominare nel mondo allevatorio, ma anche istituzionale, per circa il primo ventennio del '900.

Nel 1910 il capitano di cavalleria Eusebio Grattarola, direttore del Deposito Stalloni di Ozieri, favorito rispetto ai suoi predecessori da una conoscenza più appropriata del territorio, della società e dell'ambiente allevatorio sardo, ripropose l'uso di stalloni esclusivamente di origine orientale per la creazione di una razza sardo-araba. L'approvazione di tale progetto a livello ministeriale arriverà più tardi e diventerà operativo solo nel 1915. Sebbene non condiviso da tutti, tale programma getta sicuramente le basi della vera e propria selezione nell'ippicoltura sarda, nonché porterà all'allevamento isolano prestigio e vantaggi economici, con la produzione di soggetti particolarmente graditi all'esercito.

In sintesi la visione del Gattarola era quella di costituire un nucleo di circa 400 fattrici distinte in famiglie. Attraverso l'incrocio con stalloni capostipiti arabi, da tale nucleo, si sarebbe dovuto ottenere il tipo di cavallo che occorreva ai depositi Reali di stalloni. In particolare vennero individuati 6 paesi della Sardegna a cui destinare uno stallone. In seguito ci si rese conto che le sei stazioni di monta erano insufficienti a coprire il fabbisogno delle fattrici individuate e vennero portate a 15. Iniziò così la vera e propria fase operativa dell'evoluzione del cavallo sardo.

Per quanto riguarda il parco fattrici, invece, si arrivò alla scelta di 300 soggetti dopo un iniziale osservazione di oltre 3000 cavalle. Queste preservavano le caratteristiche di robustezza, forza e nevrilità, caratteristiche che il cavallo presente in Sardegna aveva e ha conservato nel tempo. Le femmine da destinare ai vari stalloni vennero scelte in base alla morfologia e, in particolare, all'affinità di queste ultime con lo stallone.

Non si può negare che il programma Grattarola avesse una certa genialità. Le stazioni di monta selezionate infatti hanno rappresentato un cardine e un punto di partenza ben preciso per l'evoluzione del cavallo in Sardegna. In tale lavoro vi è di fatto la base di quella che è la selezione, non solo genetica, ma anche morfologica e funzionale, e cosa ancor più importante si fissò per la prima volta una stabilità di rapporti tra gli allevatori e i tecnici ippologi.

Al progetto Grattarola, seppure da considerare all'avanguardia, si possono evidenziare alcune carenze date principalmente dall'indirizzo

strettamente arabista che influenzò in larga misura l'allevamento sardo. Tale indirizzo, che venne argomentato con ragioni di natura ambientale e soprattutto di mercato, mostrò abbastanza presto le limitazioni scaturite dalla rigidità dell'indirizzo. Infatti, se pur si ottenne un cavallo rustico con notevoli pregi dovuti alla sua nevrilità e alla sua resistenza, la taglia rimaneva comunque un handicap che addirittura mostrava segni di regressione rispetto al tipo precedente. Questa considerazione venne fatta anche alla luce del fatto che nei primi decenni del 1900 in tutta Europa, ma anche in Italia, si andavano sempre più diffondendo gli sport equestri. Nonostante la sua statura anche il cavallo sardo mostrò le sue doti atletiche ma il mercato, diventato sempre più esigente, richiedeva un diverso modello equino con soggetti di taglia più grande. Nello stesso periodo anche in Francia il cavallo Anglo Arabo si confermava nel settore sportivo quale cavallo di grande pregio.

Fu questo il momento in cui in Sardegna si accese un'attiva polemica riguardo l'indirizzo produttivo più vantaggioso da applicare. Alla luce delle nuove esigenze sportive e di mercato pareva cosa giusta e sensata dedicare maggior attenzione alla selezione delle fattrici ma, soprattutto, cambiare tendenza e introdurre l'uso di stalloni puro sangue inglese che avrebbero apportato sicuramente un miglioramento nella statura, nei diametri trasversi e nelle qualità atletiche in generale.

Sostenitore di questa tesi fu in particolare il dottor Antonio Demontis, ippologo e veterinario del Deposito stalloni di Ozieri. Il suo

pensiero era quello di introdurre il Purosangue Inglese, quale tipo mesomorfo, ovviamente da incrociare con cavalle scelte da un'apposita commissione in modo da apportare quei caratteri ricercati dal nuovo mercato senza compromettere le doti di rusticità e resistenza.

Nonostante ciò per l'introduzione del Purosangue Inglese si dovette attendere fino al 1935, anno in cui il consiglio di amministrazione del deposito cavalli stalloni di Ozieri decise a maggioranza l'introduzione di questa razza nelle stazioni di monta selezionate (Gratani L., 1988a).

Risulta importante ricordare che, in questi anni, nonostante l'indirizzo ufficiale fosse prettamente "arabista", l'allevamento di soggetti Anglo Orientali con influenze di sangue inglese continuò tacitamente. Tali incroci emergeranno più avanti con un ruolo sostanziale per la nuova selezione del cavallo Anglo Arabo che si impose.

Come è stato precedentemente accennato, in Italia e all'estero, si andavano sempre più diffondendo gli sport equestri. Nelle principali città italiane nascevano le varie società che organizzavano le corse al galoppo. Queste attività, visto il positivo riscontro di pubblico, divennero ben presto regolari e organizzate in riunioni di corse.

In diversi paesi della Sardegna, la tradizione contemplava corse e manifestazioni ippiche a carattere soprattutto religioso ma anche semplicemente ludico o, addirittura, goliardico. In particolare queste venivano svolte nelle strade principali del paese o in piste improvvisate o ancora intorno ai santuari. Tutto ciò a dimostrare che nella popolazione

risiedeva una forte passione per ciò che riguardava la tradizione delle corse, che sicuramente erano il richiamo principale di attrazione durante le feste.

Sul finire del 1800 si ricordano iniziative di diversi privati che organizzavano annualmente corse al galoppo nelle loro proprietà corse che per la prima volta, a differenza di quelle religiose, potevano godere, di una regolamentazione. Quindi, sebbene non venissero considerate degli eventi ufficiali, predisponendo di pubblico e di partecipanti fecero nascere l'idea di corse piane al galoppo.

L'esigenza di circuiti adatti a tali raduni si fece ancora più evidente nel 1910 a Sassari, quando venne realizzata una pista delimitata da steccati. In quella occasione, il già citato Eusebio Grattarola espresse il suo pensiero, rimarcando il fatto che tali manifestazioni avrebbero dovuto essere un riferimento per il miglioramento genetico. Nello specifico i risultati ottenuti dai diversi cavalli dovevano servire per trarre conferme, o meno, sulle linee di selezione.

Risale al 1920, ad opera del capitano Vanzì, consigliere della delegazione regionale della Società del Cavallo Italiano da sella, la prima proposta di organizzare delle prove funzionali e, unitamente a queste, programmare una corsa al galoppo. Il primo derby del cavallo sardo, riservato a puledri interi e puledre mezzo sangue nati in Sardegna nel 1918, da disputare sulla distanza di 2400 metri. I cavalli partecipanti potevano essere figli di stallone governativo o Puro sangue Anglo Arabo o Purosangue Arabo. Tale proposta l'anno seguente ricevette l'approvazione

da parte del Ministero dell'Agricoltura. Nonostante non si parlasse ancora di un vero e proprio ippodromo, sulla piana di Chilivani, venne realizzata una pista con fondo in erba di 1700 metri e delimitata da uno steccato in legno. Il 27 maggio del 1921 alla presenza del Re Vittorio Emanuele III di Savoia venne disputato il primo derby regionale sardo, cui seguirono altre gare, di fondo, destinate a cavalli di 4 anni e oltre. Vennero anche impartite istruzioni sulla modalità di iscrizione alle corse, sull'abbigliamento dei fantini e sui documenti genealogici da presentare. Tutti i quotidiani locali parlarono dell'evento e le cronache riferiscono di una giornata memorabile, con una tale affluenza di pubblico, proveniente da tutta la Sardegna, che si dovettero predisporre dei treni supplementari per poter esaudire tutte le richieste degli appassionati. Tale evento incise notevolmente sull'opinione pubblica da far accrescere il desiderio di intraprendere i lavori per la realizzazione sia una pista stabile sia per predisporre delle giornate di corse da ripetersi annualmente. Cresceva anche l'esigenza e la consapevolezza che la valorizzazione del cavallo sardo doveva per forza passare con il suo impiego in corse ufficiali. E' alla fine dello stesso 1921, che si registra un evento che rappresenta la pietra miliare della moderna ippica sarda: la stipula dell'atto costitutivo della Società Anonima Ippodromo Chilivani. Società che avrebbe curato l'organizzazione delle corse ma anche di fiere e mostre. Infatti, alle giornate di corse furono abbinate delle mostre di presentazioni dei puledri allo scopo di visionare e valorizzare i migliori soggetti e per invogliare gli allevatore a curare maggiormente i loro cavalli

ancor prima del debutto nelle attività sportive.

L'avvento delle corse al galoppo riaprì il dibattito sull'introduzione del Cavallo Purosangue Inglese nell'incrocio con le fattrici locali. L'ultimo soggetto inglese presente nel parco del Deposito Stalloni di Ozieri risaliva al 1918. Nell'ambiente allevatorio vi era notevole malcontento dovuto al fatto che alcuni soggetti presentati alle corse erano di dubbia genealogia. In particolare l'esame dei caratteri morfologici, lasciava il sospetto che per gli incroci fossero stati utilizzati riproduttori Purosangue Inglese. Dopo vent'anni di imposizione di sangue arabo sempre più allevatori chiedevano una riflessione sull'indirizzo produttivo fino ad allora seguito, asserendo che vi era la necessità di utilizzare il Purosangue Inglese come cavallo miglioratore, e non più l'arabo.

Bisogna attendere fino al 1937 per vedere la reintroduzione ufficiale del Purosangue Inglese e del meticcio Anglo Orientale nelle varie stazioni di monta. E questo a seguito di concessione del Ministero dell'Agricoltura che, in via sperimentale, acconsentì che un certo numero di fattrici prescelte venissero fatte riprodurre con lo stallone Rigogolo, arrivato dal Deposito Stalloni di Pisa. L'anno seguente furono importati altri 3 riproduttori Purosangue Inglese dando così inizio a un nuovo percorso storico dell'allevamento, caratterizzato dalla produzione anglo araba che tutt'ora, certamente migliorata e regolarizzata da vari passaggi soprattutto burocratici, risulta la linea di selezione seguita in Sardegna (Satta D., 2000).

Verso la metà del XX Secolo il Regio Deposito Stalloni, con una

legge regionale (legge n.30 del 14 novembre 1956), passa sotto il controllo della Regione Autonoma della Sardegna, con la denominazione di Istituto per l'Incremento Ippico della Sardegna. La Regione assumeva i poteri in merito a tutta la gestione e la programmazione dell'ippicoltura in Sardegna. È questo un momento politico in cui si cerca di favorire il miglioramento selettivo e il consolidamento delle strutture ippiche sarde.

Nel 1957 l'Istituto per l'Incremento Ippico della Sardegna intraprende un programma ad ampio raggio che, in particolare comprende l'incentivazione e il miglioramento dei cavalli Anglo Arabi fino ad allora selezionati. Vengono fissati dei punti cardine per quanto riguarda gli incroci da eseguire e le percentuali di sangue arabo e inglese che non devono essere superate. Per il calcolo della percentuale di sangue arabo, che deve essere compreso tra il 25% e il 75%, viene utilizzato il metodo Diffloth. Tale metodo consiste nel calcolo della media aritmetica ottenuta dalle percentuali dei genitori dove, ovviamente, viene attribuito il valore di 100 al Purosangue Arabo e di 0 al Purosangue Inglese.

Le fattrici da considerare in selezione vennero individuate dopo meticolosa valutazione di tipo genealogico, morfologico-funzionale e destinate ad accoppiamenti programmati e stabiliti da una commissione tecnica che decideva quale stallone fosse il più idoneo. In sede di valutazione iniziale venivano assegnati dei punteggi: solo i riproduttori che arrivavano a 70/100 venivano riconosciuti in selezione e iscritti negli appositi registri. Le fattrici con redo venivano valutate in sede di rassegne

annuali prestabilite. Per l'allevatore era obbligatorio presentare alla Commissione, pena l'esclusione dalla selezione, i prodotti fino all'età di 42 mesi. In questo modo si voleva attuare una massiccia pressione genetica per ritrovare nelle produzioni quelle caratteristiche di nevrilità, rusticità, resistenza e robustezza che hanno distinto e reso importante l'Anglo Arabo sardo. In particolare si pose l'attenzione sui rilievi di alcune misure biometriche quali: altezza al garrese, circonferenza toracica, perimetro dello stinco e lunghezza della spalla. Per incoraggiare gli allevatori furono anche istituiti, da parte della Regione Autonoma della Sardegna, dei premi in denaro di buon mantenimento nonché le monte gratuite alle fattrici selezionate. Infine nel 1962 venne svolto il primo Premio Regionale di Allevamento, tutt'ora in vigore, dove si prevedevano prove di modello e obbedienza volte a esaltare i soggetti migliori e a stabilirne la loro validità sportiva.

La data della nascita legale e ufficiale dell'Anglo Arabo sardo arriverà nel 1967, quando, il Consiglio di Amministrazione dell'Istituto per l'Incremento Ippico della Sardegna sancirà, attraverso una delibera, di definire e differenziare la produzione selezionata da quella comune. Con questa norma si stabilivano ufficialmente gli standard di razza e i requisiti, soprattutto genealogici, definendo come Cavallo Anglo Arabo Sardo quel soggetto proveniente dalla produzione selezionata in cui, nel certificato d'origine, verrà indicata la percentuale di sangue arabo posseduta. Più avanti, nel 1973, nell'articolo 7 del Regolamento del Libro Genealogico del

cavallo da Sella Italiano verrà definito “Anglo Arabo Sardo (A.A.S.) il prodotto derivante dall’incrocio, selezione e meticciamiento di Anglo Arabo Sardo con fattrici indigene e selezionate a fondo anglo-orientale e comunque con percentuali di sangue arabo non inferiore al 25%”.

Nel 1980 l’Istituto per l’Incremento Ippico della Sardegna chiarirà ulteriormente alcuni punti riguardanti l’allevamento in selezione, in particolare l’iscrizione dei soggetti al Libro Genealogico e i programmi di intervento per un ulteriore potenziamento delle produzioni. Risulta importante richiamare alcuni punti della delibera n.118. All’art. 3 venivano definite le 3 razze che potevano essere iscritte al libro di selezione: puledre Purosangue Arabo, puledre Anglo Arabo Sarde provenienti dall’allevamento in selezione e, infine, puledre provenienti dalla produzione comune sarda in cui fosse accertabile la genealogia almeno fino alla terza generazione. Nell’articolo 4 si riportavano i doveri dei proprietari/allevatori che intendevano iscrivere i loro prodotti ai libri di selezione. Questi, oltre che depositare il certificato di nascita e origine della cavalla in questione presso l’Ente Nazionale per il Cavallo Italiano, dovevano essere in possesso dei documenti necessari che dimostrassero la genealogia fino alla terza generazione. In altri articoli si faceva chiaro riferimento al fatto che i soggetti iscritti in selezione avrebbero dovuto possedere un libretto segnaletico con dati rilevati dai tecnici dell’Istituto per l’Incremento Ippico della Sardegna in sede di rassegna. Altri articoli chiarivano ulteriormente i doveri dell’allevatore in merito alla documentazione da richiedere e da

presentare al fine di ottenere l'iscrizione degli animali nella selezione. Per la prima volta in Sardegna venne anche introdotto l'obbligo di tipizzazione del sangue al fine di accertare la paternità e la maternità mediante i gruppi sanguigni (Gratani L., 1988b).

Nel 1995 la Regione Autonoma della Sardegna conferì all'Istituto per l'Incremento Ippico la piena titolarità delle funzioni sulla riproduzione equina. Si creò così la prima stazione di fecondazione artificiale equina dislocata nelle strutture di Ozieri e, in seguito, di Tanca Regia. Tale novità apportò sicuramente notevoli vantaggi nella produzione e selezione equina. In primis il fatto che la distribuzione del materiale seminale poteva essere effettuata in tutto il territorio regionale e, non meno importante, il fatto che stalloni di un certo valore genetico e sportivo potevano produrre un numero maggiore di puledri.

A conferma di quanto sia stato valido il lavoro compiuto dai tecnici del settore, in questi anni si iniziarono a cogliere i frutti di un'ottima selezione: cavalli Anglo Arabi nati e allevati in Sardegna vinsero importanti corse in Francia e nella penisola Italiana e si fecero favorevolmente notare anche nei premi nazionali di allevamento per la loro distinzione e armonia morfologica.

Tabella 1. Impiego di stalloni di diverse razze nella produzione dell'Anglo Arabo tra il 1968 e il 1988 (Gratani L. 1988b).

RAZZA STALLONI PER FATTRICI COPERTE					
ANNO	P.S.I	P.S.A.	A.A.	A.A.S.	TOTALE
1968	58	128	116	134	436
1969	69	115	112	161	457
1970	68	97	171	139	475
1971	57	96	143	201	497
1972	68	79	198	196	541
1973	78	30	201	177	486
1974	105	37	272	153	567
1975	113	24	293	175	605
1976	128	30	288	219	665
1977	116	43	283	243	685
1978	85	29	267	294	675
1979	98	46	267	285	696
1980	84	46	243	353	726
1981	80	28	233	387	728
1982	42	12	261	385	701
1983	87	37	230	407	761
1984	53	29	356	351	789
1985	77	37	331	368	815
1986	87	84	409	308	888
1987	125	69	381	311	886
1988	171	56	405	266	898

1.2 L'Anglo Arabo: libri genealogici e caratteristiche di razza

Parallelamente alla selezione effettuata in Sardegna, l'allevamento dell'Anglo Arabo compì passi molto importanti anche in Francia. È qui che nacque ufficialmente la razza, di preciso nella regione del Limousine, dove vennero compiuti incroci tra soggetti arabi e Purosangue Inglesi. Il tutto dopo la creazione dello Stud Book Francese che avvenne nel 1833. Dalla Francia la razza Anglo Araba si diffuse sia in Europa che fuori dal continente.

Immagine 1. Fattrice Anglo Araba (Foto Emanuela Pira)



Fu verso la metà del XX secolo che varie nazioni europee, compresa l'Italia, sentirono la necessità di creare un organismo internazionale di tutela della razza Anglo Araba e soprattutto di creare uno standard di razza

comune. La Sardegna, quale maggior produttrice di questi soggetti in Italia, rappresentò la nazione in diversi incontri internazionali. Nel 1993, dopo varie riunioni informali, si tenne la prima Conferenza Internazionale del Cavallo Anglo Arabo (CIAA) e vi parteciparono Italia, Francia, Portogallo, Olanda e Regno Unito. In quest'occasione vennero siglati degli accordi di cooperazione tra i Paesi interessati all'allevamento della razza, ma soprattutto vennero definiti ufficialmente gli standard di razza e uniformati i libri genealogici stabilendo regole comuni per la selezione. Tutti i Paesi, seppure in diversa misura, dovettero rinunciare a particolari definizioni nazionali o locali della razza. Avvenne questo anche in Italia dove l'Anglo Arabo Sardo venne rinominato Anglo Arabo (Cavallo Anglo Arabo, Selezione e Prospettive. Cherchi Raffaele).

Attualmente le nazione aderenti alla CIAA sono 12 (<http://angloarabhorses.com/>).

Nel 2011 i paesi aderenti alla CIAA decidono di istituire un unico disciplinare per quanto riguarda la regolamentazione del cavallo Anglo Arabo. Nasce così uno "Stud Book" internazionale, che oltre a decretare la diffusione mondiale della razza, vuole soprattutto uniformare, promuovere e condividere sia le banche dati e le risorse genetiche sia i programmi di promozione e informazione su tale razza.

Nonostante ciò i libri genealogici dei vari Paesi Membri continuano a essere operativi nel rispetto delle regole condivise.

Immagine 2. Soggetto Anglo Arabo (Foto Emanuela Pira).



Il regolamento dello Stud Book Internazionale stabilisce quali cavalli possano essere iscrivibili a quest'ultimo. Ne possono far parte i soggetti il cui nome sia seguito dall'affisso AA e che ovviamente facciano parte dei registri genealogici dei Paesi di provenienza. Tutti gli ascendenti fino alla quarta generazione devono essere registrati da un'istituzione riconosciuta dalla CIAA e non appartenere alle razze Pony, Cob, da Tiro o non avere un'origine verificata. Infine, tutti devono essere ascrivibili alle definizioni delle sezioni I, II e III dello Stud Book Internazionale.

Nella sezione I sono compresi i soggetti nati esclusivamente da ascendenti Purosangue Inglese e Purosangue Arabo con abbreviazione AA. Nella sezione II troviamo cavalli nei quali la genealogia comprenda un ascendente diverso dal Purosangue Inglese o Arabo e nei quali quindici antenati su sedici in quarta generazione rispettino questo principio o facciano parte degli Stud Book del Purosangue Inglese, Arabo o Anglo Arabo accettati dalla CIAA, anche per questi si userà l'abbreviazione AA. Infine nella sezione III si trovano tutti i prodotti non iscrivibili nelle precedenti sezioni, che abbiano almeno un ascendente Purosangue Inglese e derivati da un incrocio con un riproduttore Arabo, Inglese o Anglo Arabo con un riproduttore riconosciuto dalla WBFSH (federazione internazionale dei libri genealogici per i cavalli sportivi) o appartenente a un registro di mezzosangue riconosciuto dalla CIAA. In quest'ultimo caso la percentuale di sangue arabo dovrà essere uguale o superiore al 12,5% e anche per questi soggetti sarà prevista l'abbreviazione AA. In generale in tutti i casi in cui la

percentuale di sangue arabo è inferiore al 25% i soggetti saranno definiti “Anglo Arabi di complemento” (Cavallo Anglo Arabo, Selezione e Prospettive. Cherchi Raffaele).

Immagine 3. Cavalli Anglo Arabi in corsa presso l’Ippodromo di Chilivani
(Foto Gianni Manca)



In Italia il Libro Genealogico dell’Anglo Arabo è gestito dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MIPAAF). Nello specifico l’Anglo Arabo è incluso nel II libro che nel rispetto delle indicazioni della CIAA, è diviso in tre sezioni:

- A) Cavallo con genotipo interamente derivante da ascendenti Purosangue Inglese e Purosangue Arabo rispondenti a requisiti e criteri stabiliti dalla WAHO (World Arabian Horse Organization) e loro meticci.
- B) Cavalli con genotipo derivante per almeno 15/16 da Purosangue Inglese iscritti nello spettante libro genealogico e Purosangue Arabi rispondenti

ai requisiti e criteri WAHO e loro meticci. La restante frazione di 1/16 di genotipo, ovvero 2/32 deve provenire da ascendenti che abbiano un'origine conosciuta e che non appartengano a razze da tiro o Pony.

C) Altri cavalli figli di Purosangue Inglese iscritti al pertinente libro genealogico, di cavalli Anglo Arabi iscritti alla sezione I e II e di cavalli Purosangue Arabi rispondenti ai criteri WAHO incrociati con cavalli orientali iscritti al libro I e loro meticci.

Anche in questo caso i cavalli con percentuale di sangue arabo inferiore al 25% saranno definiti “Anglo Arabi di complemento” e tale dicitura dovrà essere riportata in ogni loro documento ufficiale (<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/6176>).

Immagine 4. Soggetto Anglo Arabo in corsa presso l'Ippodromo di Chilivani (Foto Gianni Manca).



Come è stato detto precedentemente il cavallo Anglo Arabo può vantarsi dell'apporto secolare di sangue orientale e inglese. Questa caratteristica, ma anche la marcata azione selettiva attuata, hanno portato a consolidare nel tempo le sue più ricercate caratteristiche soprattutto sportive. Risulta ora un cavallo distinto nelle forme scheletriche e muscolari, di costituzione robusta, la taglia è compresa da circa 1,58 metri al garrese a 1,70, il perimetro dello stico da 20 centimetri a 22 centimetri con un peso vivo che può variare dai 450 ai 600 kg. La pelle è sottile, il mantello è composto da peli corti e fini, i crini abbondanti. La testa solitamente è elegante e leggera, ben attaccata, mobile ed espressiva con orecchie piccole e mobili, occhi grandi e vivaci, narici ampie e mobili. L'incollatura ben attaccata si distende sul garrese rilevato e ben connesso al tronco, spalla

lunga e obliqua, petto largo, torace ampio e profondo, groppa ben inclinata e proporzionata, linea dorso lombare orizzontale e addome abbastanza longilineo. Gli arti appaiono solidi con tendini ben definiti, articolazioni larghe, pastoie ben inclinate, zoccoli proporzionati con unghie molto robuste e resistenti. In generale troviamo appiombi regolari. (<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/6177>).

Immagine 5. Soggetto Anglo Arabo (Foto Gianni Manca)



Tutte queste peculiarità conferiscono al cavallo Anglo Arabo un aspetto di classe, immagine confermata dalle sue andature leggere e armoniose. Caratterialmente dimostra volontà e coraggio, è molto generoso e richiede particolare attenzione soprattutto nelle prime fasi di

condizionamento in modo da orientare positivamente la sua innata nevrilità che per alcuni rappresenta un limite ma, se governata in modo corretto è, anzi, uno dei suoi pregi. In generale si può affermare che mantiene un buon equilibrio reagendo positivamente agli stimoli, caratteristica che gli dona anche un'eccezionale versatilità sia nelle fasi di allevamento che nelle successive fasi di allenamento nei vari sport equestri.

La sua eclettica attitudine sportiva lo rende un cavallo eccezionalmente completo, capace di competere in tutte le discipline talvolta anche ai più alti livelli agonistici.

In particolare i suoi risultati brillano nelle corse piane al galoppo, nel concorso completo e nell'endurance (Cavallo Anglo Arabo, Selezione e Prospettive. Cherchi Raffaele).

Immagine 6. Cavalli Anglo Arabi in corsa presso l'Ippodromo di Sassari
(Foto Gianni Manca)



1.3 La miostatina (MSTN)

La miostatina (MSTN) è una proteina scoperta nel 1997 dagli scienziati McPherron e Lee durante degli studi su un gruppo di proteine che regolano la crescita e la differenziazione cellulare (McPherron et al., 1997 a). Durante queste ricerche scoprirono che tale proteina poteva essere responsabile dell'aumento della massa muscolare che si riscontra in alcune razze bovine da carne, note come razze a doppia coscia o muscolatura doppia (McPherron et al., 1997 b; Smith et al. 1997), razze che sono state selezionate negli anni dagli stessi allevatori proprio perché presentavano questi caratteri morfologici.

La miostatina, proteina codificata dall'omonimo gene, nominata anche GDF-8, appartiene a una superfamiglia di molecole-segnale denominate *fattori di crescita trasformanti beta* (TGF- β) che sono espresse in grande quantità durante lo sviluppo embrionale ed esplicano un ruolo di regolazione e di omeostasi dei vari tessuti negli adulti (McPherron et al., 1996). Influenzano inoltre la differenziazione cellulare, la funzione riproduttiva, lo sviluppo, la crescita neuronale, la morfogenesi dell'osso e la cicatrizzazione delle ferite (Chang et al., 2002).

Questo ruolo è differenziato a seconda dei tessuti bersaglio e delle quantità in cui sono espresse; in alcuni casi possono anche agire come inibitori della crescita come è stato osservato in una varietà di cellule epiteliali, endoteliali e linfoidi (Roberts et al., 1990).

Per determinare la funzione biologica della miostatina, McPherron e colleghi bloccarono su delle cavie il gene codificante con la tecnica del “gene targeting”, inducendo così una soppressione o comunque una riduzione della sua funzione. La conseguenza fu che in questi animali si notò un aumento significativo della taglia e un aumento delle masse muscolari 2 o 3 volte maggiore rispetto alle cavie non mutanti. Tale aumento era dovuto a una combinazione di iperplasia e ipertrofia muscolare. I tre fenotipi ottenuti negli incroci tra le cavie (omozigoti per il gene mutato, omozigoti senza la mutazione e eterozigoti con un gene mutato e uno naturale) differivano esclusivamente per la massa muscolare ma apparivano sani e fertili. Il risultato del lavoro ha portato alla conclusione che la miostatina agisca da regolatore negativo nella crescita muscolare. In particolare la sua azione si esplica nelle fasi finali dello sviluppo embrionale e in parecchi muscoli scheletrici durante lo sviluppo. La sequenza identificata come GDF-8 è stata ottenuta amplificando il dna delle cavie mutanti con dei primers composti da oligonucleotidi degenerati corrispondenti a delle regioni conservate dei fattori di crescita conosciuti. Questo ha confermato che la sequenza aminoacidica della miostatina contiene tutte le caratteristiche della superfamiglia TGF- β , compresa una sequenza di segnali per la secrezione, un sito per i processi proteolitici e una regione carbossilica terminale contenente residui cisteinici (McPherron et al., 1997a).

L'RNA della miostatina è primariamente espresso durante

l'embriogenesi nelle cellule del miotomo e nei somiti, e continua ad essere espresso nelle cellule muscolari durante l'accrescimento (Lee, 2010).

Lo sviluppo dell'apparato muscolare durante l'embriogenesi è il risultato di molteplici processi che includono la differenziazione e la proliferazione delle cellule del mesenchima in miociti, la fusione dei mioblasti in miotubi e l'espressione di specifiche proteine del muscolo. La scomparsa dei mioblasti dal ciclo cellulare porta alla fase terminale di questa differenziazione, caratterizzata da un abbondante accumulo di proteine, che si conclude con la maturazione dei miotubi in fibre muscolari mature. Le prime fasi dell'accrescimento muscolare sono regolate da specifici fattori di trascrizione con struttura elica-ansa-elica (helix-loop-helix), come ad esempio Myf5, MyoD e miogenina (Ekaza et al., 2007).

La scoperta della miostatina quale regolatore negativo dell'accrescimento muscolare ha portato a pensare che questa venga espressa durante le prime fasi di maturazione cellulare (McPherron et al., 1997a). Tuttavia la sua presenza è stata descritta anche in altri tessuti quali ghiandola mammaria, occhi, ovaio, intestino e cervello (Gonzales-Cavidad et al., 1998; Maccatrozzo et al., 2001).

Come altri membri della famiglia TGF- β , la miostatina è sintetizzata come una proteina-precursore di 376 aminoacidi, contenente una sequenza segnale, un dominio amino-terminale propeptidico ed un dominio carbossi-terminale considerato come la forma attiva della molecola (McPherron et al., 1997a). È secreta in una forma latente legata al suo propeptide, un

processo proteolitico, tra il dominio propeptidico e il dominio carbossi-terminale, produce un propeptide amino-terminale che è la forma matura della miostatina.

Nel siero, così come nei muscoli scheletrici, la miostatina può trovarsi legata a diverse proteine che sono capaci di modulare la sua attivazione, ricezione o il suo legame coi recettori (Ekaza et al., 2007).

La sua attività biologica, intesa come segnalazione alle cellule bersaglio, sembra risiedere nel dominio C-terminale, che ha dimostrato di poter formare un omodimero legato a ponti disolfuro. Inoltre, purificando la proteina MSTN si è dimostrato che il dimero C-terminale viene attivato dai legami col recettore (Lee et al., 2001; Thies et al., 2001). Studi successivi hanno dimostrato che il dimero C-terminale di MSTN, una volta purificato, svolge varie attività nella regolazione, proliferazione e differenziazione in svariati tipi di cellule in coltura (Lee, 2010).

Altri studi hanno confermato che le due sub-unità del dimero C-terminale della miostatina sono collegate tramite un ponte disolfuro al sesto residuo cisteinico, mentre gli altri residui si trovano disposti nella classica struttura appartenente ad altri membri della famiglia TGF- β (Vitt et al., 2001).

Sebbene sia chiaro che il segnale di attivazione di MSTN risieda nel dominio C-terminale, anche il prodominio N-terminale (propeptide) ha un importante ruolo nell'attività della miostatina. La sua presenza infatti appare necessaria per la maturazione del dominio C-terminale, in particolare per la

corretta formazione della proteina-precursore MSTN, come d'altronde è stato già descritto in altri membri di TGF- β , dove la presenza del prodominio è necessaria per la corretta formazione del dimero quando, questi ligandi, vengono espressi in cellule di mammifero (Gray et al., 1990).

Oltre questa importante funzione il propeptide ha un secondo ruolo nella regolazione dell'attività della miostatina: è in grado infatti di mantenere quest'ultima in uno stato latente inattivo. Questo è stato osservato in vitro studiando la proteina purificata MSTN prodotta da cellule isolate da cavie indotte a produrre alti livelli di proteina e propeptide, dove si è visto che, dopo la secrezione, il propeptide rimane fortemente legato al dimero C-terminale (Lee et al., 2001; Thies et al., 2001). Questa sua attività inibitoria è dovuta a una regione, e si esplica attraverso dei residui aminoacidici (Jiang et al., 2004). L'attività di blocco nei confronti della miostatina è stata ampiamente documentata anche in vivo da Yang et al., (2001) e Pirottin et al. (2005). Ulteriori studi hanno dimostrato che con la somministrazione diretta a dei topi del propeptide purificato si induce un immediato blocco della miostatina e di conseguenza l'aumento delle masse muscolari (Wolfman et al., 2003; Bogdanovich et al., 2005).

Oltre al propeptide, altre proteine sono state identificate come possibili modulatori dell'attività della miostatina. Una in particolare, la follistatina (FST), che agisce allo stesso modo del propeptide inibendo il legame di MSTN col recettore, ha la proprietà di bloccare le attività di alcuni membri della superfamiglia TGF- β , compresa la miostatina

(Yamashita et al., 1995; Nakamura et al., 1990). Negli studi in vitro si è osservato che questa, a seconda della quantità presente, sblocca l'inibizione dei processi di differenziazione della miostatina (Amthor et al., 2004). Aumenti significativi delle masse muscolari sono stati ottenuti, infatti, inducendo un'alta espressione di follistatina in topi e scimmie adulte (Haidet et al., 2008; Kota et al., 2009).

È stato confermato che, come i membri della famiglia TGF- β , anche la miostatina eserciti i suoi effetti grazie alla sua affinità con i recettori transmembrana. Questi possono essere di tipo I (RI) e di tipo II (RII), e sono proteine con attività enzimatica serina-treonina-chinasi. Il dimero attivo della miostatina si lega ai recettori di tipo II (RIIB) che in seguito recluta e attiva tramite fosforilazione i recettori di tipo I, la proteina di inibizione si dissocia e inizia la cascata di trasduzione reclutando e fosforilando Smad 2 e Smad 3 che aggregandosi a Smad 4 migrano verso il nucleo attivando la trascrizione genica (Ekaza et al., 2006), al contrario Smad7 e Smurf1 inibiscono l'attività della miostatina (Zhu et al., 2004; Ebisawa et al., 2001).

Lee e colleghi in particolare hanno indagato sui possibili inibitori che potessero avere applicazioni per la promozione della crescita muscolare. Anche essi hanno stabilito che il dimero C-terminale è in grado di legare i recettori di tipo II dell'attivina, Act RIIB e in minor misura Act RIIA. Il legame della miostatina con RIIB potrebbe essere inibito dalla proteina legante follistatina e a concentrazioni più elevate dal propeptide stesso della miostatina. Per determinare in vivo il significato di queste interazioni sono

stati creati dei topi transgenici che esprimevano alti livelli del propeptide, follistatina o una forma dominante negativa di Act RIIB. Linee di topi indipendentemente transgenici per ognuna di queste mutazioni hanno evidenziato un aumento sproporzionato delle masse muscolari comparabile con quello dei topi in cui viene inibita la miostatina. Questo lascia pensare che la forma molecolare propeptide e la follistatina possano essere usate per migliorare la crescita muscolare (Lee et al., 2001).

Come molti altri membri della famiglia TGF- β , la regione GDF-8 appare fortemente conservata tra le specie, sequenze omologhe infatti sono state esaminate e trovate in molte specie di mammiferi così come nei polli (McPherron et al., 1997b; Smith et al., 1997). In particolare altri ricercatori hanno evidenziato due mutazioni del gene della miostatina in razze bovine da carne note a doppia coscia (Blu Belga e Piemontese) scoprendo nella Blu Belga una delezione che rimuove la regione attiva del gene, mentre nella Piemontese una mutazione puntiforme che probabilmente inattiva la funzione della miostatina (Grobet et al., 1997; Smith et al., 1997; Charlier et al., 1995). In diverse razze europee di bovini a doppia coscia, come Charolais, Limousine e Maine-Anjou, sono state descritte altre quattro mutazioni che potrebbero influenzare l'attività della miostatina (Grobet et al., 1998) così come nella razza italiana Marchigiana (Karim et al., 2000). Queste mutazioni avvengono naturalmente in alcune razze bovine e sono associate con un incremento della massa muscolare di circa il 20% (Ekaza et al., 2006).

Altri studi condotti sui membri della superfamiglia TGF- β hanno portato a evidenziare la presenza di queste molecole non solamente durante l'embriogenesi ma anche nelle cellule adulte del muscolo cardiaco (Millan et. al., 1991). Tale studio è stato confortato qualche anno più tardi da un gruppo di ricercatori neozelandesi che, con metodi più all'avanguardia rispetto ai precedenti, hanno indagato sulla presenza della miostatina in altri tessuti; questi ultimi hanno individuato nel muscolo cardiaco l'mRNA e la proteina della miostatina concludendo che questa può svolgere diverse funzioni in vari momenti dello suo sviluppo dimostrando inoltre che è anche secreta nel sangue (Sharma et. al., 1999).

In animali con infarto del miocardio sono stati riscontrati alti livelli di miostatina che persisteva anche 30 giorni a seguito del danno cellulare, gli alti livelli di GDF-8 e in generale di TGF- β fanno pensare che questi fattori di crescita possano essere coinvolti nella guarigione del tessuto (Sharma et. al., 1992). Ancora, in cavie immobilizzate in cui si è indotta un'atrofia muscolare si è notato un significativo aumento dell'espressione della proteina, che variava a seconda del muscolo esaminato, con incrementi superiori nelle fibre di tipo IIB (Carlson et al., 1999), tale livello ritornava ai livelli basali dopo quattro giorni di esercizio a seguito del periodo di immobilizzazione (Wehling et al. 2000).

1.4 Variazioni della sequenza del gene MSTN in cavalli sportivi.

Nel cavallo domestico sportivo (*Equus caballus*), un'intensa selezione, ha portato a una serie di cambiamenti, soprattutto fenotipici, ricercati negli anni in particolar modo per adattarlo al meglio agli svariati sport equestri in cui viene utilizzato. Da quando è avvenuto il suo addomesticamento, circa 6.000 anni fa, nelle steppe euroasiatiche (Levine et al., 1999) è stato selezionato per requisiti di forza, velocità e resistenza. Più recentemente sono nate specifiche razze selezionate per le loro capacità atletiche in determinate discipline. In generale, il cavallo, è un atleta naturale che si è evoluto nel tempo sviluppando adattamenti strutturali e fisiologici che gli hanno conferito, appunto, un fenotipo atletico. Queste sue doti possono essere attribuite ad esempio ad una elevata capacità aerobica e a una capacità muscolare di immagazzinare substrati energetici, risultando nettamente superiore, nelle performances fisiche, rispetto ad altre specie della stessa taglia (Hill et al., 2013).

Una razza in particolare, il Purosangue Inglese, ha subito, per oltre tre secoli, un'intensa selezione artificiale improntata sulle sue, già sviluppate, doti di corridore. Questa selezione ha migliorato in modo significativo le sue caratteristiche consentendogli di essere un cavallo "elite" per prestazioni atletiche (Evans et al., 1993).

C'è da dire che, sebbene i fenotipi atletici siano marcatamente influenzati anche da fattori ambientali quali l'allevamento, il management e

soprattutto l'allenamento, è stato accertato che queste capacità siano condizionate anche da fattori genetici (Gaffney et al., 1988).

In altre specie, e anche nell'uomo, sono stati condotti svariati studi che hanno rivelato una serie di geni coinvolti positivamente nelle prestazioni atletiche. Ad esempio, in cani da corsa, è stato associato che un eterozigosi in un polimorfismo al locus della miostatina porta a capacità atletiche migliori (Mosher et al., 2007).

Tuttavia sono ancora pochi gli studi di questo tipo che riguardano il cavallo (Schröder et al., 2011). Sono stati identificati, infatti, solo alcuni geni che influenzano questi tratti (Gu et al., 2009a; Gu et al., 2010b; Hill et al., 2010b).

Nel 2010 un gruppo di ricercatori irlandesi ha intrapreso degli studi di genetica sul cavallo Purosangue Inglese da corsa, focalizzando l'attenzione sul gene della miostatina (Hill et al., 2010c). Il cavallo, e in particolare il Purosangue Inglese, presenta una massa muscolare molto elevata in rapporto al suo peso corporeo e rispetto ad altre specie di mammiferi (McPherron et al., 1997), a sottolineare che il suo genoma presenta evidenze di una selezione improntata su un fenotipo con potenza muscolare (Gunn, 1987).

Questi dati fenotipici fanno pensare che la miostatina, o qualche mutazione nel suo gene, siano coinvolti nei vari morfo-tipi di Purosangue e che possano anche influire sulle prestazioni atletiche.

Hill e colleghi sono stati i primi a studiare la sequenza della

miostatina e le sue mutazioni correlandole alle prestazioni sportive in Purosangue Inglese da corsa. Il gene, situato nella parte distale del cromosoma 18, si estende per 4972 paia di basi (bp) (chr18: 66490208-66495180) contenenti tre esoni e due introni (Wade et al., 2009). Le sequenze con i relativi SNPs sono state ottenute da cavalli di razza Purosangue Inglese, il gene è stato frammentato e sequenziato usando 13 paia di primer sovrapposti.

Il lavoro ha portato alla scoperta di un sito polimorfico (g.66493737), localizzato nell'introne del gene MSTN, fortemente associato con prestazioni migliori a seconda delle distanze in corsa. Il tutto è stato confermato campionando tre gruppi diversi di Purosangue. In questo SNP sono stati osservati due alleli, C e T. Considerando la distanza in corsa il carattere quantitativo di riferimento, i cavalli omozigoti CC sono apparsi particolarmente performanti nelle brevi distanze (1000-1600 mt), gli eterozigoti CT nelle medie distanze (1400-2400 mt), mentre gli omozigoti TT sono risultati vincenti sulle lunghe distanze (> 2000 mt) (Hill et al., 2010c). A riprova di questo anche i fenotipi riguardanti la muscolatura appaiono diversi a seconda del polimorfismo, confermando l'attitudine alla diverse distanze: cavalli CC, considerati all'età di due anni, oltre ad essere più precoci nella crescita, presentano una massa muscolare decisamente più sviluppata, in quanto cavalli velocisti, rispetto ai TT, con maggior attitudine per le lunghe distanze, che appaiono più longilinei e meno muscolati (Hill et al., 2010a). L'aumento della muscolatura a seguito di mutazioni di MSTN

non interessa tutti i tipi di fibre muscolari: vi è un aumento preferenziale delle fibre glicolitiche a contrazione rapida di tipo IIB (Deveaux et al., 2001; Hennebry et al., 2009), il che è coerente con una migliore capacità di sprint nei cavalli con genotipo CC.

Altri studi indipendenti, in particolare tre analisi di associazione genome-wide in Purosangue provenienti da Irlanda, Gran Bretagna, Nuova Zelanda (Hill et al., 2010a), USA (Binns et al., 2010) e Giappone (Tozaki et al., 2010) hanno confermato l'associazione tra le mutazioni al locus di MSTN sul cromosoma 18 e la distanza di gara più adatta a certe tipologie di Purosangue.

Hill e colleghi analizzando per la prima volta, con questo metodo (EquineSNP50), 118 cavalli, hanno ipotizzato che la mutazione g.66493737C>T al locus della miostatina potrebbe influire in modo diretto con lo sviluppo dei miociti, essendo dislocata nell'introne di MSTN dove si presume ci sia un importante fattore di trascrizione (E2F), coinvolto nel controllo del ciclo cellulare dei mioblasti (Polager et al., 2009). Tuttavia non è ancora chiaro come questo polimorfismo possa agire sui fattori di trascrizione dando origine a variazioni nell'espressione genica. È certo però che la mutazione g.66493737C>T in MSTN è risultata la variante con maggiore attendibilità nella predizione dell'attitudine alle varie distanze in corsa nei Purosangue presi in considerazione (Hill et al., 2010a). Successivamente lo stesso autore ha dimostrato che i diversi genotipi al locus MSTN g.66493737C>T hanno un'influenza significativa nel

determinare gli indici individuali di velocità (Hill et al., 2012). Il meccanismo con cui le variazioni di MSTN condizionano questi funzionamenti non è del tutto chiaro, tuttavia studi sull'espressione genica hanno determinato che la trascrizione dell'RNA di MSTN appare alterato nei muscoli di cavalli Purosangue Inglese sottoposti ad allenamento (McGivney et al., 2010).

È stata condotta un'altra analisi di associazione su 189 Purosangue Inglese che hanno disputato e vinto corse in nord America, i cavalli sono stati divisi in tre gruppi in base alle loro migliori prestazioni individuali a diverse distanze. Anche in questo caso è stato utilizzato il chip EquineSNP50, gli SNPs con maggiore significatività sono stati riscontrati, in accordo con gli altri studi, sul cromosoma 18 (Binns et al., 2010), confermando che questa regione del genoma contenente MSTN influenza la crescita delle masse muscolari e le conformazioni corporee e di conseguenza la distanza ottimale in corsa di ciascun soggetto (McGivney et al., 2012).

Un altro studio di GWAS, effettuato su un campione di Purosangue Inglese in Giappone, ha portato alla scoperta di tre nuovi SNPs (sg.65809482T>C, g.65868604G>T, g.66539967A>G) sul cromosoma 18, associati anch'essi alle performance in corsa, in particolare alla lunghezza, espressa in tempo e, indirettamente, ad un maggior ricavo economico, questo ha fatto pensare che, in questa regione, che include MSTN, vi possano essere altri geni, che potrebbe essere lo stesso gene della

miostatina, coinvolti allo stesso scopo (Tozaki et al., 2010).

È curioso sapere che, da un'analisi ancestrale in cavalli Purosangue Inglese, cavalli di altre razze e equidi, si è scoperto che l'allele T ha origini molto antiche mentre l'allele C, presente in svariate razze, si è diffuso soprattutto in quei cavalli dove la pressione genetica selettiva è stata molto forte. La mutazione g.66493737C>T non è quindi esclusiva della razza Purosangue Inglese, è stata riscontrata con un'alta frequenza anche in cavalli Quarter Horse, mentre nei cavalli asiatici risulta del 4% e del 3% nei nord africani. È facile capire che l'alta frequenza riscontrata nel Purosangue Inglese sia dovuta al fatto che sin dalla sua origine è stata una popolazione chiusa, e probabilmente l'allele C è stato introdotto contestualmente alla fondazione della razza. È stato constatato come, in tempi recenti, questo allele sia stato principalmente trasmesso tramite lo stallone Neartic (1954), padre di Northern Dancer (1961), uno degli stalloni più influenti dell'era moderna (Bower et al., 2012).

In altre razze equine sono stati riscontrati ulteriori SNPs nella sequenza di MSTN, Li, ad esempio, analizzando 15 razze cinesi ha catalogato sei mutazioni, una delle quali (g.2115A>G) è stata associata con le performance in corsa e potrebbe servire quale marker predittivo (Li et al., 2014). Analizzando 16 razze equine europee, Dall'Olio ha potuto stabilire che le mutazioni g.26C e g.156C presentano un'alta frequenza in razze pesanti brachimorfe rispetto alle razze più leggere dolicomorfe, il tutto sottolinea che la regione MSTN influisce notevolmente e può essere

predittiva dei tipi morfologici (Dall'Olio et al., 2010). Lo stesso autore, valutando quattro SNPs, in 202 cavalli di razza Tiro Pesante Rapido Italiano, in cui sono state effettuate una serie di misurazioni biometriche, ha stabilito che la mutazione GQ193900:g.26T4C risulta associata con la circonferenza dello stinco, con la valutazione laterale degli arti posteriori e con la carnosità (*fleshiness*). Questi studi confermano come anche in razze equine da carne i polimorfismi di MSTN possano avere potenziali applicazioni per il miglioramento della selezione (Dall'Olio et al., 2014).

Lo stesso risultato è stato ottenuto anche in Purosangue Inglese giapponesi: 116 animali sono stati valutati per vari parametri biometrici in relazione con quattro SNPs in MSTN, compreso g.66493737C>T. Tutti e quattro si sono dimostrati associati con il peso corporeo e l'altezza al garrese, indicando ancora una volta che questa regione del cromosoma 18 influenza la crescita muscolare (Tozaki et al., 2011).

2. Scopo della ricerca

Il cavallo Anglo Arabo ha una notevole diffusione, soprattutto in Europa e nei paesi Arabi, grazie alla sua estrema versatilità in molte discipline equestri. Tuttavia, ad oggi, sono pochissimi gli studi di genetica che riguardano tale razza.

L'indirizzo selettivo che viene seguito in Italia riguarda principalmente la linea da corsa, che si adatta perfettamente anche alla disciplina dell'endurance. In queste gare, i cavalli Anglo Arabi, hanno dimostrato di avere notevole capacità di competizione a livello internazionale.

Data l'importanza che riveste il settore equestre in Italia e in particolare in Sardegna, si ritiene utile condurre delle indagini genetiche sul cavallo Anglo Arabo, volte in particolar modo al miglioramento delle performance sportive. Studi di questo tipo potrebbero rivelarsi utili per comprendere quali possano essere le maggiori potenzialità di un soggetto rispetto ad un altro e quali tipi di incroci siano preferibili per ottenere soggetti più adatti alle diverse competizioni.

Scopo di questo lavoro è analizzare una regione del gene della miostatina e le eventuali associazioni dei suoi polimorfismi con i principali fattori fenotipici che influenzano la carriera sportiva di un cavallo.

Da questi risultati potranno scaturire utili elementi per porre le basi di un approccio di tipo genetico, inteso come geni che influenzano le prestazioni sportive, da applicare nella realtà selettiva.

3. Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su 180 cavalli di razza Anglo Araba iscritti al Libro genealogico. Gli animali appartenevano a 120 allevamenti. Centocinquatré cavalli si trovavano in Sardegna, distribuiti in tutte le province, mentre i restanti 27 nella provincia di Siena.

Da ciascun animale sono stati prelevati 10 ml di sangue periferico dalla vena giugulare utilizzando aghi monouso e provette *vacuum* addizionate con anticoagulante K3EDTA (Vacutest Kima, Azergrande, PD, Italy).

Immagine 7. Prelievo ematico dalla vena giugulare (Foto Basilio Falchi).



Dati fenotipici

Contestualmente al prelievo dei campioni ematici è stato creato un data set dove sono stati riportati i seguenti dati anagrafici degli animali:

nome, sesso, mantello, anno di nascita, microchip, percentuale di sangue arabo, genealogia paterna e materna fino alla quarta generazione, razza del padre e della madre e allevatore al momento della nascita (Fonte: <http://www.unire.gov.it/index.php/ita/Operatori/Banca-dati>).

Nello stesso data set sono stati riportati i dati riguardanti la carriera sportiva di ciascun animale: corse disputate ai tre anni, data di ciascuna corsa, numero dei cavalli partecipanti, ordine di arrivo, distanza della corsa, nominativo del fantino, peso del fantino, premio vinto in euro, montepremi della gara, ippodromo dove si disputava la gara, totale delle somme vinte in euro ai tre anni di età e in carriera, totale delle corse disputate in carriera, totale dei piazzamenti conseguiti in carriera (1°, 2° e 3° posto), allenatore e allevatore (Fonte: <http://www.hippoweb.it/prestazioni.php>). Per le somme delle vincite prima dell'utilizzo della valuta in euro, il sistema del portale www.hippoweb.it fornisce automaticamente il cambio calcolato in funzione delle somme della valuta in lire.

Inoltre, si è ritenuto opportuno inserire tre nuovi parametri che potessero completare i dati disponibili e la valutazione delle performance del singolo cavallo. Il primo, denominato rapporto d'arrivo, è ottenuto dall'inverso del rapporto tra il numero di cavalli partecipanti alla corsa e la posizione ottenuta in classifica; questo è tanto più elevato quanti più sono i cavalli partenti e ha lo scopo di differenziare i piazzamenti sulla base dei concorrenti alle corse. Il secondo è l'indice di montepremi, che è ottenuto dal rapporto tra il montepremi della corsa ed il premio in denaro vinto;

questo è tanto più elevato quanti più sono ricchi i montepremi delle corse e ha lo scopo di differenziare i premi vinti in base alle corse più prestigiose. Infine, l'indice di successo che rappresenta il prodotto tra il rapporto d'arrivo e il premio vinto, e considera entrambe i parametri di piazzamento e montepremi.

Analisi genomiche

Il DNA genomico è stato estratto dai leucociti mediante Gentra Puregene Blood Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) e sottoposto a lettura spettrofotometrica per stabilirne la concentrazione e la purezza. Sulla base della sequenza genica di MSTN (cromosoma 18: 66.490.208-66.495.180 reverse strand) sono state costruite 10 coppie di primer, utilizzando il software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), con lo scopo di amplificare mediante PCR l'intera sequenza del gene (Tabella 1). I primer sono stati disegnati in modo da ottenere dei frammenti sovrapposti.

Per tutti i 10 frammenti, la reazione di amplificazione PCR è stata realizzata utilizzando una Mix con volume finale di 25 µl costituita da: 100 ng di DNA genomico, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1X buffer di reazione, 0,2 µM di ciascun primer, e 1 Unità di Taq polimerasi (Supreme NZYTaq polymerase, Nzytech). L'amplificazione dei campioni è stata realizzata su Thermal Cycler Mastercycler® ep (Eppendorf), con condizioni termiche che prevedevano per tutti i frammenti una denaturazione iniziale a

94°C per 2,3 minuti, seguita da 35 cicli in cui si susseguivano una fase di denaturazione a 94°C per 20 secondi, una fase di annealing a 56 °C per 30 secondi (nel solo frammento 1 era di 55 °C), e di una fase di estensione a 72°C per 50 secondi. Infine è stata applicata una fase di estensione finale a 72°C per 5 minuti. I prodotti della PCR sono stati esaminati mediante elettroforesi su gel di agarosio alla concentrazione dell'1% (4,0 V/cm), e successiva lettura al transilluminatore UV per visualizzare le bande del frammento di DNA amplificato.

Immagine 8. Amplificazione campioni su Thermal Cycler Mastercycler (Foto Pietro Paschino).



Le reazioni di sequenziamento sono state realizzate presso un laboratorio specializzato. I prodotti di PCR sono stati purificati con ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e sequenziati con un Applied Biosystems 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Tutte le sequenze sono state depositate su GenBank con accession number KY746358 - KY746537 (introne 1) e KY746538 - KY746713 (introne 2).

Tabella 2. Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione PCR e il sequenziamento, al locus *MSTN* nel cavallo

Fragment	Primer sequence (5' - 3')	Primer name
P	AACTTCTCTTTAATACAGGTCTTCC	SHOR_PF
	GGCGCAGTTTACTGAGGATT	SHOR_PR
1	AATTTTGCTTGGCATTGCTC	SHOR_1F
	GCAACCAAACGCAATTATGA	SHOR_1R
2	AACAATCATTACCATGCCTACAGA	SHOR_2F
	TCCTCCCTCCAAGAAGAAT	SHOR_2R
3	TCAAAGAGGTTATAGCTCAGAGTCC	SHOR3737F
	GAGACACCGTGGAGGAACAT	SHOR3737R
4	TCCCGAGGCTCAGTTAGTTC	SHOR_4F
	CAGGCTGTTGAGCCAATTT	SHOR_4R
5	CATCAAACCCATGAAAGACG	SHOR_5F
	GCATCAACAGCCTGCAAAAT	SHOR_5R
6	CCCCAGAAGAGTGTCAAAT	SHOR_6F
	ACGTTACTAAGTTTACGTTAAAATGCT	SHOR_6R
7	TTCAGTCTTCATGTGGTCTTGG	SHOR_7F
	TGACTTTTCCCTATGGCTCAA	SHOR_7R
8	ACCTAGGGAATGGAGGATGG	SHOR_8F
	AGCACCCACAGCGATCTACT	SHOR_8R
9	TGCTCTGGAGAGTGTGAATTTG	SHOR_9F
	TGCACCTGAAGAAAGGAGAAA	SHOR_9R

Analisi dei cromatogrammi di sequenza

I software Phred/Phrap/Crossmatch sono stati utilizzati per calcolare l'informazione sulla qualità dei dati contenuti nei tracciati di sequenza (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998), e PolyPhred è stato usato per confrontare le sequenze (Nickerson et al., 1997; Bhangale et al., 2006). Consed ha permesso di esaminare i siti di variazione marcati da PolyPhred (Gordon et al., 1998, 2001; Gordon, 2004).

Le variazioni nucleotidiche individuate sono state descritte in accordo con le raccomandazioni della Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>).

Il software Haploview (Barrett et al., 2005) è stato utilizzato per calcolare le frequenze alleliche, l'eterozigosità osservata e attesa, per testare l'equilibrio di Hardy-Weinberg a ciascun locus polimorfico, e per calcolare il grado di Linkage Disequilibrium (LD) tra gli SNP rivelati.

Analisi statistica

Sono state condotte un'analisi statistica preliminare in cui non si è tenuto conto dell'effetto genetico ed una in cui sono stati analizzati gli effetti dei singoli SNP.

Nell'analisi preliminare è stata utilizzata una procedura MIXED del software di elaborazione dati SAS secondo il seguente modello:

$$Y_{ijklm} = \mu + F_i + S_j + D_k + P_l + C_m + e_{ijklm} \quad (1)$$

in cui Y è il tratto analizzato, μ è la media, F_i è l'effetto fisso del fondo ($i=2$

livelli: 1, fondo arabo se la percentuale di sangue arabo è superiore al 50%; 2, fondo inglese se inferiore al 50%), S_j è l'effetto fisso del sesso ($j= 2$ livelli: maschio e femmina), D_k è l'effetto fisso della distanza della corsa ($k= 3$ livelli: 1, corse con distanza tra i 1000 e 1400 metri; 2: 1400-1800 metri e 3: 1800-2400 metri), P_l è l'effetto fisso del peso del fantino ($l= 3$ livelli: 1, 45-55,5 kg; 2, 56-57,5; 3, ≥ 58 kg), C_m è l'effetto random del cavallo ed include le interazioni con allevatore, allenatore, ippodromo e fantino, ed infine e_{ijklm} è l'errore.

Nell'analisi in cui si è tenuto conto dei genotipi è stato aggiunto l'effetto del singolo SNP per ciascuno dei fenotipi calcolati, secondo il modello:

$$Y_{ijklmn} = \mu + G_i + F_j + S_k + D_l + P_m + C_n + e_{ijklmn} \quad (2)$$

in cui Y è il tratto analizzato, μ è la media, G_j è l'effetto fisso del genotipo al singolo SNP ($j=$ due o tre livelli), e gli altri effetti sono gli stessi descritti per il modello (1).

Per i genotipi che hanno presentato significatività sono state condotte inoltre un'analisi di frequenza atta a verificare l'associazione del genotipo con la classe di distanza in corsa, e sono stati effettuati dei contrasti ortogonali tra i genotipi omozigoti e tra il genotipo eterozigote vs la media della somma dei genotipi omozigoti, e un'analisi che considerasse l'interazione dei singoli livelli del genotipo con i livelli della classe di fondo per testare la migliore performance di ogni genotipo per le classi di distanza delle gare.

4. Risultati e discussione

DATI GENERALI

La classificazione per dati segnaletici dei 180 cavalli oggetto del campionamento sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Classificazione per dati segnaletici dei 180 cavalli campionati

Dato segnaletico	livello	n
Sesso	stallone	20
	femmina	108
	castrato	52
Percentuale sangue arabo	>50%	68
	<50%	112

Il campione, rappresentativo del tipo di allevamento che viene condotto in Italia ed in particolare in Sardegna è costituito prevalentemente dalle femmine, in quanto una volta terminata la carriera sportiva gli allevatori le destinano alla riproduzione quali fattrici. Al contrario, i maschi, vengono per lo più venduti ai 4 anni, spesso utilizzati in palii, giostre equestri, endurance o semplicemente come cavalli da sella. Vista questa variegata destinazione è risultato più difficile il loro reperimento. Gli stalloni campionati appartengono a enti pubblici o allevatori privati e vengono utilizzati come riproduttori. Tra questi vi sono animali la cui carriera è

terminata ai 4 anni mentre altri sono stati destinati alla riproduzione dopo vari anni di competizioni.

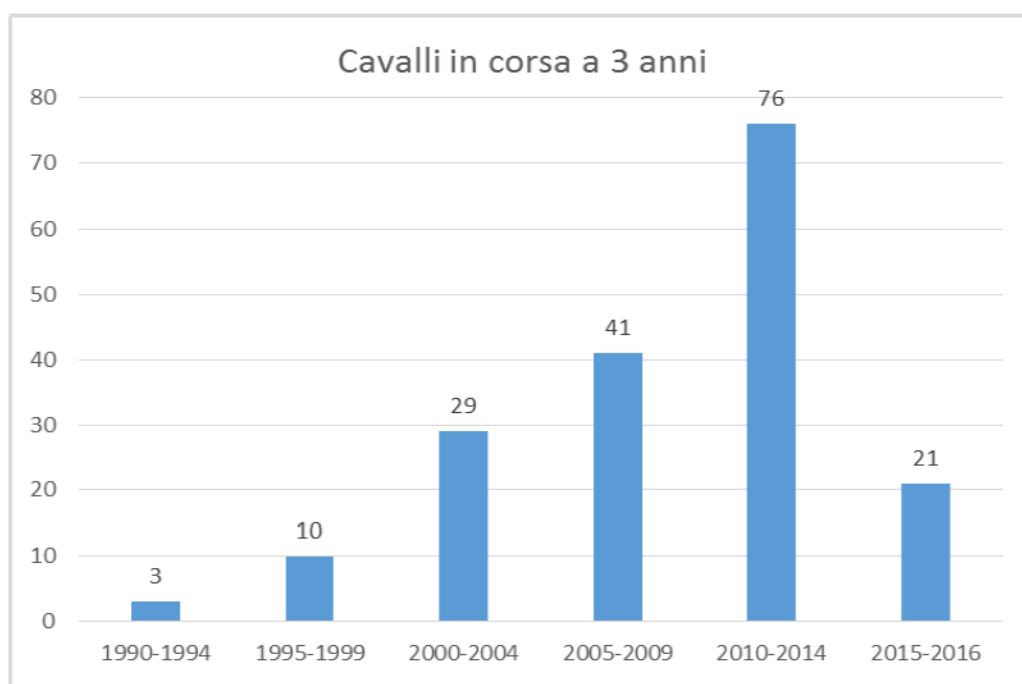
Tabella 4. Razza a cui appartengono i padri e le madri dei cavalli prelevati

Dato segnaletico	Razza	n
Padri	A.A.	113
	P.S.I.	64
	P.S.A.	3
Madri	A.A.	171
	P.S.I.	9

Nel campione troviamo 68 cavalli così detti a “fondo arabo”, ossia con una percentuale di sangue arabo superiore al 50%, e 112 a “fondo inglese”, ossia con una percentuale di sangue arabo inferiore al 50%. Anche questo dato è in linea col tipo di allevamento condotto. Infatti, negli incroci si cerca di ottenere soggetti con una percentuale di sangue inglese più alta possibile. In particolare, quando il fondo della fattrice lo permette, scegliendo il Purosangue Inglese come riproduttore maschio, tale scelta è dettata dalla convinzione che il sangue inglese dia soggetti più performanti. Al contrario, come descritto in Tabella 4, sono in numero estremamente esiguo i figli di stallone Purosangue Arabo. Per ottenere un soggetto a

“fondo arabo” si preferisce infatti l’incrocio tra genitori entrambi Anglo Arabi. Sempre in Tabella 4, possiamo vedere come le madri siano quasi esclusivamente di razza Anglo Araba, anche in questo caso la scelta allevatoriale mira a fattrici Anglo Arabe sia per una questione culturale sia per il tipo di allevamento che viene condotto in particolare in Sardegna. Infatti, la rusticità di questa razza permette che i cavalli si adattino facilmente alle condizioni orografiche e climatiche del territorio. La maggior parte dei cavalli campionati, che avevano terminato la carriera sportiva, venivano di fatto allevati al pascolo brado.

Grafico 1. Anno del debutto in corsa dei cavalli campionati



Il campione è risultato rappresentativo anche dal punto di vista temporale, comprendendo cavalli che avevano gareggiato nel corso negli ultimi 27 anni (Grafico 1). Tra i cavalli troviamo stalloni e rispettivi figli, così come nel medesimo allevamento sono state prelevate fattrici e rispettivi figli/e che hanno comunque disputato corse piane al galoppo. Poiché la differenza di età tra i cavalli campionati era molto ampia non si è ritenuto utile rilevare gli indici biometrici o effettuate valutazioni morfologiche riguardanti le masse muscolari.

In questa ricerca non sono stati presi in considerazione neppure gli indici di ereditabilità e il fattore padre perchè i dati sarebbero risultati sbilanciati in quanto il numero dei padri è risultato troppo alto per 180 cavalli. Il fattore fondo è comunque un dato fenotipico importante che di per se include i fattori madre e padre.

Per l'elaborazione dei dati di associazione si è scelto di considerare solo l'attività sportiva nell'anno di debutto dei cavalli (3 anni di età). A differenza del Purosangue Inglese, che inizia la sua carriera ai 2 anni, l'età di debutto dell'Anglo Arabo avviene a 3 anni. Le corse a cui possono partecipare sono infatti riservate esclusivamente ai soggetti di questa età, possiamo quindi affermare che si trovino in condizioni abbastanza simili nel competere. Includendo tutta la carriera sportiva il campionamento sarebbe risultato non omogeneo perché solo una piccola percentuale di soggetti prosegue la carriera dopo i 4 anni. Tra questi troviamo sicuramente i maschi più forti e in minor misura le femmine, che vengono destinate prontamente

alla riproduzione. Inoltre le corse riservate a cavalli Anglo Arabi di 4 anni e oltre sono abbastanza limitate. Questo è uno dei motivi per cui un proprietario/allevatore decide di ritirare dalle competizioni soggetti con performance medie.

DATI GENETICI

Sequenziamento dell'intero gene MSTN

Il gene *MSTN* del cavallo (*Equus caballus*) comprende 3 esoni, codifica per la proteina miostatina e si estende per 4.972 bp (chr18: 66.490.208 - 66.495.180; RefSeq NC_009161.2). Nella presente ricerca abbiamo sequenziato l'intero gene *MSTN* in due soggetti di razza Anglo Araba, con lo scopo di validare i primers, includendo circa 600 bp a valle e a monte del gene, quindi sono state sequenziate complessivamente 6.250 bp (chr18: 66.489.566 - 66.495.816). Tali sequenze sono state depositate su GenBank con Accession Number KY746356 - KY746357.

L'analisi dei tracciati di sequenza ha permesso di individuare 14 siti polimorfici (Tabella 5), alcuni noti (rs69472472 e rs397152648) in quanto rivelati in precedenti studi sul Purosangue Inglese, altri rivelati per la prima volta in questa indagine. Tutte le variazioni nucleotidiche sono state depositate sul database dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Tutti gli SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) risultavano localizzati nelle due regioni introniche del gene (9 nel primo introne e 5 nel

secondo), mentre gli esoni e le regioni 5' e 3' fiancheggianti non presentavano polimorfismi né variazioni rispetto alla sequenza di riferimento, che deriva da una femmina di Purosangue Inglese (EquCab2: CM000394.2). Tredici delle variazioni nucleotidiche erano SNPs, di cui 8 transizioni e 4 transversioni, mentre la dodicesima era una delezione, localizzata 40 bp a monte della giunzione tra introne 2 ed esone 3.

Rispetto agli elementi di variabilità della sequenza del gene *MSTN*, evidenziati in studi precedenti sul Purosangue Inglese che risulta la razza più studiata (Hill et al., 2010a; Hill et al., 2010b; McGivney et al., 2012; Hill et al., 2012; Tozaki et al., 2011), i cavalli di razza Anglo Araba da noi analizzati presentano maggiore variabilità. Tale variabilità è in parte ascrivibile al diverso processo di selezione delle due razze (Anglo Arabo e Purosangue Inglese) come è stato descritto nella parte introduttiva della presente Tesi di Dottorato. In particolare, l'inserzione SINE di 227bp localizzata nella regione promotore in cavalli Purosangue Inglese, (Hill et al., 2010) osservata in alcuni studi in linkage con il genotipo g.66.493.737T>C, non era presente nel nostro sequenziamento.

Gli SNPs g.66.494.680A>G (c.373+128T>C), g.66.494.554A>G (c.373+254T>C) e g.66.494.367G>A (c.373+441C>T), rivelati nel Purosangue Inglese, sono risultati monomorfici nei due soggetti da noi analizzati, dove abbiamo evidenziato i genotipi TT, TT e CC, rispettivamente.

Nella regione 3'UTR è stato riportato, per la sequenza di riferimento, lo SNP g.66490010T>C (rs782836148) che nei due campioni da noi analizzati aveva il genotipo AA.

La bassa variabilità riportata in letteratura dipende dal fatto che la maggior parte degli studi sul polimorfismo del gene *MSTN* nel cavallo è stata condotta sulla razza Purosangue Inglese, che per sua stessa definizione, comporta un certo grado di consanguineità (Cunningham et al., 2001; Hill et al., 2002). Questo può giustificare la ridotta presenza di polimorfismi in questa regione. Al contrario, nello studio di Baron et al., (2010) dove sono state prese in considerazione 20 diverse razze equine, fra cui Purosangue Arabi, Purosangue Inglese, Lipizzani, Hannover, Lusitani e Pura Razza Spagnola, l'analisi del solo esone 2 ha rivelato la presenza di 10 siti polimorfici (rispetto alla sequenza di riferimento AY840554) alcuni dei quali specifici di razza, ad es. 2279A>C risulta specifico della razza Araba. Questo SNP corrisponde alla posizione nt (nucleotidica) sul cromosoma 18: 66.492.906 (RefSeq NC_009161.2) e nei due soggetti da noi interamente sequenziati risultava omozigote AA.

Tabella 2. Variazioni di sequenza del gene *MSTN* e analisi delle relative frequenze in cavalli di razza Anglo Arabo

dbSNP ID	Chr position	HGVS name	Gene region	Allele ^{††}	MAF	Ho	He	HWpval
rs69472472	66.494.302	c.373+506T>C	Introne 1	-	-	-	-	-
	66.494.218	c.373+590T>G		-	-	-	-	-
	66.493.828	c.374-850G>A		G:(A)	0.02	0.04	0.04	1.0
	66.493.775	c.374-797T>C		T:(C)	0.01	0.02	0.02	1.0
rs397152648	66.493.745	c.374-767T>C	Introne 2	T:(C)	0.01	0.02	0.02	1.0
	66.493.737	c.374-759A>G		A:(G)	0.13	0.23	0.22	0.91
	66.493.582	c.374-604A>C		A:(C)	0.09	0.16	0.17	0.89
	66.493.525	c.374-547A>C		A:(C)	0.01	0.02	0.02	1.0
	66.493.519	c.374-541C>T		C:(T)	0.13	0.18	0.22	0.08
	66.491.622	c.747+983T>A		T:(A)	0.02	0.04	0.04	1.0
rs397152648	66.491.612	c.747+993T>C	Introne 2	T:(C)	0.48	0.52	0.50	0.67
	66.491.515	c.748-927A>T		A:(T)	0.03	0.06	0.07	0.35
	66.490.775	c.748-187A>G		A:G	-	-	-	-
	66.490.628	c.748-40delA		A:_	-	-	-	-

SNP ID: submitted SNP accession number from the dbSNP database

Chr position: posizione sul cromosoma

MAF: minor allele frequency

Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity; HWpval: Hardy Weinberg P value

††: rare allele in brackets

Risultati genotyping by sequencing

Al fine di indagare il possibile effetto dei polimorfismi rivelati su alcuni caratteri fenotipici, abbiamo effettuato il resequencing dei frammenti 3 e 6 in 180 cavalli di razza Anglo Arabo. Sono stati genotipizzati complessivamente 10 SNPs, 7 dei quali localizzati nell'introne 1 e 3 nell'introne 2 (Tabella 5). Di questi, soltanto 4 presentavano frequenza dell'allele minore (MAF, minor allele frequency) superiore al 5% (Tabella 5), tutti gli altri devono essere considerati rari in relazione all'allele minore, mentre l'allele maggiore si considera fissato nella popolazione analizzata. Tutti gli SNPs genotipizzati risultavano in equilibrio di Hardy-Weinberg nella popolazione analizzata (Tabella 5). Fra i 10 genotipizzati nella presente ricerca, lo SNP rs397152648 (g.66.493.737T>C) è l'unico già presente in letteratura.

Studi sulle performance atletiche del Purosangue Inglese hanno dimostrato che l'allele T in questo SNP ha un'origine ancestrale, mentre l'introduzione dell'allele C potrebbe derivare da un singolo evento accaduto durante la creazione della razza nel 1791. Dagli stessi studi si evince che questo allele è stato tramandato massicciamente, in tempi abbastanza recenti, tramite la discendenza dello stallone Nearctic (1954) e di suo figlio Northern Dancer (1961) (Bower et al., 2012). La messa in evidenza di questo allele e delle sue correlazioni con le performance in corsa nella razza Purosangue Inglese, ha portato alla creazione di un test "Speed Gene Test", con licenza esclusiva Equinome Ltd. (Hill et al. 2012).

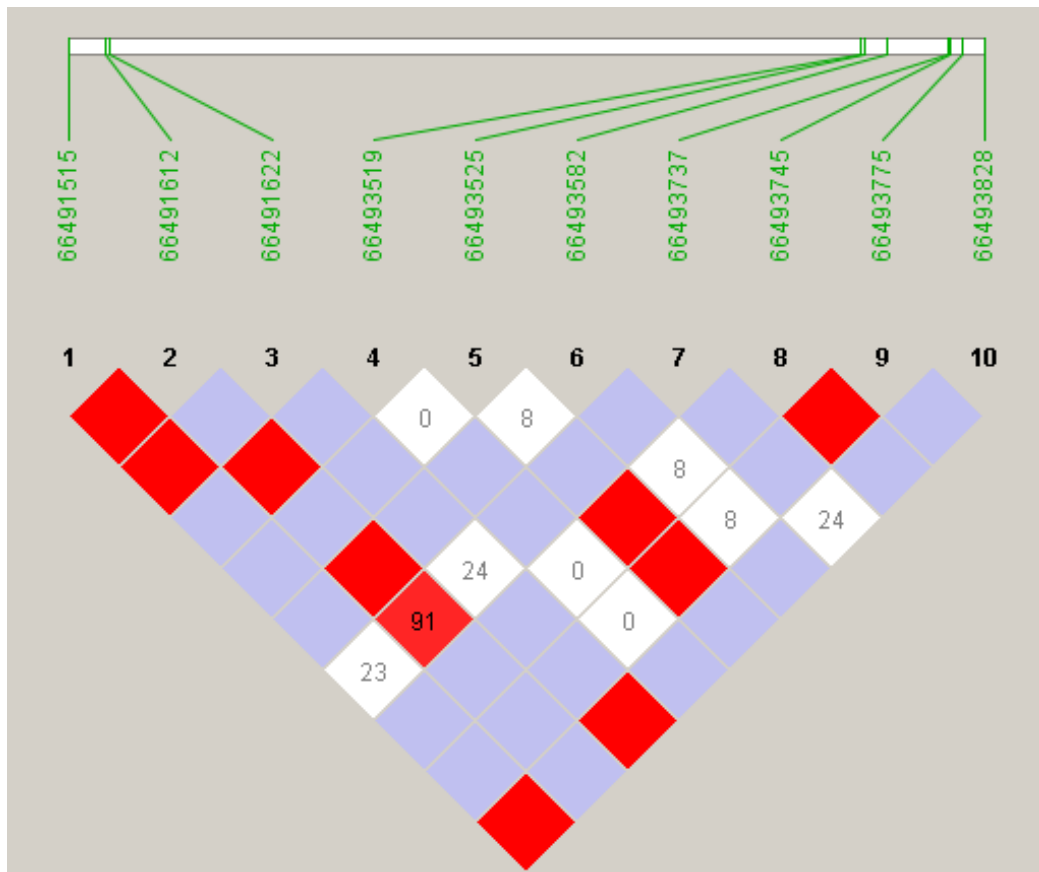
Nella popolazione analizzata, g.66.493.737C era l'allele minore, con frequenza 0.13, presente in omozigosi in due soli soggetti, mentre gli eterozigoti TC erano 41 e gli omozigoti TT erano 136.

Al fine di determinare la struttura alplotipica del gene *MSTN* nella popolazione analizzata, le informazioni ottenute con l'analisi di genotyping sono state utilizzate per effettuare l'analisi del Linkage Disequilibrium (LD) utilizzando il software Haploview (Barrett et al., 2005), includendo una regione del gene *MSTN* di 2313 bp. Sorprendentemente, non sono stati trovati blocchi di associazione, come era emerso da altre indagini sulla razza Purosangue Inglese (Bower et al., 2012), mentre l'analisi del LD nella popolazione equina analizzata indica la presenza di un "hotspot" di ricombinazione all'interno dell'introne 3 (Immagine 9).

Questa differenza può essere dovuta al fatto che la razza Purosangue Inglese è fondata da un pool di circa 30 femmine e 3 maschi (Cunningham et al., 2001; Hill et al., 2002), che comporta un livello elevato di consanguineità. Al contrario, i cavalli di razza Anglo Araba presenti in Sardegna originano da un pool di 300 femmine autoctone della Sardegna, che sono state incrociate, inizialmente, con un gran numero di stalloni di razza Purosangue Arabo per numerose generazioni, e in seguito con stalloni Purosangue Inglesi e Anglo Arabi, garantendo un apporto continuo di variabilità alla razza (Gratani L. 1988a,b).

L'analisi del Linkage Disequilibrium dimostra che nella razza Anglo Araba gli aplotipi del gene *MSTN* trasmessi come blocchi di LD da una generazione alla successiva sono diversi rispetto al Purosangue Inglese, per questa ragione dovrebbero essere rivalutati anche gli effetti dei diversi SNPs sulle performances di questa razza.

Immagine 9. Analisi del Linkage Disequilibrium



ANALISI DI ASSOCIAZIONE

Nell'analisi statistica preliminare (Tabella 6), in cui non si è tenuto conto dei dati genetici, l'effetto fisso del Fondo è risultato significativo per il Rapporto d'Arrivo, per l'Indice di montepremi e per l'Indice di successo per $P < 0.001$. Per quel che riguarda questo effetto i cavalli a fondo arabo hanno fatto registrare i valori migliori per tutte le variabili. Tale risultato, sebbene in parte inatteso, può essere giustificato dal fatto che questi animali conservino rispetto a quelli a fondo inglese una certa rusticità sia nei caratteri morfologici ma soprattutto nell'indole.

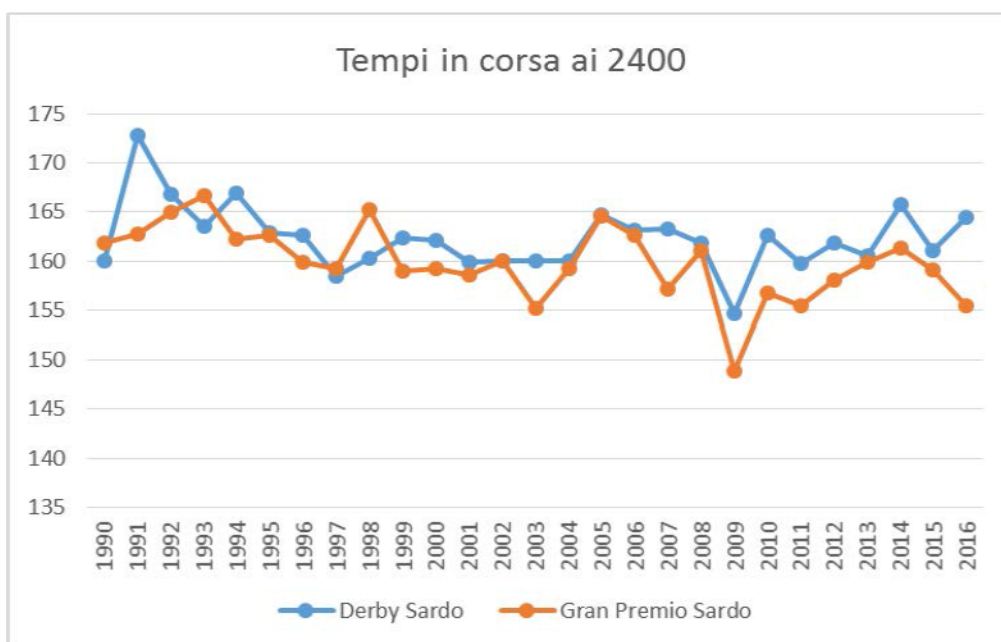
Tabella 6. Analisi statistica preliminare

		FONDO			SESSO		CLASSE DISTANZA	CLASSE PESO
		Arabo	Inglese		Maschio	Femmina		
RAPPORTO D'ARRIVO	***	0,56 ^A	0,48 ^B	ns	0,51	0,53	ns	***
FValue	17,69			0,95			1,72	9,35
INDICE MONTEPREMI	***	0,15 ^A	0,11 ^B	**	0,12 ^A	0,14 ^B	*	***
FValue	17,37			7,83			3,52	8,68
INDICE DI SUCCESSO	***	999,8 ^A	699,90 ^B	***	634,72 ^A	1065,01 ^B	***	**
FValue	11,12			20,14			11,43	5,49

Questo risultato ha stimolato un'ulteriore indagine sullo stesso argomento. Ho ritenuto opportuno analizzare i tempi di percorrenza di cavalli a fondo inglese e arabo, sottoponendo al test statistico di Student i dati relativi ai tempi di corsa del primo classificato in 27 corse classiche disputate in Sardegna, di due tipi, dall'anno 1990 al 2016, sui 2400 metri.

La prima è riservata ai cavalli a fondo arabo (Derby Sardo) e l'altra (Gran Premio Sardo) ai fondo inglese. I cavalli a fondo inglese presentano maggiore velocità, come si può notare nel Grafico 2.

Grafico 2. Tempi del primo classificato in corse riservate rispettivamente a cavalli a fondo arabo (Derby Sardo) e a fondo inglese (Gran Premio Sardo), $P < 0.05$.



Tuttavia l'influenza del sangue arabo, nella razza Anglo Araba, porta sicuramente cavalli più resistenti e volenterosi, una caratteristica descritta dagli allenatori e da chi ogni giorno lavora con cavalli Anglo Arabi da corsa, che risulta un fattore estremamente importante, corrispondente alla determinazione che l'animale mostra nel dare il meglio nella gara competendo individualmente coi suoi simili. I soggetti fondo arabo risultano

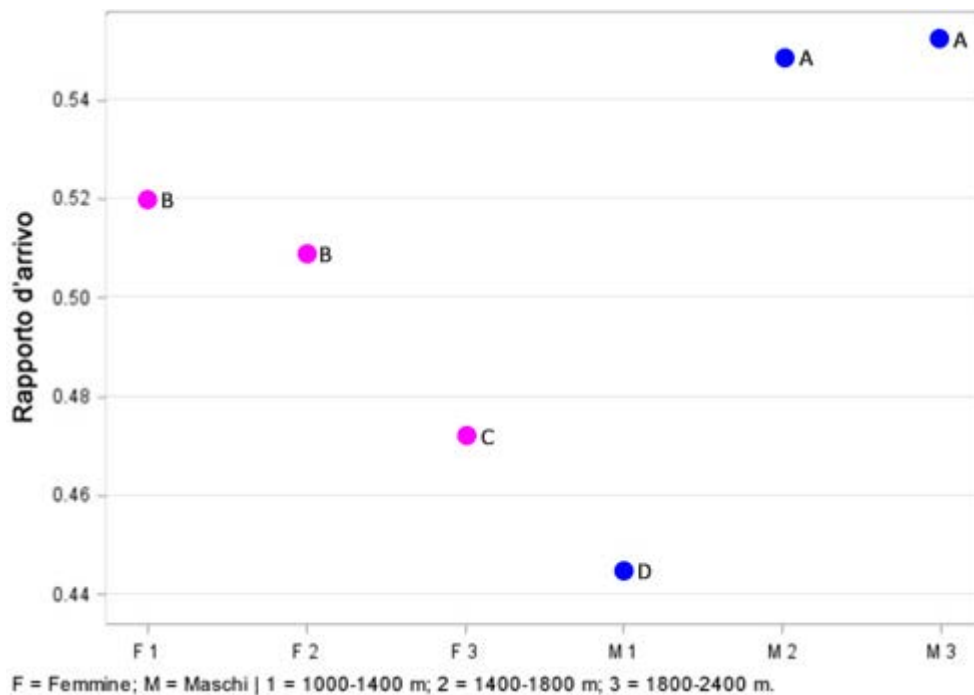
animali che nel tempo registrano risultati migliori. Questo dato è confortato anche dal fatto che, considerando la carriera a tre anni dei cavalli campionati, riescano a disputare, in media, 1,4 corse in più rispetto ai fondo inglese (dato non mostrato).

Il sesso ha avuto effetto sull'Indice di montepremi ($P < 0.01$) e in misura maggiore sull'indice di successo ($P < 0.001$). Per queste variabili i maschi hanno fatto registrare i valori più alti. Il sesso non ha influenzato il rapporto d'arrivo. In questo caso gli Anglo Arabi si sono comportati come altre razze studiate: i maschi di razza Purosangue Inglese risultano infatti più competitivi delle femmine (Harkins et al., 1992) e hanno più probabilità di avere una carriera più duratura (Bailey et al., 1999). Questo può essere spiegato col fatto che le femmine risentono maggiormente lo stress dovuto alle competizioni (Martínez et al., 1988) e, in generale, hanno risposte fisiologiche più accentuate agli agenti stressogeni rispetto ai maschi (Kusano et al., 2016). Tale risultato è stato conseguito anche da Pazzola et al. (2015) in uno studio che includeva cavalli di razza Anglo Araba, dove si è potuto notare che le femmine sottoposte a situazioni di stress presentavano livelli di β -endorfine più alti rispetto ai maschi/castroni.

Anche l'effetto fisso della classe di distanza (Tabella 6) non ha fatto registrare significatività per il rapporto d'arrivo, mentre è risultata significativa per l'indice di montepremi ($P < 0.05$) e per l'indice di successo ($P < 0.001$). All'interno delle classi di distanza è stato possibile rilevare come, sebbene il sesso non sia risultato significativo per il rapporto d'arrivo,

le prestazioni dei maschi vadano a migliorare con l'aumentare della distanza mentre quelle delle femmine seguono il trend inverso (Immagine 10). Inoltre gli animali di sesso femminile che corrono sulle brevi distanze (Classe 1) fanno registrare valori migliori rispetto a quelli che corrono sulla media e sulla lunga distanza dello stesso sesso e valori migliori rispetto ai maschi che gareggiano sulla breve distanza. I maschi risultano più performanti nelle classi 2 e 3, ed anche in questo caso le prestazioni migliori dei maschi possono essere spiegate col fatto che in generale risultino più competitivi delle femmine (Harkins et al., 1992).

Immagine 10. Confronto tra maschi e femmine per classe di distanza.



La Classe di peso (Tabella 6) ha avuto effetto su tutti i parametri considerati con $P < 0.001$ per Rapporto d'arrivo e Indice di montepremi e $P < 0.01$ per l'Indice di successo.

In seguito è stata condotta un'analisi in cui si è tenuto conto dell'effetto di ogni singolo SNP. Nella tabella (Tabella 7) sono riportati i valori relativi allo SNP g.66,493,737, l'unico che ha mostrato significatività per le due variabili Rapporto d'arrivo e per l'Indice di successo.

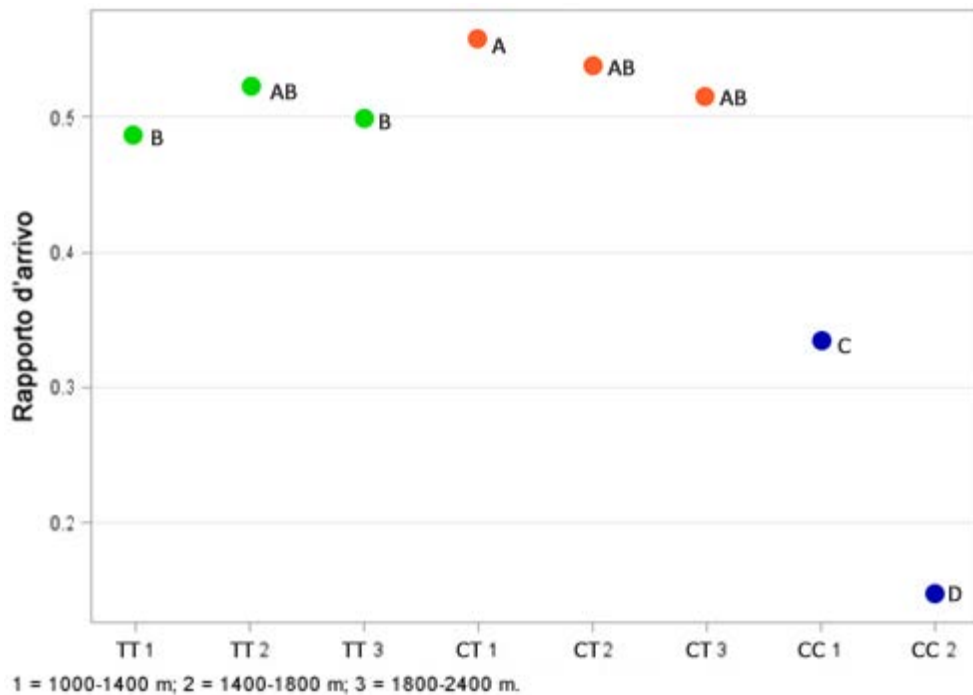
Tabella 7. Analisi statistica considerando lo SNP g.66,493,737.

	g.66,493,737	FONDO	SESSO	CLASSE DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	*	***	ns	ns	***
FValue	3,67	20,45	1,40	2,00	9,35
INDICE MONTEPREMI	Ns	***	**	*	***
FValue	2,40	21,79	8,95	4,36	8,95
INDICE DI SUCCESSO	*	***	***	***	**
FValue	4,04	15,93	21,94	9,84	5,25

Per questo SNP è stata condotta anche un'analisi tramite l'utilizzo dei contrast ortogonali. Tale analisi ha messo in evidenza come il genotipo TT (0,514) ottenga le migliori prestazioni rispetto al genotipo CC (0,260) per quel che concerne il rapporto d'arrivo (Immagine 11). Il genotipo CT (0,554) ha fatto registrare valori migliori sia del genotipo TT che del genotipo CC. Questo si potrebbe spiegare con l'effetto positivo che l'eterosi può apportare nelle performance (Hansson et al., 2002; Chapman et al.,

2009). Tale fenomeno si è potuto notare anche in cavalli adulti, trottatori francesi, eterozigoti a un locus del gene DMRT3, che ottenevano migliori prestazioni sportive degli omozigoti (Ricard 2015).

Immagine 11. Contrast ortogonali relativi ai genotipi allo SNP g.66,493,737, in relazione al Rapporto d'arrivo.

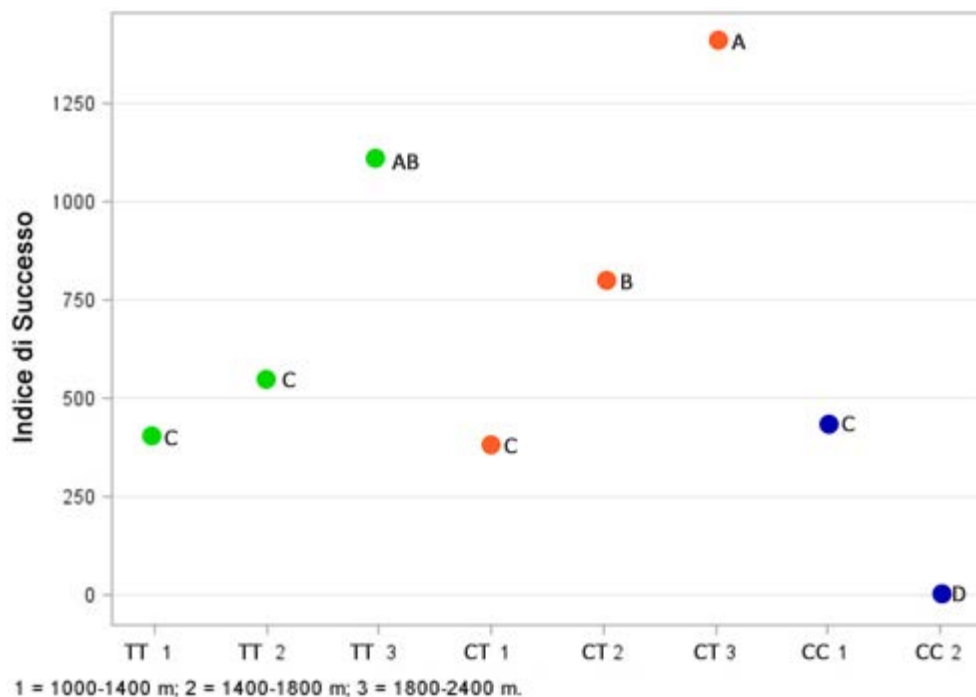


Questo risultato, sebbene effettivamente significativo per quel che riguarda la statistica, è comunque da considerare con precauzione in quanto solo gli animali con genotipo TT e CT hanno partecipato a corse su tutte e tre le classi di distanza mentre gli animali con genotipo CC hanno partecipato solamente a corse ricadenti nelle classi di distanza 1 e 2. Tuttavia, sebbene non confortati dai dati fenotipici, si potrebbe supporre che

i cavalli CC non vadano ad incrementare le prestazioni con l'aumento della distanza. Questo sarebbe in linea con i risultati rilevati in altri studi su cavalli Purosangue Inglese in cui i cavalli con genotipo CC hanno mostrato le loro migliori performance nelle corte distanze (1000-1600 mt) (Hill et al., 2010a; Hill et al., 2010c; Hill et al., 2012; Tozaki et al., 2011).

Per quel che riguarda l'Indice di successo è stato evidenziato come gli animali con genotipo TT di questo SNP abbiano fatto registrare prestazioni migliori rispetto agli animali CC (Immagine 12) sulla classe di distanza 2 (media), mentre si siano comportati in maniera analoga sulla classe di distanza 1 (breve).

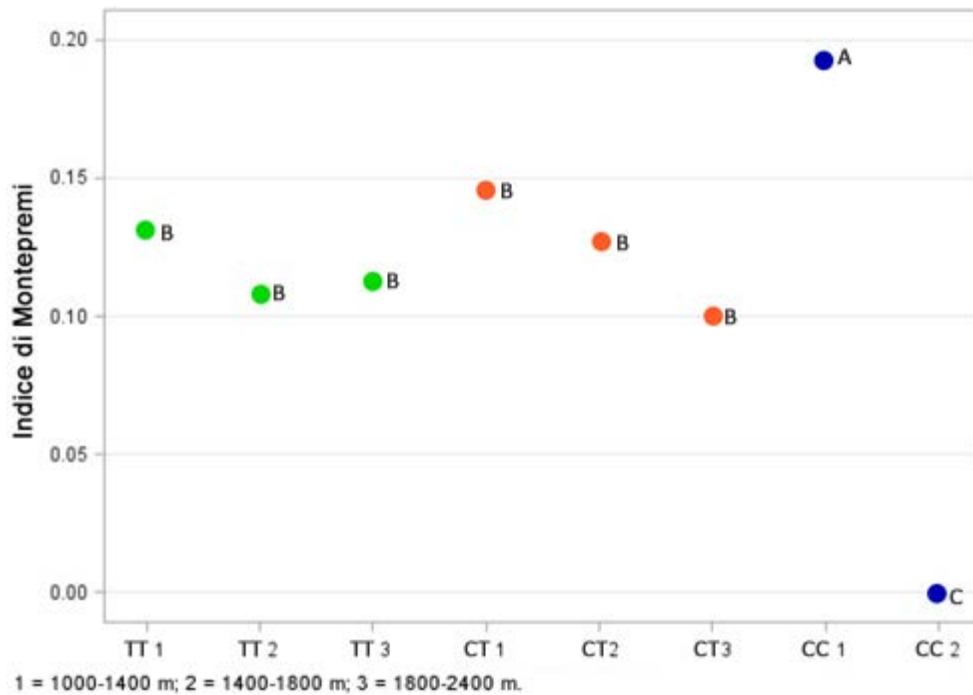
Immagine 12. Contrast ortogonali relativi ai genotipi allo SNP g.66,493,737, in relazione all'Indice di successo.



Anche in questo caso è emerso come gli animali CT ottengano prestazioni migliori rispetto ai genotipi omozigoti. Per il genotipo TT e CT è stato possibile fare un ulteriore raffronto mettendo in evidenza come sulla classe di distanza 1 i due genotipi si comportino allo stesso modo ma, con l'aumentare della distanza i genotipi CT ottengono prestazioni sempre migliori rispetto ai genotipi TT. Anche per questa variabile è possibile supporre un effetto di eterosi che consente agli animali eterozigoti di ottenere prestazioni migliori rispetto agli omozigoti.

Nonostante l'elaborazione statistica preliminare non abbia mostrato nello SNP g.66,493,737 significatività per l'Indice di montepremi ($P=0,09$), attraverso i contrast è stato possibile mettere in evidenza come gli animali con genotipi CC abbiano delle prestazioni superiori rispetto agli animali TT e CT sulla classe di distanza 1 e di contro molto inferiori già sulla classe di distanza 2 (Immagine 13). Dal confronto tra i genotipi TT e CT è stato possibile mettere in evidenza come sulla classe di distanza 1 e 3 tali genotipi si comportino in maniera analoga mentre il genotipo CT presenta risultati migliori sulla classe di distanza 2.

Immagine 13. Contrast ortogonali relativi ai genotipi allo SNP g.66,493,737, in relazione all'Indice di montepremi.

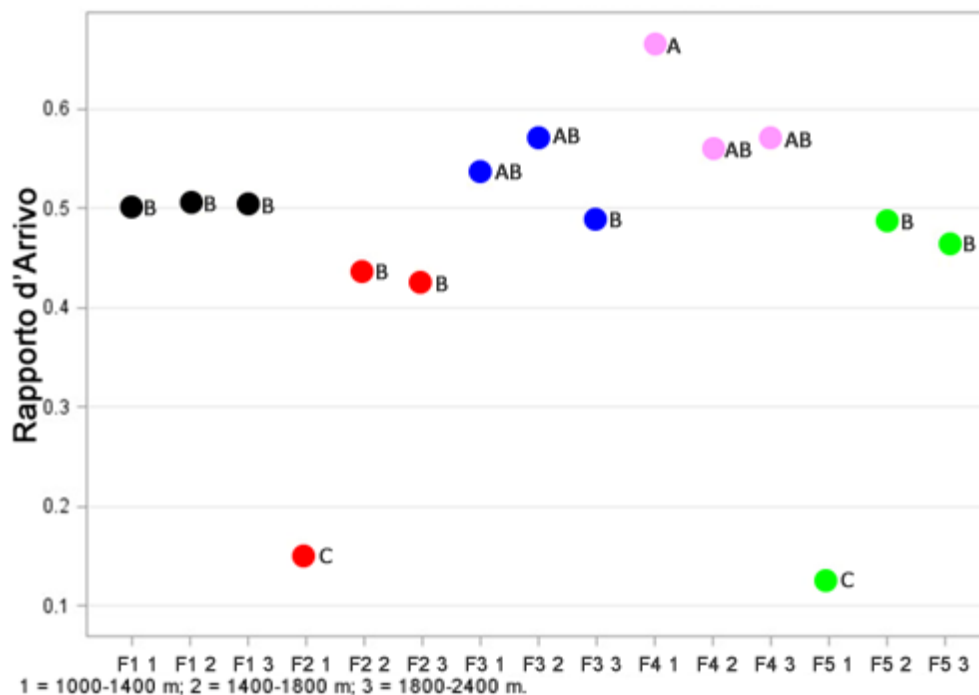


Anche in questo caso i risultati sono parzialmente in linea con lavori sul Purosangue Inglese dove il genotipo CC mostra le sue migliori prestazioni sempre nelle corte distanze. Tali prestazioni vanno a decrescere con l'aumentare della distanza dove gli omozigoti CT e gli eterozigoti TT appaiono più competitivi superando la soglia dei 1600 mt (Hill et al., 2010a; Hill et al., 2010c; Hill et al., 2012; Tozaki et al., 2011). Gli eterozigoti Anglo Arabi della presente tesi si comportano allo stesso modo dei Purosangue Inglese nella classe di distanza 2 mentre è curioso vedere come sulla classe di distanza 1 e 3 gli omozigoti TT e gli eterozigoti CT Anglo Arabi ottengano gli stessi risultati. Tale esito, non in linea coi lavori sopra citati, si può spiegare con quanto detto riguardo a questa razza: l'apporto

secolare di sangue arabo e successivamente di sangue inglese ha portato a dei soggetti estremamente versatili che hanno conservato buone caratteristiche di velocità e ottime caratteristiche di resistenza.

Un risultato interessante è stato ottenuto classificando gli animali secondo la percentuale di sangue arabo presente in 5 classi (F1 = <35%; F2= tra 35.1 e 45%, F3= tra 45.1 e 55 %; F4 = tra 55.1 e 65 % e F5= oltre il 65%). Dall'analisi statistica è infatti emerso che gli animali classificabili nei livelli 3 e 4 ottengono risultati migliori rispetto a quelli appartenenti alle altre classi. In particolare, gli animali della classe 3 ottengono risultati migliori nelle classi di distanza 1 e 2, mentre gli animali della classe 4 fanno registrare migliori performance su tutte le tre distanze (Immagine 14).

Immagine 14. Interazione tra le 5 classi del Fondo e la distanza in corsa.



Questo evidenzia come il fenomeno di eterosi di cui si è già discusso sia rimarcato in quegli animali con percentuali di sangue vicine al 50%, sottolineando la necessità di conoscere e promuovere il corretto bilanciamento delle tre razze da mettere in selezione. Inoltre questo risultato è la prova che, il meticciamiento bilanciato tra il Purosangue Inglese, l'Anglo Arabo e il Purosangue Arabo, ha portato a dei soggetti che possono competere indifferentemente sia alle medie che alle lunghe distanze. Anche il fatto che tra i 180 cavalli prelevati solamente due soggetti avessero il genotipo CC ci fa capire che l'azione selettiva su questa razza è stata compiuta ricercando caratteristiche soprattutto di resistenza, date principalmente dal substrato materno.

Nelle tabelle A-I sono riportati i valori relativi ai singoli che non hanno presentato significatività. Da queste tabelle si può capire quindi quanto peso e importanza abbiano i fattori non genetici per le prestazioni dei cavalli Anglo Arabi da corsa.

Tabelle A-I. FValue degli SNPs che non hanno mostrato significatività.

.A g.66,491,622		FONDO	SESSO	CLASSE	DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	ns	***	ns		ns	***
FValue	1,31	18,84	0,73		1,85	8,39
INDICE MONTEPREMI	ns	***	**		*	***
FValue	0,00	19,01	6,66		3,52	8,32
INDICE DI SUCCESSO	ns	***	***		***	*
FValue	0,94	13,76	17,37		12,66	3,16

.B <u>g.66,491,612</u>		FONDO	SESSO	CLASSE DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	ns	***	ns	ns	***
FValue	0,12	17,46	0,77	1,81	8,61
INDICE MONTEPREMI	ns	***	**	*	***
FValue	0,55	17,11	6,82	3,62	8,44
INDICE DI SUCCESSO	ns	***	***	***	*
FValue	0,96	12,32	17,39	12,63	3,24

.C <u>g.66,491,515</u>		FONDO	SESSO	CLASSE DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	ns	***	ns	ns	***
FValue	1,47	19,09	1,03	1,96	8,27
INDICE MONTEPREMI	ns	***	**	*	***
FValue	0,18	19,17	6,71	3,53	8,32
INDICE DI SUCCESSO	ns	***	***	***	*
FValue	1,11	13,64	16,16	12,88	3,37

.D <u>g.66,493,828</u>		FONDO	SESSO	CLASSE DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	ns	***	ns	ns	***
FValue	1,14	18,35	0,94	1,77	9,09
INDICE MONTEPREMI	ns	***	**	*	***
FValue	0,00	17,20	7,82	3,52	8,67
INDICE DI SUCCESSO	ns	**	***	***	**
FValue	1,27	10,40	20,21	11,51	5,56

.E <u>g.66,493,775</u>		FONDO	SESSO	CLASSE DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	ns	***	ns	ns	***
FValue	0,02	17,58	0,93	1,72	9,32
INDICE MONTEPREMI	ns	***	**	*	***
FValue	0,67	16,41	8,15	3,55	8,72
INDICE DI SUCCESSO	ns	**	***	***	**
FValue	0,19	10,67	20,31	11,37	5,50

.F <u>g.66,493,745</u>		FONDO	SESSO	CLASSE	DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	ns	***	ns	ns	ns	***
FValue	0,02	17,58	0,93	1,72	1,72	9,32
INDICE MONTEPREMI	ns	***	**	*	*	***
FValue	0,67	16,41	8,15	3,55	3,55	8,72
INDICE DI SUCCESSO	ns	**	***	***	***	**
FValue	0,19	10,67	20,31	11,37	11,37	5,50

.G <u>g.66,493,582</u>		FONDO	SESSO	CLASSE	DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	ns	***	ns	ns	ns	***
FValue	0,54	17,70	0,99	1,74	1,74	9,24
INDICE MONTEPREMI	ns	***	**	*	*	***
FValue	0,63	16,62	7,80	3,73	3,73	8,44
INDICE DI SUCCESSO	ns	***	***	***	***	**
FValue	0,90	12,16	20,61	11,36	11,36	5,41

.H <u>g.66,493,525</u>		FONDO	SESSO	CLASSE	DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	ns	***	ns	ns	ns	***
FValue	0,02	17,58	0,93	1,72	1,72	9,32
INDICE MONTEPREMI	ns	***	**	*	*	***
FValue	0,67	16,41	8,15	3,55	3,55	8,72
INDICE DI SUCCESSO	ns	**	***	***	***	**

FValue 0,19 10,67 20,31 11,37 5,50

.I <u>g.66,493,519</u>		FONDO	SESSO	CLASSE	DISTANZA	CLASSE PESO
RAPPORTO D'ARRIVO	ns	***	ns	ns	ns	***
FValue	1,07	19,70	1,11	1,59	1,59	9,23
INDICE MONTEPREMI	ns	***	**	*	*	***
FValue	2,47	21,75	8,48	3,62	3,62	8,33
INDICE DI SUCCESSO	ns	***	***	***	***	**
FValue	2,73	15,33	20,96	11,83	11,83	5,30

5. Conclusioni

Alcuni polimorfismi del gene MSTN sono stati associati a diversi caratteri fenotipici che portano principalmente a uno sviluppo più o meno accentuato delle masse muscolari. Tale fenomeno è stato osservato e studiato sia nell'uomo che in parecchie specie animali.

In cavalli di razza Purosangue Inglese è stato individuato un sito polimorfico, g.66493737, localizzato nell'introne del gene MSTN, fortemente associato con prestazioni migliori a seconda delle distanze in corsa e in egual misura associato allo sviluppo delle masse muscolari. Considerando la distanza in corsa nella quale i cavalli hanno ottenuto le prestazioni migliori, gli omozigoti CC sono apparsi particolarmente performanti nelle brevi distanze (1000-1600 mt), gli eterozigoti CT nelle medie distanze (1400-2400 mt), mentre gli omozigoti TT sono risultati vincenti sulle lunghe distanze (> 2000 mt).

Nella presente ricerca è stato analizzato il polimorfismo g.66.493.737 del gene MSTN in cavalli di razza Anglo Araba da corsa. I tre genotipi rilevati hanno mostrato un effetto significativo per i fenotipi considerati. Gli animali eterozigoti si sono dimostrati i più performanti per quanto riguarda il Rapporto d'arrivo, ossia l'inverso del rapporto tra il numero di cavalli partecipanti alla corsa e la posizione ottenuta in classifica, mentre per l'Indice di successo, ossia il prodotto tra il rapporto d'arrivo e il premio vinto, competono allo stesso modo gli omozigoti nella classe delle brevi distanze (classe 1) e risultano sempre superiori nelle medie (classe 2) e lunghe distanze (classe 3). Attraverso l'utilizzo dei contrast ortogonali si è

potuto dimostrare che, per quanto riguarda l'Indice di montepremi, ottenuto dal rapporto tra il montepremi totale della corsa ed il premio in denaro vinto, i cavalli eterozigoti risultano i più competitivi nelle medie distanze mentre gli omozigoti CC sono superiori nelle brevi distanze, CT e TT mostrano gli stessi risultati nelle lunghe e corte distanze.

L'indagine ha permesso inoltre di evidenziare che in tale razza vi è una maggiore variabilità genetica, rispetto al Purosangue Inglese più ampiamente studiato, dato confermato dal fatto che non sia stato trovato nessun blocco di associazione nell'analisi del Linkage Disequilibrium.

Dati estremamente interessanti sono scaturiti dall'analisi delle informazioni fenotipiche. I maschi hanno dimostrato di aumentare le loro prestazioni con l'aumentare della distanza, mentre le femmine si sono comportate in maniera inversa. Inoltre, i maschi sono risultati migliori per quanto riguarda l'Indice di montepremi e l'Indice di successo.

Questi risultati sono in linea coi dati bibliografici rilevati in altre razze equine.

È risultato importante scoprire come, gli animali con una percentuale di sangue arabo superiore al 50% (Fondo arabo), siano risultati più competitivi di quelli col Fondo inglese. Nonostante questi ultimi abbiano caratteristiche che li rende più veloci, i cavalli che hanno una percentuale di sangue arabo che oscilla dal 55.1 al 65 % hanno fatto registrare i risultati migliori considerando tutte le classi di distanza.

Concludendo, si può ipotizzare che il cavallo Anglo Arabo da corsa sia in generale un soggetto abbastanza versatile. La selezione attuata ha sicuramente portato a cavalli soprattutto resistenti che si adattano facilmente e indifferentemente a distanze in corsa che variano dai 1400 ai 2400 mt. Al contrario il substrato arabo della razza, proveniente dalle linee materne, non ha portato a soggetti particolarmente veloci. Questo è confermato dal fatto che nel campione analizzato vi siano solamente due soggetti con genotipo che predisponga gli animali alla velocità.

Questi dati e la variabilità genetica riscontrata portano ad affermare che su tale razza sia importante approfondire l'aspetto genetico, e implementare gli studi in questo senso.

Tali dati risulterebbero utili per una migliore selezione e per un miglior bilanciamento degli incroci da attuare. Inoltre, le conoscenze genetiche legate alle performance sportive potrebbero portare un valore aggiunto ai soggetti allevati.

6. Bibliografia

Emanuela Pira, Analisi dei polimorfismi del gene della miostatina (*mstn*) e loro associazione con le performance del cavallo Anglo Arabo da corsa
Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

- Amthor H.**, Nicholas G., McKinnell I., Kemp C.F., Sharma M., Kambadur R., Patel K. 2004. Follistatin complexes myostatin and antagonises myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev. Biol.*, 270 19–30.
- Bailey C.J.**, Reid S.W., Hodgson D.R., Rose R.J. 1999. Factors associated with time until first race and career duration for Thoroughbred racehorses. *American Journal of Veterinary Research*, 60, 1196-1200.
- Baron E.E.**, Lopes M.S., Mendonça D., da Câmara Machado A. 2011. SNP identification and polymorphism analysis in exon 2 of the horse myostatin gene. *Anim Genet*, 43, 229-32.
- Barrett J.C.**, Fry B., Maller J. & Daly M.J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21 263-265.
- Bhangale T.R.**, Stephens M. & Nickerson D.A. 2006. Automating resequencing-based detection of insertion-deletion polymorphisms. *Nature Genetics*, 38 1457-1462.
- Binns M.M.**, Boehler D.A., Lambert D.H. 2010. Identification of the myostatin locus (MSTN) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in the USA. *Anim Genet*, 41 Suppl 2:154-8.
- Bogdanovich S.**, Perkins K., Krag T., Whittemore L.A., Khurana T. 2005. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J.*, 19:543–549.

- Bower M.A.**, McGivney B.A., Campana M.G., Gu J., Andersson L.S., Barrett E., Davis C.R., Mikko S., Stock F., Voronkova V., Bradley D.G., Fahey A.G., Lindgren G., MacHugh D.E., Sulimova G., Hill E.W. 2012. The genetic origin and history of speed in the Thoroughbred racehorse. *Nature Communications*, 3:643.
- Carlson C.J.**, Booth F.W., Gordon S.E. 1999. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am. J. Physiol.*, 277 R601–R606.
- Chang H.**, Brown C.W., Matzuk M.M. 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growthfactor-beta superfamily. *Endocr Rev*, 23(6):787-823.
- Chapman J.R.**, Nakagawa S., Coltman D.W., Slate J., Sheldon B.C. 2009. A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. *Mol Ecol.*, 18, 2746-65.
- Charlier C.**, Coppieters W., Farnir F., Grobet L., Leroy P.L., Michaux C., Mni M., Schwers A., Vanmanshoven P., Hanset R. 1995. The mh gene causing double muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. *Mamm. Genome* 6, 788–792.
- Cherchi R.**, Biggio G.P., Giontella A. Cavallo Anglo Arabo, Selezione e Prospettive.
- Cunningham E.P.**, Dooley J.J., Splan R.K. & Bradley D.G. 2001. Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Animal Genetics*, 32, 360–4.

- Dall'Olio S.**, Fontanesi L., Nanni Costa L., Tassinari M., Minieri L., Falaschini A., 2010. Analysis of horse myostatin gene and identification of single nucleotide polymorphisms in breeds of different morphological types. *J. Biomed. Biotechnol*, (pii: 542945) 1–11.
- Dall'Olio S.**, Wang Y., Sartori C., Fontanesi L., Mantovani R. 2014. Association of myostatin (MSTN) gene polymorphisms with morphological traits in the Italian Heavy Draft Horse breed. *Livestock Science*, 160, 29-36.
- den Dunnen, J.T.**, Dalgleish, R., Maglott, D.R., Hart, R.K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., Roux, A.F., Smith, T., Antonarakis, S. E., Taschner, P. E.M. and on behalf of the Human Genome Variation Society (HGVS), the Human Variome Project (HVP), and the Human Genome Organisation (HUGO). 2016. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation*, 37: 564–569. doi:10.1002/humu.22981.
- Deveaux V.**, Cassar-Malek I., Picard B. 2001. Comparison of contractile characteristics of muscle from Holstein and doublemuscled Belgian Blue foetuses. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 131, 21–9.
- Ebisawa T.**, Fukuchi M., Murakami G., Chiba T., Tanaka K., Imamura T., Miyazono K. 2001. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.*, 276 12477–12480.

- Ekaza D.J.**, Cabello G. 2006. Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res*, 312:2401-2414
- Ekaza D.J.**, Cabello G. 2007. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Current Opinion in Pharmacology*, 7:310–315.
- Evans D.L.**, Harris R.C., Snow D.H. 1993. Correlation of racing performance with blood lactate and heart rate after exercise in thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 25, 441–445.
- Ewing L.** & Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8, 186-194.
- Ewing L.**, Hillier L., Wendl M.C & Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8 175-185.
- Gaffney B.**, Cunningham E.P. 1988. Estimation of genetic trend in racing performance of thoroughbred horses. *Nature*, 332 (6166): 722-4.
- Gonzalez-Cadavid N.F.**, Taylor W.E., Yarasheski K., Sinha-Hikim I., Ma K., Ezzat S., Shen R., Lalani R., Asa S., Mamita M., Nair G., Arver S., Bhasin S. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:14938-14943.

- Gordon D.** 2004. Viewing and editing assembled sequences using Consed.
In: Baxevanis D, Davison DB (ed) Current protocols in bioinformatics.
Wiley, New York, pp 1121-1124.
- Gordon D., Abajian C. & Green P.** 1998. Consed: a graphical tool for
sequence finishing. *Genome Research*, 8 195-202.
- Gordon D., Desmarais C. & Green P.** 2001. Automated finishing with
autofinish. *Genome Research*, 11 614-625.
- Gratani L.** 1988a. L'arabo nella genesi e nell'evoluzione del cavallo sardo.
Edagricole.
- Gratani L.** 1988b. L'anglo Arabo Sardo. Ediber, Edizioni Equestri.
- Gray A.M., Mason A.J.** 1990. Requirement for activin A and transforming
growth factor- β 1 pro- regions in homodimer assembly. *Science*,
247:1328–1330.
- Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J.,
Schoeberlein A., Dunner S., Ménéssier F., Massabanda J., Fries R.,
Hanset R., Georges M.** 1997. A deletion in the bovine myostatin gene
causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genet*, 17:71.
- Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J.,
Schoeberlein A., Dunner S., Ménéssier F., Massabanda J., Fries R.,
Hanset R., Georges M.** 1997. A deletion in the bovine myostatin gene
causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet*, 17:71–74.
- Grobet L., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C.,
Ménéssier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M.** 1998. Molecular

definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Genome* 9, 210–213.

Gu J., MacHugh D.E., McGivney B.A., Park S.D.E., Katz L.M., Hill E.W. 2010. Association of sequence variants in CKM (creatine kinase, muscle) and COX4I2 (cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2) genes with racing performance in Thoroughbred horses. *Equine Vet J*, 42:569-75. b

Gu J., Orr N., Park S., Katz L.M., Sulimova G., MacHugh D.E., Hill E.W. 2009. A genome scan for positive selection in thoroughbred horses. *Plos One*, 4:57-67. a

Gunn H.M. 1987. Muscle, bone and fat proportions and muscle distribution of thoroughbreds and quarter horses. *Equine exercise physiology 2: Proceedings of the Second International Conference on Equine Exercise Physiology*, http://www.iceep.org/pdf/iceep2/_1129101114_001.pdf.

Haidet A.M., Rizo L., Handy C., Umapathi P., Eagle A., Shilling C., Boue D., Martin P.T., Sahenk Z., Mendell J.R., Kaspar B.K. 2008. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(11):4318 4322.

Hansson B., Westerberg L.. 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol. Ecol.*, 11:2467–2474.

- Harkins J.D.**, Kamerling S.G., Church G. 1992. Effect of competition on performance of thoroughbred racehorses. *Journal of Applied Physiology*, Vol. 72 no. 3.
- Hennebry A.**, Berry C., Siriatt V., O'Callaghan P., Chau L., Watson T., Sharma M., Kambadur R. 2009. Myostatin regulates fiber type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 296, C525–34.
- Hill E.W.**, Bradley D.G., Al-Barody M., Ertugrul O., Splan R.K., Zakharov I., Cunningham E.P. 2002. History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Anim Genet*, 33, 287-94.
- Hill E.W.**, Fonseca R.G., McGivney B.A., Gu J., MacHugh D.E., Katz L.M. 2012. MSTN genotype (g.66493737C/T) association with speed indices in Thoroughbred racehorses. *J Appl Physiol*, 112(1):86-90.
- Hill E.W.**, Gu J., Eivers S.S., Fonseca R.G., McGivney B.A., Govindarajan P., Orr N., Katz L.M., MacHugh D.E. 2010. A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLoS One*, 5: e8645. c
- Hill E.W.**, Gu J., McGivney B.A., MacHugh D.E. 2010. Targets of selection in the Thoroughbred genome contain exercise-relevant gene SNPs associated with elite racecourse performance. *Anim Genet*, 41 Suppl 2:56-63. b

Hill E.W., Katz L.M., MacHugh D.E. 2013. Genomics of performance. Equine genomics, First Edition.

Hill E.W., McGivney B.A., Gu J., Whiston R., Machugh D.E. 2010. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. BMC Genomics, 11:552. A

Hill E.W., Ryan D.P., MacHugh D.E. 2012. Horses for courses: a DNA-based test for race distance aptitude in thoroughbred racehorses. Recent Pat DNA Gene Seq, 6, 203-8.

<http://angloarabhorses.com/> Ultima consultazione in data 12 Dicembre 2016.

<http://www.unire.gov.it/index.php/ita/Operatori/Banca-dati> Ultima consultazione in data 12 Dicembre 2016.

<http://www.unire.gov.it/index.php/ita/Operatori/Banca-dati> Ultima consultazione in data 12 Dicembre 2016.

<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/6176> Ultima consultazione in data 12 Dicembre 2016.

<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/6177> Ultima consultazione in data 12 Dicembre 2016.

Jiang M.S., Liang L.F., Wang S., Ratovitski T., Holmstrom J., Barker C., Stotish R. 2004. Characterization and identification of the inhibitory

domain of GDF-8 propeptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(3):525–531.

Karim L., Coppieters W., Grobet L., Valentini A., Georges M. 2000.

Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim. Genet.*, 31 396–399.

Kota J., Handy C., Haidet A.M., Montgomery C.L., Eagle A., Rodino-

Klapac L.R., Tucker D., Shilling C.J., Therlfall W.R., Walker C.M., Weisbrode S.E., Janssen P.M.L., Clark K.R., Sahenk Z., Mendell J.R., Kaspar B.K. 2009. Follistatin gene delivery enhances muscle growth and strength in nonhuman primates. *Sci Transl Med.*, 1(6):1–8.

Kusano K., Yamazaki M., Kiuchi M., Kaneko K., Koyama K. 2016.

Reference range of blood biomarkers for oxidative stress in Thoroughbred racehorses (2-5 years old). *J Equine Sci.*, 27, 125-129.

Lee S.J., 2010. Extracellular Regulation of Myostatin: A Molecular

Rheostat for Muscle Mass. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 10: 183–194.

Lee S.J., McPherron A.C. 2001. Regulation of myostatin activity and

muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:9306–9311.

Levine M.A. 1999. The origins of horse husbandry on the Eurasian Steppe.

In Levine M.A., Rassamakin Y.Y., Kislenko A.M. & Tatarintseva N.S. (eds.), Late prehistoric exploitation of the Eurasian steppe (pp. 5–58). Cambridge: McDonald Institute for Archaeological Research.

- Li R.**, Liu D.H., Cao C.N., Wang S.Q., Dang R.H., Lan X.Y., Chen H., Zhang T., Liu W.J., Lei C.Z. 2014. Single nucleotide polymorphisms of myostatin gene in Chinese domestic horses. *Gene*, 15;538(1):150-4.
- Maccatrozzo L.**, Bargelloni L., Radaelli G., Mascarello F., Patarnello T. 2001. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Mar Biotechnol (NY)*, 3:224-230.
- Martínez R.**, Godoy A., Naretto E., White A. 1988. Neuroendocrine changes produced by competition stress on the Thoroughbred race horse. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 91, 599-602.
- McGivney B.A.**, Browne J.A., Fonseca R.G., Katz L.M., MacHugh D.E., Whiston R., Hill E.W. 2012. MSTN genotypes in Thoroughbred horses influence skeletal muscle gene expression and racetrack performance. *Animal Genetics*, 43, 810-812.
- McGivney B.A.**, McGettigan P.A., Browne J.A., Evans A.C., Fonseca R.G., Loftus B.J., Lohan A., MacHugh D.E., Murphy B.A., Katz L.M., Hill E.W. 2010. Characterization of the equine skeletal muscle transcriptome identifies novel functional responses to exercise training. *BMC Genomics*, 11: 398.
- McPherron A.C.**, Lawler Ann M., Lee Se-Jin. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 387:83. A

- McPherron A.C.**, Lee Se-Jin. 1996. Growth factors and cytokines in health and disease vol. 1B (eds LeRoith, D. and Bondy, C.), 357-393.
- McPherron A.C.**, Lee Se-Jin. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12457.
- B**
- Millan F.A.**, Denhez F., Kondaiah P., Akhurst R.J. 1991. Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. Development, 111:131.
- Mosher D.S.**, Quignon P., Bustamante C.D., Sutter N.B., Mellersh C.S., Parker H.G., Ostrande E.A. 2007. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. PLoS, Genet 3: e79.
- Nakamura T.**, Takio K., Eto Y., Shibai H., Titani K., Sugino H. 1990. Activin-binding protein from rat ovary I follistatin. Science 247, 836–838.
- Pazzola M.**, Pira E., Sedda G., Vacca G.M., Cocco R., Sechi S., Bonelli P., Nicolussi P. 2015. Responses of hematological parameters, beta-endorphin, cortisol, reactive oxygen metabolites, and biological antioxidant potential in horses participating in a traditional tournament. J Anim Sci., 93, 1573-80.
- Pirottin D.**, Grobet L., Adamantidis A., Farnir F., Herens C., Daa Schroder H., Georges M. 2005. Transgenic engineering of male-specific muscular hypertrophy. Proc Natl Acad Sci USA., 102(18): 6413–6418.

- Polager S.**, Ginsberg D. 2009. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer*, 9(10):738-748.
- Ricard A.** 2015. Does heterozygosity at the DMRT3 gene make French trotters better racers?. *Genet Sel Evol.*, 26;47:10.
- Roberts A.B.**, Flanders K.C., Heine U.I., Jakowlew S., Kondaiah P., Kim S.J., Sporn M.B. 1990. Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 327(1239):145-154.
- Satta D.** 2000. Chilivani, ottant'anni di ippica in Sardegna. Soter Editrice.
- Schröder W.**, Klostermann A., Distl O. 2010. Candidate genes for physical performance in the horse. *Vet J.*, Oct;190(1):39-48.
- Sharma M.**, Kambadur R., Matthews K.G., Somers W.G., Devlin G.P., Conaglen J.V., Fowke P.J., Bass J.J. 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*, 180:1.
- Sharma M.**, Wunsch M., Brand T., Verdouw P.D., Schaper W. 1992. Molecular biology of the coronary vascular and myocardial responses to ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol*, 20 Suppl 1:S23-31.
- Smith T.P.**, Lopez-Corrales N.L., Kappes S.M., Sonstegard T.S. 1997. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mamm Genome*, 8:742-744.
- Thies R.S.**, Chen T., Davies M.V., Tomkinson K.N., Pearson A.A., Shakey Q.A., Wolfman N.M. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and

antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors*, 18:251–259.

Tozaki T., Miyake T., Kakoi H., Gawahara H., Sugita S., Hasegawa T., Ishida N., Hirota K., Nakano Y. 2010. A genome-wide association study for racing performances in Thoroughbreds clarifies a candidate region near the MSTN gene. *Anim Genet*, 41 Suppl 2:28-35.

Tozaki T., Sato F., Hill E.W., Miyake T., Endo Y., Kakoi H., Gawahara H., Hirota K., Nakano Y., Nambo Y., Kurosawa M. 2011. Sequence variants at the myostatin gene locus influence the body composition of Thoroughbred horses. *J Vet Med Sci*, Dec;73(12):1617-24.

Vitt U.A., Hsu S.Y., Hsueh A.J. 2001. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol. Endocrinol.*, 15(5):681–694.

Wade C.M., Giulotto E., Sigurdsson S., Zoli M., Gnerre S., Imsland F., Lear T.L., Adelson D.L., Bailey E., Bellone R.R., Blöcker H., Distl O., Edgar R.C., Garber M., Leeb T., Mauceli E., MacLeod J.N., Penedo M.C., Raison J.M., Sharpe T., Vogel J., Andersson L., Antczak D.F., Biagi T., Binns M.M., Chowdhary B.P., Coleman S.J., Della Valle G., Fryc S., Guérin G., Hasegawa T., Hill E.W., Jurka J., Kiialainen A., Lindgren G., Liu J., Magnani E., Mickelson J.R., Murray J., Nergadze S.G., Onofrio R., Pedroni S., Piras M.F., Raudsepp T., Rocchi M., Røed K.H., Ryder O.A., Searle S., Skow L., Swinburne J.E., Syvänen A.C., Tozaki T., Valberg S.J., Vaudin M., White J.R., Zody M.C., Broad

- Institute Genome Sequencing Platform, Broad Institute Whole Genome Assembly Team, Lander E.S., Lindblad-Toh K. 2009. Genome sequence, comparative analysis and population genetics of the domestic horse (*Equus caballus*). *Science*, 326: 865–7.
- Wehling M.**, Cai B., Tidball J.G. 2000. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J.*, 14 103–110.
- Wolfman N.M.**, McPherron A.C., Pappano W.N., Davies M.V., Song K., Tomkinson K.N., Wright J.F., Zhao L., Sebald S.M., Greenspan D.S., Lee S.J. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:15842–15846.
- Yamashita H.**, ten Dijke P., Huylebroeck D., Sampath T.K., Andries M., Smith J., Miyazono K. 1995. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol*, 130:217–226.
- Yang J.**, Ratovitski T., Brady J., Solomon M., Wells K., Wall R. 2001. Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol Reprod Dev.*, 60:351–361.
- Zhu X.Y.**, Topouzis S., Liang L.F., Stotish R.L. 2004. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* 26 262–272.

Ringraziamenti

Questo lavoro nasce da una grande passione per i cavalli, in particolare per l'Anglo Arabo. Penso che la vita vada vissuta con coraggio e con sentimenti di amore e passione, a qualsiasi cosa siano indirizzati... non basterà una vita per ringraziare mio padre per avermi fatto crescere tra i cavalli e avermi insegnato che fantastico e nobile animale è... e so che questa passione durerà per sempre.

Ringrazio di cuore tutti gli allevatori, allenatori e proprietari che mi hanno accolta nelle loro scuderie, è soprattutto grazie a loro che è stato possibile realizzare questo lavoro, ed è a loro che lo dedico sperando che questo possa servire da incoraggiamento per continuare ad allevare e lavorare su questa razza come hanno fatto fin'ora.

Ringrazio i colleghi e amici Gianpiera Piras e Massimiliano Moro, il vostro aiuto e incoraggiamento sono stati fondamentali.

Un ringraziamento al Prof. G.M. Vacca per avermi supportato e aver creduto in questa ricerca, alla Dott.ssa M.L. Dettori per il suo fondamentale contributo, al Dott. M. Pazzola per la sua grande e costante disponibilità e per essere sempre un punto di riferimento.

Infinite grazie al Dott. Pietro Paschino, la tua presenza e il tuo aiuto sono stati indispensabili sempre in questi anni.