

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E
AMBIENTE (DAFNAE)

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Animali

CONTRIBUTO DEL MICROBIOTA ALLA VARIABILITA' DEI
CARATTERI PRODUTTIVI NELLA RAZZA RENDENA

Contribution of the microbiota to the variability of productive
traits in Rendena breed

Relatrice:

Prof.ssa Cristina Sartori

Correlatori:

Dott. Lucia Giagnoni

Dott. Enrico Mancin

Laureanda:

Martina Drusian

Matricola n. 2130015

ANNO ACCADEMICO

2025-2026

Indice

Riassunto	5
Abstract	7
1. Introduzione	9
2. Obiettivo della tesi	15
3. Materiali e metodi	17
3.1. Dati microbioma rettale	17
3.1.1. Campionamento (Raccolta feci).....	17
3.1.2. Pre - estrazione	18
3.1.3. Estrazione del DNA batterico.....	19
3.1.4. Sequenziamento del DNA.....	21
3.1.5. Analisi Bioinformatica.....	21
3.2. Dati genomici	23
3.2.1. Controllo di qualità del pannello individuale	24
3.2.2. Imputazione genomica	24
3.2.3. Controllo di qualità post-imputazione.....	25
3.2.4. Controlli funzionali e pulizia controlli funzionali	26
3.3. Stima delle componenti di varianza	27
3.3.1. Modelli statistici e stima delle componenti di varianza	27
3.3.2. Assunzioni del Modello.....	29
3.4. Modellizzazione lineare dell'associazione tra taxa e fenotipo	30
4. Risultati e Discussione	33
4.1. Statistiche descrittive	33
4.2. Razionale dei modelli.....	34
4.3. Risultati dei modelli.....	35
4.4. Associazione tra i taxa del microbioma e i caratteri produttivi.....	42
4.5. Considerazioni generali	45
5. Conclusioni.....	47
6. Bibliografia.....	49

Riassunto

Di recente, il microbioma sta assumendo una posizione rilevante per quanto riguarda il miglioramento genetico. Le conoscenze odierne gli attribuiscono diversi ruoli positivi a seconda della specie e dell'organo in cui si trova, ad esempio a livello nutrizionale, immunitario, legato al benessere animale e alle relative produzioni. Ad oggi, non vi sono numerosi studi in quanto la sua caratterizzazione risulta complessa, ma il suo impatto nei caratteri produttivi sembra essere elevato. L'obiettivo cardine di questa tesi è stato quello di verificare quale potesse essere l'impatto del microbioma fecale su caratteri produttivi di una razza bovina autoctona, la Rendena: produzione giornaliera di latte (kg/d), contenuto lipidico, proteico (%) e ureico (mg/dl).

Generalmente, all'interno del microbioma fecale bovino si trovano molti taxa e tra i maggiormente presenti vi sono due phylum: *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, importanti per l'efficienza alimentare, la produzione di latte e la salute dell'animale.

La realizzazione di questo elaborato ha previsto la necessità di diverse tipologie di dati: quelli relativi alla produzione del latte, ai caratteri qualitativi annessi e alla struttura genealogica della popolazione sono stati forniti dall'Associazione Nazionale Allevatori della razza bovina Rendena. Inoltre, sono stati prelevati i campioni fecali da 500 bovine in diverse giornate nelle aziende aderenti al progetto, con l'obiettivo di acquisire i dati riguardanti il microbioma. Una volta completata la raccolta, i campioni sono stati conservati ad una temperatura di -20°C e trasferiti in laboratorio per le operazioni di estrazione del DNA ed il sequenziamento. Il campionamento fecale è stato effettuato secondo un protocollo standardizzato, sviluppato in collaborazione con i tecnici dell'Associazione Nazionale Allevatori di Razza Rendena (A.N.A.RE).

Al fine di ottenere un'analisi completa, sono stati utilizzati dei modelli statistici che studiavano diversi effetti tra cui: quello ambientale, animale, genetico, residuo e del microbioma, e sono stati confrontati tra loro. Una volta calcolata la variabilità fenotipica, è stato possibile osservare e discutere quanto ottenuto stimando le altre componenti di varianza.

La base delle considerazioni vede l'importanza del concetto della microbiabilità, che esprime l'effetto del microbiota sui fenotipi. Infatti, i risultati mostrano un contributo non trascurabile del microbioma, che ad esempio, per la produzione di latte, rappresenta una componente rilevante, arrivando a catturare il 20% del fenotipo al netto di effetti come la genetica e l'ambiente. Inoltre, è stato possibile osservare l'effetto predittivo del microbiota considerandolo come unico effetto per la determinazione del fenotipo, assumendo che i sopracitati effetti siano mediati da esso stesso.

L'esito, infatti, vede un'elevata quota, pari al 64% di varianza fenotipica assorbita dal microbiota, suggerendo appunto una sua possibile applicazione come fattore predittivo della quantità di latte prodotta dall'animale.

Per quanto riguarda i componenti principali del latte (proteine, grassi, urea) la loro analisi ha evidenziato un contributo positivo da parte del microbiota, anche se inferiore rispetto alla produzione giornaliera.

Un'ultima analisi è stata effettuata per osservare i taxa presenti nei campioni oggetto di tesi. Questa ha confermato la maggior presenza del phylum *Firmicutes* ed anche *Actinomycetota*. Al loro interno si trovano generi positivamente correlati con la produzione di latte e le sue componenti come il *Bifidobacterium*. L'analisi dei taxa conferma che il microbiota fecale svolge un ruolo funzionale nella produzione di latte. In generale, il lavoro ha messo in luce l'importanza del microbiota fecale nella produzione di latte a livello individuale, essendo esso in grado di spiegare una quota rilevante della variabilità fenotipica. Lo studio suggerisce inoltre la possibilità di usare il microbiota quale fattore predittivo dei caratteri produttivi.

Abstract

Recently, the microbiome has been gaining significant importance in the field of genetic improvement. Current knowledge attributes various positive roles to it, depending on the species and the target organ, such as in nutrition, immunity, animal welfare, and related production traits. To date, studies are limited due to the complexity of its characterization; however, its impact on productive traits appears to be substantial.

The main objective of this thesis was to assess the impact of the fecal microbiome on the productive traits of an autochthonous cattle breed, the Rendena. Specifically, it focused on daily milk yield (kg/d), as well as fat, protein (%), and urea content (mg/dl).

Generally, the bovine fecal microbiome harbors numerous taxa, with two of the most abundant phyla being *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, which are crucial for feed efficiency, milk yield, and overall animal health.

The development of this study required various types of data. Information regarding milk production, associated qualitative traits, and the pedigree structure of the population were provided by the National Breeders Association of the Rendena Cattle Breed (A.N.A.RE). Additionally, fecal samples were collected from 500 cows across different days at participating farms, aiming to acquire microbiome data. Upon completion of the collection, the samples were stored at -20°C and subsequently transferred to the laboratory for DNA extraction and sequencing. Fecal sampling was performed according to a standardized protocol, developed in collaboration with A.N.A.RE technicians.

To ensure a comprehensive analysis, statistical models were employed to evaluate and compare various effects, including environmental, animal, genetic, residual, and microbiome effects. Once the phenotypic variance was calculated, it was possible to observe and discuss the obtained results. The foundation of these considerations highlights the importance of the concept of "microbiability," which expresses the effect of the microbiota on phenotypes. Indeed, the results show a non-negligible contribution of the microbiome. For instance, it represents a significant component in milk yield, capturing up to 20% of the phenotypic variance, independent of genetic and environmental effects. Furthermore, the predictive effect of the microbiota was observed by considering it as the sole factor determining the phenotype, assuming that the aforementioned effects are mediated by the microbiota itself. The outcome revealed that a high proportion of the

phenotypic variance—equal to 64%—was captured by the microbiota, suggesting its potential application as a predictive factor for the animal's milk yield.

Regarding the primary milk components (protein, fat, and urea), the analysis highlighted a positive contribution from the microbiota, albeit lower than that observed for daily milk yield.

A final analysis was conducted to examine the taxa present in the samples under study. This confirmed a predominant presence of the phylum *Firmicutes*, as well as *Actinomycetota*. Within these, there are genera positively correlated with milk yield and its components, such as *Bifidobacterium*. Taxa analysis confirms that the faecal microbiota plays a functional role in milk production. Overall, the study highlights the importance of the faecal microbiota in individual milk production, as it can explain a significant portion of phenotypic variability. The study also suggests the possibility of using the microbiota as a predictor of production traits.

1. Introduzione

Recentemente, il microbioma è diventato un componente di elevata importanza in ambito zootecnico, infatti, è stato oggetto di studi che lo analizzavano a partire ad esempio, dal rumine, dall'intestino o dalla ghiandola mammaria di diverse specie da allevamento, soprattutto in relazione a caratteri produttivi. (He et al., 2022a; Martinez-Boggio et al., 2024)

Ruegg (2022) definisce il microbioma come un insieme di genomi delle comunità microbiche presenti in un determinato ambiente; inoltre, Ikeda-Ohtsubo et al. (2018) fanno riferimento al microbiota come a complessi gruppi di microrganismi che colonizzano gli animali ospiti e sono presenti in vari livelli dell'organismo (in primis i batteri e poi virus, funghi e archea). Il medesimo studio afferma che le componenti batteriche cambiano a seconda di specie e organo considerato; come è visibile nella Figura 1, il microbioma può essere ruminale, intestinale e fecale.

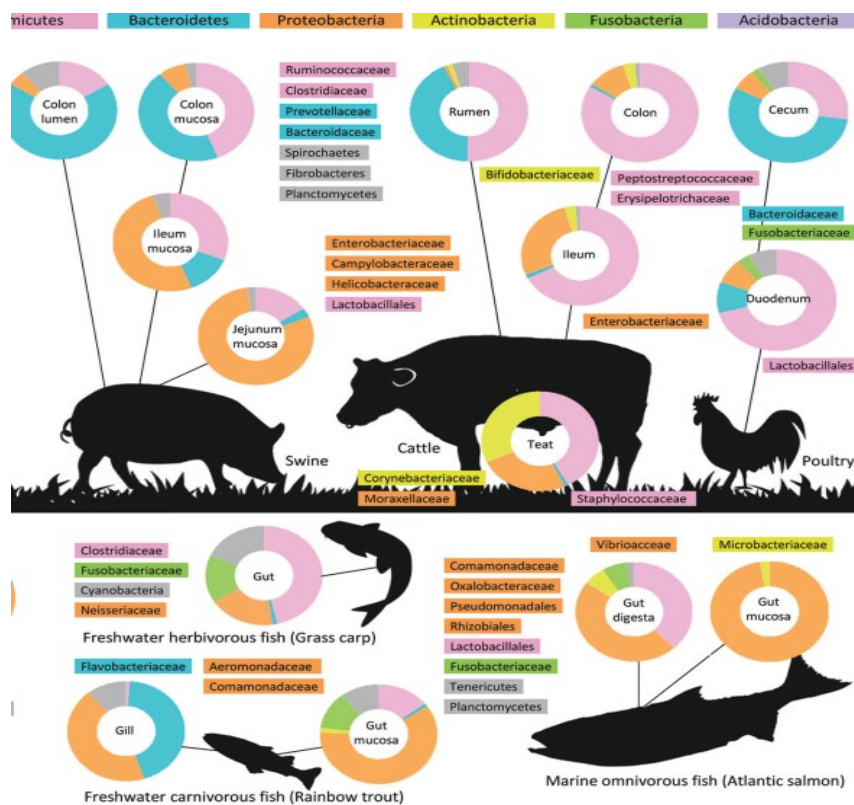


Figura 1. Composizione batterica del microbiota presente in diverse parti di alcuni animali da reddito. Fonte: Ikeda-Ohtsubo et al. (2018),

In particolare, il microbiota fecale comprende diversi taxa al suo interno. Brulin et al. (2024) hanno analizzato quasi 1900 campioni di microbiota fecale provenienti da bovine di razza Holstein. Nei

risultati gli autori hanno evidenziato i 10 phyla più abbondanti, visibili nella Figura 2: il phylum di rilevanza maggiore (circa 55%) è *Firmicutes*, seguito da *Bacteroidetes* (35%). Questi risultano essere presenti per la maggioranza perché la loro interazione con l'ospite è importante sotto molti punti di vista, come l'efficienza alimentare, la produzione di latte e la salute generale dell'animale. Ad esempio, batteri come *Ruminococcus* sono responsabili della degradazione della fibra (cellulosa ed emicellulosa), mentre quelli del genere *Prevotella* sono spesso legati al metabolismo di carboidrati e proteine (Cholewińska et al., 2021; Pitta et al., 2014).

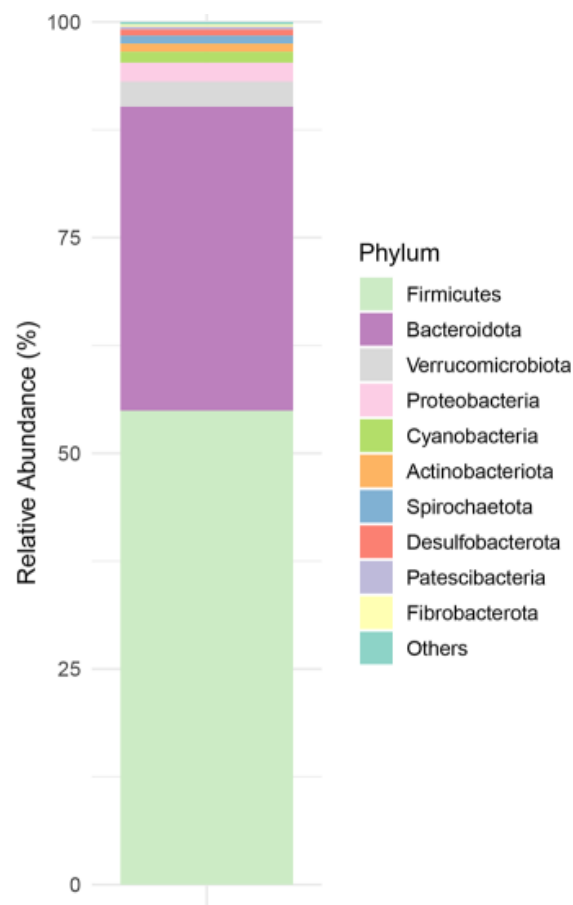


Figura 2: caratterizzazione tassonomica dei campioni fecali bovini. Fonte: Brulin et al. (2024).

Ad oggi, si conoscono molteplici ruoli a carico del microbioma, come la sua influenza a livello nutrizionale: il microbioma è in grado di scomporre molecole complesse che l'animale non riuscirebbe a digerire, produce energia e vitamine essenziali; assume funzioni dal punto di vista immunitario che influenzano, ad esempio la salute della mammella; funge da barriera contro i patogeni ed ha azione anti-infiammatoria (Ikeda-Ohtsubo et al., 2018; Ruegg, 2022).

In aggiunta, il microbioma sembrerebbe avere un effetto positivo su diversi fenotipi dell'individuo, sulle funzioni neurali, endocrine ed anche sul mantenimento del benessere dell'animale (Chen et

al., 2022). Sono stati recentemente studiati gli impatti su caratteri come l'efficienza alimentare, le emissioni di metano, la quantità e la qualità delle produzioni che riguardano in primo luogo i bovini da latte ma anche le galline ovaiole; i risultati hanno evidenziato il fatto che il microbioma non è una presenza inerte ma, svolge funzioni specifiche che possono modificare i caratteri considerati (Monteiro et al., 2022; Zhou et al., 2023).

Nello specifico caso che riguarda la produzione del latte e le sue componenti principali (proteine, grassi), il microbioma funge da regolatore del metabolismo producendo metaboliti. Questi ultimi vengono assorbiti nel sangue e trasportati alla ghiandola mammaria, dove diventano fattori chiave per la sintesi di grassi e proteine nel latte (Ruegg, 2022). I microbi del rumine fermentano il cibo ingerito in acidi grassi volatili (VFA) e proteine microbiche, principali precursori della sintesi del lattosio e delle proteine del latte (Monteiro et al., 2022). Il microbioma, quindi, risulta essere importante anche a livello tecnologico per quanto riguarda l'efficienza produttiva, la composizione chimica del latte e la successiva caseificazione. Da questo presupposto, è possibile aggiungere un ulteriore ruolo ricoperto dal microbioma evidenziato anche nel presente elaborato: esso potrebbe essere considerato un fattore predittivo per i caratteri produttivi degli animali da reddito. Inoltre, alcuni studi -omici condotti su vacche da latte mostrano che la composizione, le funzionalità e i metaboliti microbici del rumine spiegano circa il 18-30% della variabilità nella produzione di latte a parità di dieta (Lei et al., 2025; Xue et al., 2020).

In riferimento a quanto è stato appena detto, è importante introdurre il parametro della microbiabilità: essa esprime l'effetto del microbiota sui fenotipi (Figura 3). Il termine è stato coniato da Difford et al. (2018), i quali hanno effettuato diverse osservazioni anche grazie all'uso di modelli statistici e tecniche di sequenziamento innovative. Tale lavoro ha permesso di stimare il rapporto tra le varianze fenotipiche dei singoli caratteri sulla varianza totale e l'effetto dovuto al microbiota (Biffani, 2024).

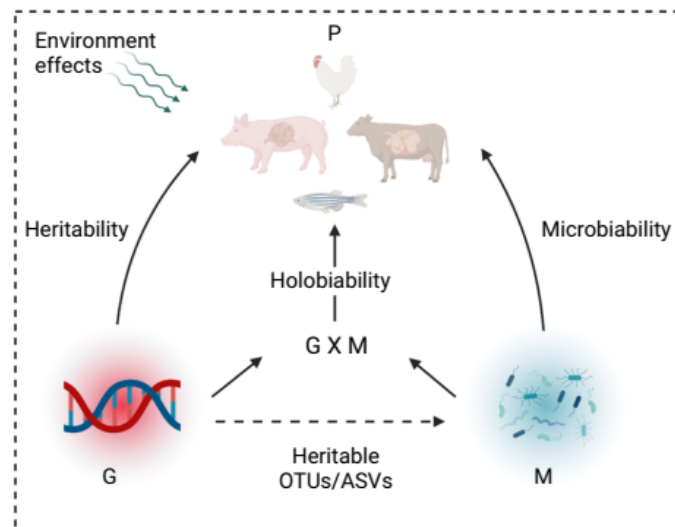


Figura 3. Interazioni tra la genetica (G), il microbioma (M) nella determinazione della varianza fenotipica di un tratto (P) con l'ereditabilità e la microbiabilità. Fonte: Venegas et al. (2023)

Ad esempio, Zang et al. (2022) hanno individuato dei taxa ereditabili a livello ruminale in grado di contribuire alla variabilità dei caratteri fenotipici della vacca da latte: la resa del latte è spiegata per l'11% da batteri del genere *Roseburia* e *Treponema*, la resa proteica per l'11% dalla famiglia *Lachnospiraceae* e la resa di grasso per il 9% dal genere *Pseudoscardovia*. Gli studiosi, inoltre, hanno stimato una microbiabilità ruminale per i corpi chetonici del latte (acetone e acido β -idrossibutirrato) intorno al 15%, suggerendo che la salute metabolica dell'animale non dipende solo dalla dieta o dalla genetica, ma anche da una buona componente della popolazione batterica ruminale. Anche Martinez Boggio et al. (2023) confermano che considerare il parametro della microbiabilità consente di prevedere quali possono essere le bovine Holstein più efficienti, ottenendo un valore per la *residual feed intake* moderato, fino a circa il 26%.

A sostegno di quanto detto precedentemente, considerando una specie differente come i suini, si possono osservare valori di microbiabilità generalmente inferiori per i caratteri di efficienza alimentare (2-20%). Tale studio dimostra, ancora una volta, che nei ruminanti il microbioma riveste un ruolo fisiologicamente più centrale e complesso (Aliakbari et al., 2022)

Successivamente alla definizione di questo parametro, si sono eseguiti diversi studi e lo sviluppo che riguarda il ruolo e l'importanza del microbiota in ambito zootecnico è, ancor oggi, in fase di aggiornamento e di continua ricerca. Ad esempio, Martinez Boggio et al. (2023) volevano capire se il microbioma ruminale fosse in grado di migliorare la valutazione genetica dei caratteri produttivi in un gruppo di 795 pecore di razza Laucane. I risultati non erano quelli sperati, perché nonostante

l'importanza del microbioma per la digestione, la microbiabilità è risultata vicina allo zero, suggerendo che la variabilità individuale dei caratteri del latte rimarrebbe legata alla genetica dell'animale. Al contrario, Martinez-Boggio et al. (2024) conferma il microbioma come predittore dei fenotipi; il microbioma, in questo caso, è in grado di spiegare fino al 20% della variazione dei caratteri di efficienza alimentare nella razza Holstein.

Il ruolo del microbioma ruminale nell'efficienza produttiva nelle vacche da latte è stato ampiamente oggetto di studio negli anni, mentre è stato di rado considerato il contributo del microbiota della porzione terminale dell'intestino. I ricercatori Monteiro et al. (2022) hanno studiato la relazione tra il microbioma ruminale e quello intestinale inferiore con caratteri di efficienza produttiva in bovine di razza Frisona. Gli studiosi hanno evidenziato che la composizione del microbioma ruminale dipendeva in larga misura dall'alimentazione, mentre il microbioma dell'intestino inferiore era meno dipendente dall'assunzione di alimento e maggiormente associato ad una maggior capacità di digerire i nutrienti. Successivamente, hanno osservato che i caratteri produttivi potrebbero essere maggiormente correlati ai microrganismi presenti nell'intestino inferiore rispetto a quanto tradizionalmente previsto. Altri studi recenti hanno messo in luce come variazioni del microbiota fecale fossero associate a cambiamenti in caratteri legati alla produzione di latte. Ad esempio, l'utilizzo di determinati enzimi ha permesso di modulare il microbiota intestinale che, successivamente, ha influenzato la qualità del grasso ed è stato possibile notare un aumento di acido oleico e di grassi monoinsaturi (MUFA) (Ruvalcaba-Gómez et al., 2025). Questo fatto suggerisce come, attraverso i batteri intestinali, si possa rendere il profilo del latte più salutare anche per il consumatore umano.

Un ulteriore studio condotto su 1875 Frisone ha mostrato come i taxa del microbiota fecale abbiano un'ereditabilità moderata ($h^2 \approx 0,08-0,31$) e siano geneticamente correlati con i caratteri produttivi, supportando l'idea di poter usare il microbiota fecale come predittore delle performance produttive in allevamento (Brulin et al., 2024). Gli scienziati, inoltre, hanno evidenziato il legame positivo tra i caratteri produttivi e i batteri fecali (Peptococcaceae) produttori di butirrato; quest'ultimo ha proprietà anti-infiammatorie che migliorano la salute generale dell'animale. Il butirrato risulta essere importante perché fornisce energia utile alla ghiandola mammaria per la sintesi del latte, e la presenza di tale batterio nelle feci indica un ambiente intestinale sano ed efficiente che supporta alte produzioni.

Oltre ad essere ereditabile a livello individuale, il microbiota è anche razza-specifico. Questo fatto segna un punto a favore per l'associazione tra microbioma e caratteri legati alla produzione di latte. Chang et al. (2023) hanno effettuato uno studio comparativo tra la razza Frisona e incroci con razza Montbeliarde, evidenziando che in razze diverse possono cambiare alcuni batteri chiave (come *Selenomonas*, *Succiniclasticum*). Insieme ai batteri cambia anche il contenuto proteico del latte e degli indicatori legati alla salute della mammella.

Anche lo studio coreano di Kim et al. (2025) ha pensato di mettere a confronto la razza bovina locale Jeju Black con Frisona e Jersey; l'obiettivo era di osservare la variazione della comunità microbica. La razza coreana ha mostrato una diversità del microbiota ruminale significativamente maggiore, mentre le comunità microbiche fecali delle altre due razze erano più diversificate.

A seguito di tali premesse, è possibile dedurre come l'analisi del microbioma possa risultare interessante anche se effettuata in razze bovine locali, rustiche e resilienti come la Rendena. In quest'ultima, l'adattabilità al pascolo non compromette le ottime produzioni. La Rendena, infatti, è una razza a duplice attitudine con una propensione verso la produzione di latte: la media si attesta tra i 55 ed i 60 quintali ed ha buone percentuali di grasso (3,51%) e proteine (3,35%). È una razza originaria della Val Rendena, in Trentino, anche se presente per la maggioranza in alcune province del Veneto come Padova, Vicenza e Verona. Ad oggi, sono iscritti al Libro Genealogico Nazionale della Razza Rendena, gestito dall'Associazione Nazionale Allevatori di Razza Rendena (A.N.A.RE.), quasi 60 000 capi. Le componenti genetiche alla base di caratteri di interesse, produttivi e non solo, nella razza Rendena, sono state oggetto di studi recenti (Sartori et al., 2018), mentre, per quanto riguarda il microbiota, è stato oggetto di studio soltanto il microbiota del latte, messo a confronto con quello di razza Frisona (Cremonesi et al., 2018).

2. Obiettivo della tesi

Lo scopo di questo elaborato è stato quello di verificare, in primo luogo, se esistesse la presenza o l'assenza di un impatto del microbioma fecale su caratteri produttivi della razza Rendena, quali produzione giornaliera di latte (kg/d), contenuto proteico, lipidico (%) e contenuto di urea (mg/dl). Per questo sono stati utilizzati i record giornalieri (Test-Day) raccolti periodicamente nelle aziende, assieme ai dati del microbioma rettale estratti dai campioni prelevati nell'ambito di questo lavoro di tesi da ogni singolo animale soggetto di studio, e i dati genomici.

In secondo luogo, una volta evidenziata la presenza di una rilevante azione del microbiota, si è proseguito con il calcolo della variabilità fenotipica. Questo passaggio è stato di fondamentale importanza, perché ha permesso di osservare quanto incidesse il microbiota sulla variabilità di tutti i caratteri elencati in precedenza, suggerendone un possibile utilizzo predittivo della produzione individuale di latte. Inoltre, tale elaborato è risultato utile anche dal punto di vista del miglioramento genetico, in quanto ha permesso di trarre delle conclusioni in merito ad un possibile ruolo positivo del microbiota associato alla produzione del latte ed ai suoi componenti principali.

Il raggiungimento degli obiettivi è stato reso possibile grazie alla raccolta feci presso le aziende che hanno aderito al progetto; successivamente i campioni sono stati trasferiti in laboratorio, dove è stato estratto il DNA batterico utile al seguente sequenziamento.

Una volta ottenuti i controlli funzionali degli animali soggetto di studio e sottoposti quindi a data editing, è stato possibile stimare le componenti di varianza alla base dei caratteri oggetto di studio. Attraverso il confronto tra diversi modelli statistici, che includevano effetti genetici, ambientali, animali, residui e del microbioma, è stato possibile calcolare come variabilità fenotipica potesse essere ripartita tra le diverse componenti. A partire dai risultati ottenuti è stato possibile analizzare l'effetto del microbioma sui singoli caratteri presi in esame. Inoltre, è risultata interessante anche l'analisi dei principali taxa individuati nei campioni oggetto della tesi, in quanto in grado di spiegare quale fosse l'eventuale ruolo funzionale nella determinazione della variabilità dei caratteri produttivi dei principali taxa costituenti il microbiota campionato.

3. Materiali e metodi

3.1. Dati microbioma rettale

3.1.1. Campionamento (Raccolta feci)

Nel presente studio, con il termine microbiota si intende il microbiota fecale. Il microbiota è stato estratto a partire da campioni di feci raccolti da circa 500 bovine, provenienti da 11 aziende situate nell'area dell'Alta Padovana e campionate, quando possibile, in quattro differenti periodi stagionali.

I periodi di campionamento sono stati i seguenti:

- Estate 1 (E1): luglio 2024 – agosto 2024
- Inverno (I1): dicembre 2024 – gennaio 2025
- Estate 2 (E2): agosto 2025
- Inverno (I2) dicembre 2025 – gennaio 2026

Pertanto, per ogni bovina sono disponibili dati relativi fino a quattro periodi distinti del microbiota fecale. In questa tesi sono però stati utilizzati solo i dati relativi alla prima estate, dato che lo studio si colloca nell'ambito di un progetto di ricerca più ampio volto allo studio del microbiota fecale nei bovini, e per lo scopo della tesi i dati estivi risultavano esaustivi. Le informazioni microbiologiche usate hanno quindi riguardato 487 bovine campionate in T1.

Il campionamento fecale è stato effettuato seguendo un protocollo standardizzato, di seguito descritto, sviluppato in collaborazione con i tecnici dell'A.N.A.RE., e condotto da tre operatori.

All'arrivo in azienda, le bovine precedentemente identificate quali soggetto di studio sulla base di caratteristiche quali l'ordine di parto e l'assenza di patologie, sono posizionate in auto cattura presso le rastrelliere delle mangiatoie. Successivamente, da ciascun animale è prelevato un campione fecale utilizzando guanti puliti. Il tempo necessario per il prelievo può variare in funzione dell'animale, ma si attesta generalmente tra 30 e 60 secondi.

Il campione fecale è immediatamente trasferito in una provetta Falcon. La provetta è quindi consegnata al secondo operatore, il quale provvede a chiuderla e immergerla in un contenitore con acqua e ghiaccio. Questa procedura è stata adottata al fine di limitare sbalzi termici e ridurre il carico di raffreddamento del frigorifero portatile utilizzato per la conservazione temporanea dei campioni. A questo punto l'operatore incaricato del prelievo può procedere alla sostituzione dei guanti, sia quelli corti in nitrile che quelli lunghi da fecondazione, ed è pronto a campionare un'altra bovina. La

sostituzione dei guanti è di fondamentale importanza in quanto si va ad evitare la contaminazione tra campioni.

Finita la raccolta i campioni devono essere trasferiti e conservati a -20 °C. Lo step successivo viene effettuato in laboratorio e permette di estrarre il DNA microbico attuando il seguente protocollo.

In azienda, dopo il prelievo fecale, l'operatore incaricato ha misurato la temperatura rettale della bovina dopo circa 30 secondi, utilizzando un termometro digitale con tempo di rilevazione pari a 7 secondi. Trascorsi ulteriori 30 secondi è stata effettuata una seconda misurazione; qualora le due misurazioni risultassero discordanti, veniva eseguita una terza rilevazione.

Nel frattempo, il terzo operatore, posizionato nella corsia di alimentazione, ha rilevato la frequenza respiratoria dell'animale. Al termine delle misurazioni, lo stesso operatore ha verificato la corretta associazione tra i dati raccolti (temperatura e frequenza respiratoria), la matricola dell'animale e il codice identificativo riportato sulla provetta del campione, procedendo quindi alla registrazione dei dati. Le misurazioni di temperatura e frequenza sono state raccolte ma non usate nella presente tesi, per essere incluse in altri studi ricavati dal progetto di ricerca.

Una volta completati il campionamento e le misurazioni, l'operatore incaricato del prelievo ha provveduto alla sostituzione dei guanti, sia quelli corti in nitrile sia quelli lunghi da fecondazione, prima di procedere al campionamento dell'animale successivo. Questa operazione è risultata fondamentale per prevenire contaminazioni crociate tra campioni.

Al termine della raccolta, tutti i campioni fecali sono stati trasferiti e conservati a -20 °C. Le successive fasi di analisi sono state svolte in laboratorio, presso il dipartimento DAFNAE dell'Università di Padova, e hanno previsto l'estrazione del DNA microbico, secondo il protocollo descritto nella sezione seguente.

3.1.2. Pre - estrazione

La prima fase svolta in laboratorio è stata la pre - estrazione, che prevedeva la pulizia dei campioni prelevati dalla parte più fibrosa contenuta nel materiale fecale.

Il protocollo utilizzato è stato creato appositamente a seguito di alcuni test effettuati precedentemente.

Le provette Falcon sono state estratte dal congelatore fino a completo scongelamento in un numero pari a circa 50 al giorno. Questo passaggio ha permesso il trasferimento di 500 mg di feci in una provetta Eppendorf da 2 mL, attraverso l'utilizzo di un'ansa monouso in modo da evitare

contaminazioni tra campioni diversi. In ogni provetta si è riportato il numero identificativo del campione presente nella Falcon, importante perché ognuna di esse corrisponde ad una bovina.

Lo step successivo ha previsto l'aggiunta di 1500 μ L di NaCl 0,98% (9,8 g/L), una soluzione fisiologica isotonica necessaria ad indebolire la parete dei batteri e facilitare l'estrazione della fibra più lunga presente nel campione fecale. Una volta conclusa questa fase, le Eppendorf sono state inserite nel Tissue Lyser a 30 Hz per 10 minuti; questo macchinario consente di omogeneizzare il materiale fecale con la soluzione inserita. Successivamente, i campioni sono stati trasferiti in centrifuga a 1000 giri per 1 minuto; in questo modo si è ottenuta una prima separazione tra pellet e surnatante. Quest'ultimo è stato poi estratto in una quantità pari a circa 1000 μ L e trasferito in una nuova Eppendorf con il numero identificativo corrispondente, mentre il pellet rimanente è stato scartato. Questa fase iniziale del protocollo consente di ottenere un campione già parzialmente pulito.

In seguito, sono stati aggiunti 300 μ L di NaCl 0,98% ai campioni di surnatante precedentemente estratti, per poi essere inseriti in centrifuga a 16000 giri per 1 minuto. Terminato il tempo si è ottenuta una nuova separazione tra pellet e surnatante. Sono stati prelevati 1000 μ L di surnatante e trasferiti in nuove provette, successivamente conservati a -80°C per mantenerli intatti. Invece, il pellet finale è il materiale utile considerato in questo elaborato; questo è stato prelevato in una quantità pari a 200 μ L, caricato nei pozzetti pronti per l'estrazione del DNA e conservato nuovamente a -20°C .

3.1.3 Estrazione del DNA batterico

L'estrazione del DNA microbico è stata effettuata a partire da campioni precedentemente descritti. Il primo passaggio è stato quello di omogeneizzazione al fine di rimuovere i batteri fortemente aderenti alla fibra mediante l'utilizzo di un frullatore, applicando impulsi della durata di 1–2 minuti.

Successivamente, sono stati pesati 2g di digestato omogeneizzato e trasferiti in una bottiglia di vetro da 120 ml, alla quale sono stati aggiunti 6 ml di diluente anaerobico, composto da 2 ml di terreno BA, 4 ml di PBS e 9 μ L di Tween 80, insieme a una punta di perle di vetro. Il volume di lavoro e lo spazio di testa della bottiglia sono stati flussati per 2 minuti ciascuno e il campione è stato incubato a 4°C per 1 ora; durante l'incubazione, dopo 30 e 60 minuti, il campione è stato centrifugato mediante vortex per 1 minuto. Qualora la Soluzione C1 risultasse precipitata, questa è stata riscaldata a 60°C fino a completa dissoluzione prima dell'utilizzo. Tutte le fasi di lavorazione sono state condotte mantenendo i campioni su ghiaccio e utilizzando una centrifuga impostata a 4°C .

Al termine dell'incubazione, una parte della soluzione è stata trasferita in una provetta Falcon da 50 ml e centrifugata a 500 g per 10 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato quindi trasferito in una provetta Eppendorf da 2 ml e sottoposto a centrifugazione a 13.000 × g per 5 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato eliminato e la centrifugazione ripetuta fino al completo trasferimento del liquido dalla Falcon alle Eppendorf, mantenendo il campione su ghiaccio il più possibile. Al termine di questa fase, il surnatante è stato scartato e il pellet ottenuto, di peso approssimativo pari a 0,2 g, è stato utilizzato per le fasi successive di estrazione.

Al pellet sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1, pH 8), utilizzando 1 ml della miscela per risospendere completamente il materiale. L'estrazione del DNA è stata quindi proseguita seguendo un protocollo modificato del kit DNeasy PowerSoil® (QIAGEN). In particolare, 800 µl di Soluzione CD1 sono stati aggiunti ai PowerBead Tubes e l'intero contenuto è stato trasferito nel campione, che è stato miscelato fino alla completa risospensione del pellet. Il campione è stato vortexato alla massima velocità per 15 minuti e successivamente centrifugato in una provetta da 15 ml alla massima velocità (5.500 g) per 5–10 minuti a 4 °C.

Lo strato acquoso superiore è stato trasferito in una nuova provetta Eppendorf pulita e sottoposto a un'ulteriore estrazione mediante aggiunta di un volume isovolumetrico, pari a circa 600–700 µl, di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico, seguito da agitazione manuale per 1–2 minuti e centrifugazione a 10.000 g per 3 minuti a 4 °C. La fase acquosa recuperata è stata successivamente trattata con un volume isovolumetrico di cloroformio, agitata manualmente per 1–2 minuti e centrifugata a 10.000 g per 3 minuti a 4 °C; lo strato superiore è stato trasferito in una nuova provetta Eppendorf utilizzando una pipetta da 200 µl, al fine di evitare contaminazioni da cloroformio.

Alla fase acquosa sono stati quindi aggiunti 200 µl di Soluzione CD2, seguiti da breve miscelazione o vortex e incubazione a 4 °C per 2 minuti. Le provette sono state centrifugate a 13.000 g per 1 minuto a temperatura ambiente e il surnatante, evitando l'eventuale pellet, è stato trasferito in una provetta di raccolta pulita da 2 ml; nel caso in cui il volume superasse 1,7 ml, è stata utilizzata una provetta da 15 ml. Successivamente sono stati aggiunti 600 µl di Soluzione CD3, seguiti da breve miscelazione e incubazione a 4 °C per 2 minuti, e il campione è stato centrifugato a 13.000 g per 2 minuti a temperatura ambiente nel caso di provette da 2 ml, o per 4 minuti nel caso di provette da 15 ml.

Il lisato ottenuto è stato quindi caricato su una MB Spin Column, trasferendo 650 µl alla volta, e centrifugato a $13.200 \times g$ per 1 minuto; questa operazione è stata ripetuta fino al completo passaggio del lisato attraverso la colonna. La MB Spin Column è stata quindi lavata mediante aggiunta di 500 µl di Soluzione EA e centrifugazione a $13.200 \times g$ per 1 minuto, seguita da un ulteriore passaggio di lavaggio con 500 µl di Soluzione CD5 e centrifugazione a $13.000 g$ per 1 minuto a temperatura ambiente. Dopo aver eliminato il filtrato, la colonna è stata trasferita in una nuova provetta di raccolta ed è stata effettuata una centrifugazione finale di 1–2 minuti senza aggiunta di liquidi, al fine di rimuovere eventuali residui presenti nella colonna.

Infine, la MB Spin Column è stata posizionata in una provetta di eluizione da 1,5 ml e il DNA è stato eluito mediante aggiunta di 40–70 µl di Soluzione C6 sterile direttamente al centro della membrana filtrante, seguita da incubazione per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugazione a $10.000 g$ per 1 minuto. La colonna è stata quindi eliminata e il DNA ottenuto è risultato pronto per le successive applicazioni. La concentrazione del DNA è stata determinata mediante Nanodrop, mentre la qualità è stata valutata tramite elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8%, caricando circa 200–300 ng di DNA e utilizzando un marcatore di peso molecolare da 1 Kbp. I campioni di DNA sono stati infine conservati a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ fino alle analisi successive.

3.1.4. Sequenziamento del DNA

La preparazione delle librerie di DNA è stata effettuata successivamente, per sottoporre i campioni a sequenziamento su piattaforma Illumina. Questo step è stato condotto presso il dipartimento DiBio, grazie ad una collaborazione presente con il gruppo di ricerca dei professori Laura Treu e Stefano Campanaro. Il sequenziamento è stato condotto in modalità paired-end (PE) con una lunghezza di lettura pari a 150 bp, ottenendo una resa media di circa 5 milioni di reads per campione. Al termine del processo, i dati di sequenziamento sono stati forniti sotto forma di file FASTQ, utilizzati per le successive analisi bioinformatiche.

3.1.5. Analisi Bioinformatica

I dati di sequenziamento ottenuti in formato FASTQ (Andrews, 2010) sono stati analizzati mediante una pipeline bioinformatica strutturata in più fasi consecutive, finalizzata al controllo di qualità delle reads, alla rimozione delle sequenze di origine non microbica e alla caratterizzazione tassonomica dei campioni. Tutte le analisi sono state eseguite in ambiente Linux mediante script Bash dedicati, che sono stati fatti girare nei server di calcolo del dipartimento DAFNAE.

Controllo preliminare e selezione delle reads di qualità

In una prima fase, i file FASTQ grezzi sono stati sottoposti a un controllo preliminare volto a selezionare esclusivamente i campioni caratterizzati da una copertura di sequenziamento adeguata. I campioni con un numero di reads inferiore a una soglia minima prestabilita (pari a 1 milione di reads) sono stati esclusi dalle analisi successive, al fine di garantire un livello minimo di rappresentatività del contenuto microbico.

Successivamente, le reads di ciascun campione sono state sottoposte a procedure di filtraggio e pulizia, comprendenti la rimozione di sequenze a bassa qualità e di eventuali contaminanti tecnici residui. Tali operazioni hanno consentito di ottenere un set di reads “pulite” (clean reads), idonee per le fasi successive della pipeline.

Filtraggio delle reads paired-end

I dati di sequenziamento, ottenuti in modalità paired-end, sono stati ulteriormente filtrati per garantire la corretta associazione tra le coppie di reads (R1 e R2). Solo le coppie di reads correttamente accoppiate e di elevata qualità sono state mantenute per le analisi successive, mentre le reads orfane o non conformi ai criteri di qualità sono state eliminate. Questo passaggio è risultato fondamentale per ridurre il rumore di fondo e migliorare l'accuratezza delle analisi downstream.

Rimozione delle sequenze di origine ospite

Al fine di analizzare esclusivamente la componente microbica dei campioni, è stata effettuata la rimozione delle reads riconducibili al genoma dell'ospite e all'uomo. Le reads filtrate sono state allineate contro i genomi di riferimento dell'ospite e umano, e tutte le sequenze che mostrano un allineamento significativo sono state eliminate dal dataset.

Questo passaggio ha permesso di ridurre drasticamente la contaminazione da DNA non microbico, aumentando la specificità delle successive analisi metagenomiche e limitando possibili bias nella stima della composizione tassonomica (Bastiaanssen et al., 2022).

Profilazione tassonomica metagenomica

Le reads finali, depurate da sequenze di bassa qualità e da contaminazioni di origine ospite o umana, sono state utilizzate per la profilazione tassonomica dei campioni. L'analisi è stata condotta mediante un approccio basato su marcatori genomici specifici, che consente l'identificazione e la quantificazione relativa dei taxa microbici presenti nei campioni.

Per ciascun campione è stato generato un profilo tassonomico, riportante l'abbondanza relativa dei microrganismi identificati a diversi livelli tassonomici (es., Mancin et al., 2024). I risultati dell'analisi sono stati salvati in file di output testuali e utilizzati per le successive analisi statistiche ed ecologiche della comunità microbica.

3.2. Dati genomici

I dati di pedigree e i dati genomici utilizzati in questo studio sono stati sottoposti a una serie di procedure di controllo e pre-processing, con l'obiettivo di garantire un'elevata qualità delle informazioni genetiche e di ridurre la presenza di errori che avrebbero potuto influenzare le successive analisi.

La popolazione di Rendena dispone attualmente di 4952 genotipi individuali, raccolti dal 2017 grazie a progetti ministeriali (es., PSRN Dualbreeding, 2014-2020, Programma di Sviluppo Rurale Nazionale - Sottomisura 10.2., www.dualbreeding.com) ed accademici. Questi genotipi comprendono anche la maggior parte delle bovine oggetto del campionamento di questa tesi. Alcune bovine oggetto di studio ma prive di genotipo all'inizio dello studio sono state campionate ad hoc tramite prelievo del bulbo pilifero mediante strip e mandate a genotipizzare da Neogen (Irlanda).

L'elaborazione dei dati genomici è stata articolata in diverse fasi consecutive:

- (i) controllo di qualità del pannello individuale,
- (ii) controllo di coerenza della parentela,
- (iii) imputazione genomica
- (iv) controllo di qualità dell'intero pannello dopo imputazione.

3.2.1. Controllo di qualità del pannello individuale

Il controllo di qualità iniziale è stato effettuato separatamente per ciascun array di genotipizzazione e per ciascuna razza analizzata utilizzando il programma Plink (Purcell et al., 2007). In primo luogo, sono stati considerati esclusivamente i cromosomi autosomici (cromosomi 1–29), escludendo pertanto i cromosomi sessuali, in quanto meno informativi per le analisi genetiche di interesse.

Successivamente, è stata valutata la qualità dei dati a livello individuale e a livello di singolo marcatore. Gli animali che presentavano un call rate inferiore al 50% sono stati rimossi dal dataset, poiché un'elevata percentuale di genotipi mancanti può compromettere l'affidabilità delle analisi genetiche. Analogamente, sono stati esclusi i loci SNP con un call rate inferiore al 95%, al fine di mantenere esclusivamente marcatori caratterizzati da un'elevata accuratezza di genotipizzazione.

Infine, tutte le posizioni SNP sono state mappate in base al genoma di riferimento **ARS-UCD1.2**, garantendo così una corretta localizzazione genomica dei marcatori e una maggiore coerenza con le risorse genetiche attualmente disponibili.

3.2.2. Imputazione genomica

Dopo il controllo di qualità iniziale, è stata effettuata la procedura di imputazione genomica, necessaria per armonizzare pannelli di genotipizzazione caratterizzati da diverse densità di SNP. Il pannello ad alta densità da 150K è stato selezionato come pannello di riferimento, in quanto forniva una copertura genomica più completa (Figura 4).

Gli SNP mancanti negli altri pannelli sono stati imputati utilizzando il software **FImpute3**, che sfrutta informazioni di parentela e di linkage per stimare i genotipi mancanti (Sargolzaei et al., 2014). L'imputazione ha permesso di aumentare il numero di marcatori disponibili e di ottenere un dataset genomico più omogeneo, migliorando così la potenza statistica delle analisi successive.

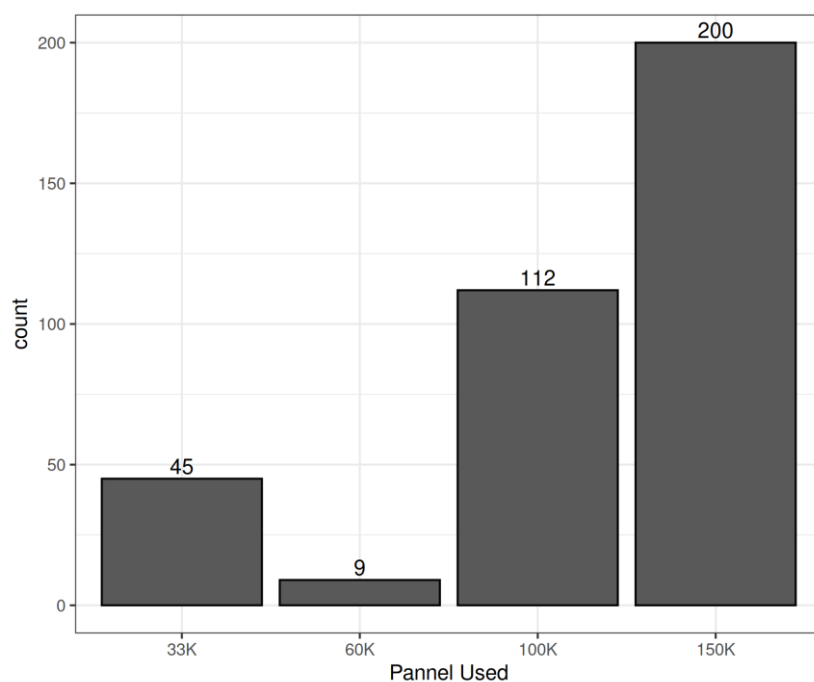


Figura 4: Pannelli utilizzati per le genotipizzazioni. Il pannello scelto come riferimento è stato il 150k.

3.2.3. Controllo di qualità post-imputazione

Al termine della fase di imputazione, è stato eseguito un secondo ciclo di controllo di qualità sull'intero pannello genomico, utilizzando il programma **preGSf90** (Aguilar et al., 2014). Questa fase è risultata fondamentale per verificare l'affidabilità dei genotipi imputati e per rimuovere eventuali marcatori non conformi ai criteri genetici standard.

In particolare, sono stati esclusi i SNP con una frequenza dell'allele minore (Minor Allele Frequency, MAF) inferiore a 0,05, in quanto caratterizzati da una variabilità genetica limitata. Inoltre, sono stati rimossi gli SNP che mostravano una deviazione significativa dall'equilibrio di Hardy–Weinberg, valutata attraverso una deviazione di eterozigotità superiore a $2pq > 0,15$, poiché tali deviazioni possono indicare errori di genotipizzazione o fenomeni di selezione.

Infine, sono stati esclusi anche i marcatori con un call rate inferiore al 90%. Al termine di tutte le procedure di filtraggio, il dataset finale era composto dagli stessi individui genotipizzati con una densità media pari a **112 000** SNP, adeguata per le successive analisi genetiche.

3.2.4. Controlli funzionali e pulizia controlli funzionali

I dati relativi alla produzione, ai caratteri qualitativi del latte come il contenuto in grasso (%) e proteine (%), alla conta delle cellule somatiche, lattosio (%) e urea (mg/L) e alla struttura genealogica della popolazione – l’anagrafica della razza - sono stati forniti dall’Associazione Nazionale Allevatori della razza bovina Rendena. La conta delle cellule somatiche, o SCC, iniziata un po’ più tardi rispetto ai controlli dei caratteri produttivi, viene rilevata routinariamente nell’ambito dei sistemi ufficiali di controllo funzionale della produzione di latte nella razza Rendena sin dal 1996. Data la diversa natura del carattere rispetto agli altri (si tratta di un carattere funzionale indicativo della salute mammaria) si è scelto di non considerarlo nel presente lavoro di tesi.

Il dataset iniziale utilizzato nel presente studio era costituito da registrazioni mensili di test-day (TD) relative alla produzione di latte, grasso e proteine, nonché alla SCC, raccolte nel periodo compreso tra il 1999 e il 2025. Ai fini di questa analisi, sono state considerate esclusivamente le registrazioni TD complete, comprendenti simultaneamente le informazioni su produzione di latte, grasso, proteine e SCC, queste ultime poi non usate come fenotipo. La scelta è stata motivata dal fatto che il controllo funzionale del latte non viene effettuato su animali in condizioni di salute compromesse.

Sono state incluse nello studio soltanto le registrazioni TD relative alle prime tre lattazioni, con il primo controllo effettuato entro 45 giorni dal parto (Days in Milk, DIM). Inoltre, sono state mantenute esclusivamente le osservazioni raccolte tra 5 e 305 DIM, in modo da escludere i periodi estremi della lattazione, potenzialmente caratterizzati da maggiore variabilità e minore affidabilità dei dati. Sono state incluse inoltre nell’analisi solo le lattazioni caratterizzate da almeno quattro registrazioni TD, e solo gli allevamenti che presentavano almeno due controlli TD per lattazione.

Infine, per gli scopi dello studio sono stati considerati i dati test day con una distanza compresa tra 200 e -200 giorni dalla data di campionamento, come visibile in Figura 5. Il dataset finale consiste di circa 3457 test day appartenenti a 442 animali, di cui 415 possiedono il genotipo.

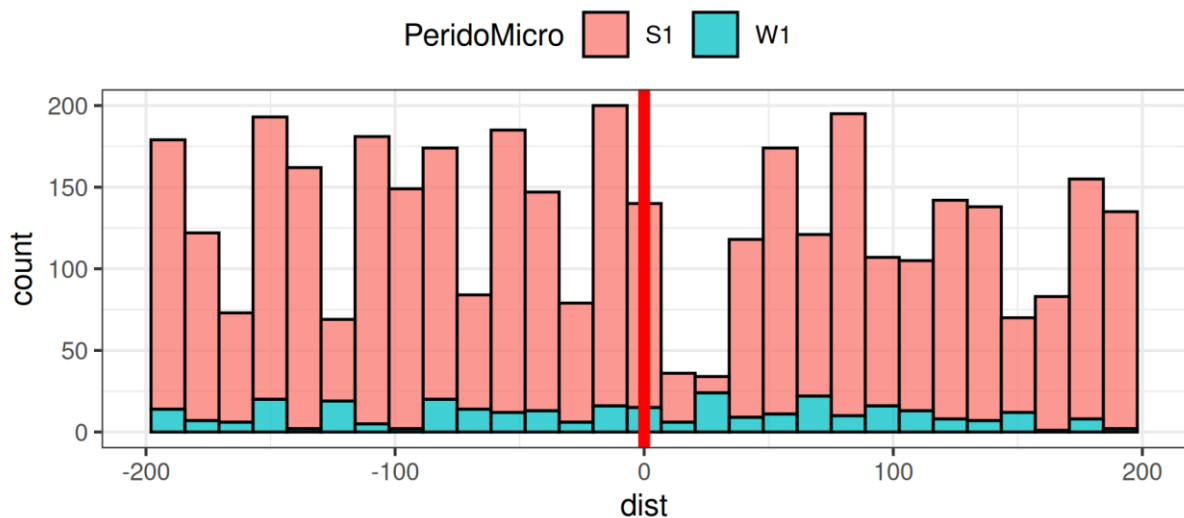


Figura 5: distanze di campionamento.

Il file di pedigree utilizzato per le analisi genetiche è stato ottenuto dall'anagrafica ricostruendo le genealogie degli animali fino all'ultima generazione nota. Il pedigree finale includeva 3 803 animali, estendendosi fino alla 15 generazione.

3.3. Stima delle componenti di varianza

3.3.1. Modelli statistici e stima delle componenti di varianza

Le componenti di varianza sono state stimate utilizzando un modello test-day a ripetibilità (*repeatability test-day model*). In questo studio sono stati considerati tre modelli; di seguito viene descritto il modello di base (baseline), espresso come:

$$y = Xb + Za + Wpe + e$$

Dove:

y = vettore dei fenotipi (latte etc.) delle registrazioni test-day relative alle singole bovine

X = matrice di incidenza degli effetti fissi

b = vettore dei corrispondenti parametri da stimare

Gli effetti fissi inclusi nel modello comprendono:

- l'effetto allevamento–giorno di controllo combinato con il numero di lattazione (HTD–NP), modellato come effetto sistematico categoriale, considerando tre parità, per un totale di xx livelli;
- l'effetto sistematico della classe di durata della gestazione (GL), suddiviso in 18 classi;
- l'effetto sistematico dell'età al parto all'interno della lattazione (AP–NP), articolato in 42 classi;
- l'effetto sistematico del mese di parto all'interno della lattazione (MP–NP), comprendente 36 classi, corrispondenti a ciascuna combinazione mese–numero di lattazione.

Per descrivere l'andamento della curva di lattazione in funzione dei giorni di lattazione (*Days in Milk*, DIM), sono stati utilizzati polinomi di Legendre di terzo grado. La scelta di tale ordine è stata motivata da studi precedenti (Guzzo et al., 2019) e da confronti con le associazioni di allevatori, che ne hanno previsto l'adozione all'interno del modello di valutazione ufficiale della razza Rendena. I polinomi di Legendre presentano il vantaggio di essere ortogonali e mutuamente indipendenti, consentendo l'inclusione di covariate di diverso ordine per lo stesso effetto senza incorrere in problemi di collinearità.

I termini u e w rappresentano le covariate associate ai polinomi di Legendre di grado $r = 0, \dots, 3$ applicate rispettivamente agli effetti AP–NP e MP–NP.

Oltre al modello sopra descritto, sono stati utilizzati quelli riportati nel prosieguo:

Modello “complete” dove in aggiunta l'effetto del microbiota:

$$y = Xb + Za + Wpe + Qc + e$$

Modello “OnlyMicro” dove viene considerato solo il microbiota, sotto l'assunzione che la variabilità fenotipica sia completamente mediata soltanto da esso:

$$y = Qc + e$$

3.3.2. Assunzioni del Modello

Nei modelli statistici adottati, si assume che tutti gli effetti casuali e l'errore residuo siano distribuiti normalmente con media pari a zero e opportune strutture di varianza–covarianza.

In particolare, il vettore degli effetti genetici additivi \mathbf{a} è assunto seguire una distribuzione normale multivariata:

$$\mathbf{a} \sim \mathcal{N}(\mathbf{0}, \mathbf{H}\sigma_a^2)$$

σ_a^2 = varianza genetica additiva

\mathbf{H} = matrice di parentela combinata, che integra informazioni genealogiche e genomiche secondo l'approccio single-step genomic BLUP

\mathbf{H}^{-1} = matrice inversa di H, ottenuta combinando \mathbf{A}^{-1} e \mathbf{G}^{-1}

\mathbf{A}^{-1} = matrice inversa di parentela pedigree

\mathbf{G}^{-1} = matrice inversa di parentela genomica

Il vettore degli effetti ambientali permanenti \mathbf{pe} è assunto seguire una distribuzione normale multivariata:

$$\mathbf{pe} \sim \mathcal{N}(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_{pe}^2)$$

Dove:

σ_{pe}^2 = varianza ambientale permanente

\mathbf{I} = matrice identità di dimensione appropriata

Il vettore degli effetti del microbiota \mathbf{c} è assunto seguire una distribuzione normale multivariata:

$$\mathbf{c} \sim \mathcal{N}(\mathbf{0}, \mathbf{M}\sigma_c^2)$$

Dove:

σ_c^2 = varianza associata al microbiota

M = matrice di similarità microbica, costruita sulla base della composizione del microbiota dei campioni e utilizzata per modellare la dipendenza tra individui dovuta alla componente microbica

Sono stati applicati specifici criteri di filtraggio ai dati microbiologici. In particolare, sono stati considerati esclusivamente gli animali con un numero totale di conteggi superiore a 700, mentre i taxa sono stati mantenuti solo se caratterizzati da una prevalenza superiore allo 0,05. L'applicazione di tali criteri ha portato alla definizione di un dataset finale composto da 1532 campioni.

Successivamente, i dati relativi ai taxa sono stati sottoposti a una trasformazione additiva centered log-ratio (CLR), al fine di tenere conto della natura composizionale dei dati microbiomici e ridurre potenziali bias dovuti alla diversa profondità di sequenziamento tra i campioni.

Infine, il kernel interno è stato calcolato come prodotto interno della matrice dei taxa scalata, ottenendo così una matrice di similarità microbica utilizzata per modellare l'effetto del microbiota all'interno del modello statistico.

Infine, il vettore degli errori residui e è assunto distribuito normalmente come:

$$e \sim \mathcal{N}(\mathbf{0}, I\sigma_e^2)$$

Dove:

σ_e^2 = varianza residua

I = matrice identità di dimensione appropriata

3.4. Modellizzazione lineare dell'associazione tra taxa e fenotipo

Per valutare l'associazione tra la composizione del microbiota e il profilo fenotipico, è stato applicato un modello di regressione lineare semplice per ogni singolo taxon identificato. In questa analisi, il fenotipo è stato impostato come variabile dipendente (Y), mentre l'abbondanza del taxon è stata considerata come variabile indipendente (X).

Il modello statistico ha seguito l'equazione:

$$y_{phenotype} = \beta_0 + \beta_1 x_{taxon} + \epsilon$$

Dove:

$y_{phenotype}$: rappresenta il valore del fenotipo osservato.

β_0 (intercetta): rappresenta l'intercetta del modello.

β_1 (slope): indica l'effetto dell'abbondanza del taxon sulla variazione del fenotipo.

ϵ : rappresenta l'errore residuo.

Dato l'elevato numero di taxa testati indipendentemente, per controllare il tasso di falsi positivi è stata applicata la correzione di Bonferroni. La significatività statistica dei coefficienti β_1 è stata quindi determinata dividendo il valore α nominale (0.05) per il numero totale di taxa inclusi nell'analisi (n), quindi $P = 0.05/n$.

4. Risultati e Discussione

4.1. Statistiche descrittive

Nella Tabella 1 sono riassunte il numero di osservazioni, la media, la deviazione standard, la mediana, il valore minimo e massimo per i quattro fenotipi oggetto di studio: produzione giornaliera di latte, percentuale di proteina, grasso e contenuto di urea.

Il campione finale comprendeva circa 3 457 osservazioni per ciascun parametro e, avendo un totale di 442 bovine di razza Rendena si sono ottenuti 7.82 ± 1.96 record fenotipici per ciascun animale. La vicinanza tra il valore della media e della mediana per tutti i parametri, indica che la distribuzione dei dati è normale.

Nonostante il campione di individui sia limitato rispetto agli studi citati di seguito, i risultati offrono un contributo aggiuntivo coerente con le precedenti ricerche.

Fenotipo	n	mean	sd	median	min	max
Latte kg/d	3 457	22.68	7.11	22.2	2.2	44.6
Proteina %	3 452	3.55	0.56	3.51	1.55	5.67
Grasso %	3 450	3.41	0.33	3.39	2.51	4.44
Urea mg/dl	3 457	22.64	5.12	22.50	7.70	38.30

Tabella 1: statistiche descrittive per i 4 fenotipi; n = numero di osservazioni, mean = media, sd = deviazione standard, median = mediana, min - max = valore minimo e massimo

La produzione media di latte ottenuta in questa analisi per la razza Rendena è di 22,68 kg, con una deviazione standard pari a 7,11, che mostra una discreta variabilità tra i soggetti. Il range evidenzia una notevole variabilità fenotipica, con valori compresi tra un minimo di 2,2 kg e un massimo di 44,6 kg, probabilmente perché gli individui campionati erano in diverse fasi di lattazione. In letteratura, studi che riguardano la popolazione Rendena attestano il valore della media giornaliera intorno ai 16 kg, con una d.s. di 5,6 ed un range che varia da 0,6 kg a 47 kg (Sartori et al., 2018).

Ulteriori indagini sono state effettuate anche per altre razze locali, come la Reggiana, che registra una media giornaliera di 19 kg, oppure la Valdostana con una media di 13 kg/d (Mazza et al., 2016).

La Frisone Italiana mostra una produzione giornaliera superiore alle altre razze, è di circa 31 kg/d, anche la Bruna Italiana ha un buon volume che si attesta intorno ai 23 kg/d (Mancin et al., 2024).

La media della proteina è del 3,55% ed è poco superiore alla media del grasso, che è 3,41%; questa situazione può essere dovuta, ancora una volta, a diverse fasi di lattazione degli animali o diete specifiche, nonché a un effetto del campionamento, dato che le informazioni usate riguardano solo una frazione di popolazione, 3450 bovine, per quanto rappresentativa. Il medesimo caso è accaduto nello studio di (Mancin et al., 2024) per quanto riguarda la razza Reggiana, dove il contenuto proteico (3,70%) è risultato superiore a quello lipidico (3,45%).

Invece, Sartori et al. (2022) hanno riportato le percentuali di proteina e grasso per la razza Rendena, rispettivamente di 3,35% e 3,52%. Inoltre, Visentin et al. (2018) hanno ottenuto il 3,38% di proteina e 4,06% di grasso per quanto riguarda la Frisone Italiana e anche la Grigio Alpina con valori pari a 3,57% e 3,93%.

Per finire, si è calcolato un valore medio di 22,64 mg/dl di urea. Questa stima rappresenta il primo valore di urea di Rendena inserito in uno studio scientifico. Lopez-Villalobos et al. (2018) hanno ottenuto 24,9 mg/l come media del contenuto di urea in mandrie che presentavano razze miste tra Holstein e Jersey; Jahnel et al. (2023) hanno misurato una media tra le lattazioni pari a 23 mg/dl per la razza Holstein.

È possibile attribuire, in aggiunta, un valore medio dell'urea nel latte di massa tra 20 – 36 mg/dl (Fantini A, 2025), anche se è un parametro che può essere influenzato da diverse variabili come il benessere dell'animale e l'equilibrio della dieta.

4.2. Razionale dei modelli

Questo paragrafo propone una panoramica dei modelli già spiegati nei Materiali e Metodi per riprendere il rationale delle analisi svolte e introdurre quindi i risultati, riportati nei paragrafi seguenti. Con questo elaborato si voleva capire se il microbioma avesse un impatto sulla produzione di latte giornaliera della razza Rendena e sui valori dei suoi componenti principali (proteine, grasso e urea). Al fine di avere una lettura completa sono stati indagati diversi effetti: ambientale, genetico, animale, residuo e del microbioma, chiariti di seguito. Una volta ottenuti i risultati, è stato possibile analizzarli e discuterli in questo capitolo.

Per effetto ambientale si intende la parte di variazione fenotipica non attribuibile a fattori genetici, bensì a fattori legati all'ambiente come le condizioni climatiche, il livello di stress dell'animale o l'alimentazione che possono influenzarne la produttività; l'effetto genetico è dato dalle informazioni disponibili nel DNA degli individui ed è ereditabile. Invece, l'effetto animale permanente rappresenta la componente della variabilità fenotipica specifica di quell'individuo, non influenzata dalla genetica ed ottenuta grazie a misurazioni ripetute. Esso riguarda delle condizioni esterne che rendono l'individuo unico rispetto agli altri, ad esempio l'alimentazione nei primi mesi di vita, un caso clinico rilevante o le tecniche di management della stalla (Wiggans et al., 1988). Proseguendo si ha l'effetto residuo, corrisponde a tutti i fattori che non si riescono a spiegare con i modelli utilizzati, ad esempio uno stress occasionale dovuto ad un'ondata di caldo, un malessere momentaneo o anche degli errori nelle misurazioni. Infine, vi è l'effetto giustificato dall'azione del microbioma sui fenotipi considerati.

Il primo modello statistico utilizzato (Baseline) vede l'assenza del microbioma ed è il classico modello utilizzato nella razza Rendena, il fenotipo si divide in: effetto ambientale, effetto animale permanente, effetto genetico e residuo.

Il secondo modello (Only micro) considera come unico effetto il microbioma, assumendo che l'effetto genetico ed ambientale siano mediati da esso stesso.

Infine, il terzo modello (Complete), tiene presente tutte le variabili precedentemente menzionate. La porzione riguardante il microbioma è spiegata al netto dell'effetto ambientale, animale e genetico.

4.3. Risultati dei modelli

I risultati supportano quanto è stato precedentemente esposto e sono visibili nella Tabella 2, dove vengono riportati i valori riguardanti le varianze spiegate per i quattro caratteri produttivi in questione: la produzione giornaliera di latte (kg/d), il contenuto di proteina e grasso (%) e, infine, il contenuto di urea (mg/l). Partendo da questi risultati è possibile confrontare i modelli statistici utilizzati, nell'ottica di osservare come, l'inclusione del microbiota con o senza i restanti effetti, modifichi la variabilità fenotipica.

Modello	Fenotipo	Genetica	Effetto Animale	Residuo	Microbiota
Baseline	Latte (kg/d)	0.079 (0.025-0.193)	0.251 (0.162-0.323)	0.251 (0.235-0.269)	
Only Micro				0.48 (0.445-0.517)	0.854 (0.712-1.06)
Complete		0.066 (0.026-0.159)	0.20 (0.121-0.271)	0.234 (0.218-0.252)	0.118 (0.067-0.183)
Baseline	Proteina (%)	0.08 (0.035-0.139)	0.048 (0.02-0.098)	0.715 (0.667-0.762)	
Only Micro				0.863 (0.811-0.93)	0.233 (0.153-0.334)
Complete		0.066 (0.029-0.125)	0.041 (0.019-0.082)	0.704 (0.659-0.754)	0.05 (0.019-0.103)
Baseline	Grasso (%)	0.057 (0.022-0.128)	0.099 (0.045-0.152)	0.561 (0.521-0.602)	
Only Micro				0.808 (0.755-0.871)	0.357 (0.248-0.495)
Complete		0.053 (0.02-0.118)	0.085 (0.041-0.141)	0.558 (0.522-0.601)	0.036 (0.016-0.084)
Baseline	Urea (mg/l)	0.088 (0.038-0.154)	0.084 (0.039-0.138)	0.335 (0.313-0.361)	
Only Micro				0.607 (0.566-0.656)	0.53 (0.426-0.681)
Complete		0.083 (0.037-0.149)	0.082 (0.035-0.129)	0.334 (0.31-0.359)	0.024 (0.012-0.048)

Tabella 2: varianze fenotipiche spiegate dai tre modelli.

Infatti, facendo riferimento al modello Baseline per la produzione di latte, si può notare che l'effetto genetico spiega circa il 14% della varianza fenotipica, mentre è presente una quota significativa, pari a circa il 43%, non spiegata dagli effetti genetici ed animali e definita, quindi, residuo. In Figura 6 è visibile il confronto tra i modelli per quanto riguarda questo primo fenotipo in analisi.

Se si considera il valore dell'ereditabilità della produzione di latte nella razza Rendena in letteratura spazia dal 16% (Sartori et al., 2022) a circa il 19% (Guzzo et al., 2018; Sartori et al., 2018), quindi poco più alto rispetto a quanto calcolato nel presente modello, che fa riferimento ad un campione della popolazione. Ad esempio, nella razza Reggiana Mancin et al. (2024) hanno trovato un'ereditabilità del 12% e Bernini et al., (2024) del 22% per la razza Valdostana.

È interessante notare come, nel momento in cui si introduce anche l'informazione microbiotica (modello Complete), sia l'ereditabilità sia la quota di varianza residua si riducono, rispettivamente all'11% e al 38%. Il calo dell'ereditabilità potrebbe essere attribuito al fatto che il microbiota

possiede una sua componente genetica. Tale diminuzione suggerisce che una parte della varianza genetica dell'animale operi attraverso la regolazione del microbioma. Questo aspetto è stato studiato da Brulin et al. (2024), i quali hanno dimostrato che il microbiota fecale nelle bovine di razza Holstein (oltre 1000) non è solo un fattore ambientale, ma un tratto ereditabile influenzato dal patrimonio genetico dell'ospite (le stime raggiungono h^2 fino a 0,30 per alcuni taxa). Mentre, il calo della componente residua potrebbe risiedere nel fatto che il microbiota è in grado di assorbire delle variabili non spiegate dalla genetica o dall'ambiente.

Nonostante il modello consideri molteplici variabili e l'informazione genomica, il microbiota contribuisce in maniera non trascurabile alla produzione di latte, diventando una componente rilevante. Infatti, esso cattura circa il 20% del fenotipo al netto della genetica e dell'ambiente. Quest'ultima informazione è coerente con quanto trovato in letteratura, con le forti correlazioni genetiche e fenotipiche tra specifici taxa microbici e i tratti produttivi. Indipendentemente dalla razza considerata, sembra che l'interazione tra ospite e comunità microbica occupi un ruolo biologicamente importante (Brulin et al., 2024).

Invece, osservando il modello Only micro, si può constatare come il microbiota, considerato come unico effetto nel modello, assorba una quota molto elevata della varianza fenotipica, pari al 64%. Inoltre, il valore della componente residua è circa del 36% ed è possibile notare la vicinanza con la quota calcolata nel modello Complete (38%). Questo aspetto suggerisce che, pur inserendo nel modello le componenti genetiche, animali ed ambientali, gran parte della variabilità fenotipica non spiegata rimane invariata. Data l'elevata parte spiegata dal solo microbiota, lo si potrebbe considerare al fine di predire i fenotipi. In questo caso, ad esempio, potrebbe essere utile per prevedere la quantità di latte prodotta dall'animale.

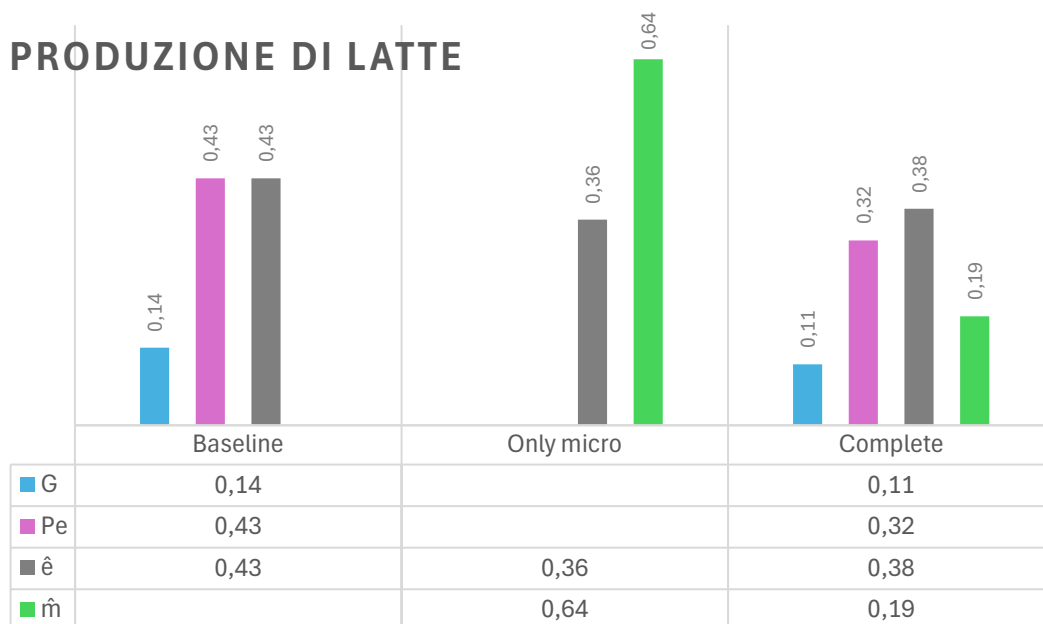


Figura 6: calcolo delle varianze della produzione giornaliera di latte

Gli esiti ottenuti possono essere paragonati anche ad altri studi, ad esempio quello di Martinez Boggio et al. (2024) basati sulla razza Frisona. Anche se la struttura dei modelli utilizzati risulta differente e non permette un confronto numerico, è possibile delineare un concetto comune: il microbioma è in grado di contribuire alla spiegazione dei caratteri produttivi nelle vacche da latte, e l'interazione tra la genetica dell'animale e la comunità microbica gioca un ruolo non trascurabile nella determinazione della variabilità fenotipica.

Le varianze dei fenotipi successivi, ovvero proteine e grassi, sono visibili in Figura 7 e in Figura 8. Non vi sono differenze molto rilevanti tra loro, ma variano in base al modello considerato. Ad esempio, nel modello Baseline, la varianza genetica della proteina e del grasso, e quindi l'ereditabilità dei caratteri, rappresentano rispettivamente il 9.5% e l'8%.

Uno studio sulla popolazione della razza Rendena evidenzia un'ereditabilità dei caratteri pari al 26,8% per la proteina e al 16,5% per il grasso (Sartori et al., 2022). Invece, la Reggiana mostra valori più vicini a quelli della tesi sia per la quota proteica (9,7%) che lipidica (7%) (Mancin et al., 2024).

In entrambe risulta elevata la quota residua pari all'85% e 78%, indicando che la maggior parte della variabilità fenotipica non viene spiegata dalla genetica ma, probabilmente da altri effetti non misurabili e non inclusi nel modello di riferimento.

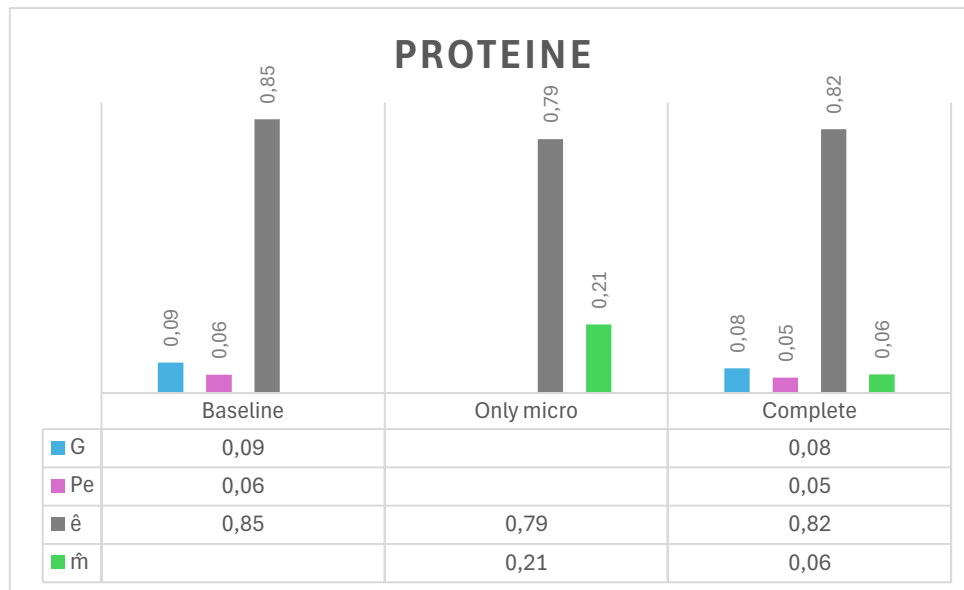


Figura 7: calcolo delle varianze per il contenuto di proteina

Seguendo la stessa analisi svolta per la produzione di latte si può notare come, nel modello Complete, i valori che riguardano l'ereditabilità e la quota di varianza residua per entrambi i fenotipi diminuiscano: la parte genetica che spiegherebbe la variazione nel contenuto di proteina scende al 7.6% e quella non spiegata all'82% invece, i valori calcolati per il grasso calano rispettivamente a 7.2% e 76%. Un aspetto interessante è dato, ancora una volta, dal microbioma che mantiene un ruolo rilevante anche se con dati poco elevati. Esso è in grado di catturare quasi il 6% del fenotipo, in questo caso il contenuto di proteina ed il 5% del contenuto dei grassi.

Infine, è possibile osservare come, le parti non spiegate nel modello Only micro rappresentino quasi l'80% della proteina ed il 70% del grasso, rimanendo così la quota più dominante e pressoché invariata tra i modelli. Il microbioma studiato singolarmente spiegherebbe il 21% della proteina ed il 30% dei grassi.

Questi risultati si possono considerare rilevanti anche grazie al lavoro di Xue et al., (2020) dove hanno osservato come la composizione ed i meccanismi del microbioma possono spiegare una quota di variabilità nella resa di proteina del latte, stimando un valore rilevante superiore al 20%, ciò supporta l'importanza del ruolo del microbioma nello spiegare i tratti legati alla proteina del latte.

Inoltre, potrebbe essere considerato come biomarcatore per la sostenibilità della produzione lattiera, come mostrato dallo studio di Monteiro et al. (2022), dove il microbioma intestinale spiega fino al 38% della variabilità nell'efficienza di produzione della proteina del latte, in un campione di 18 vacche Holstein.

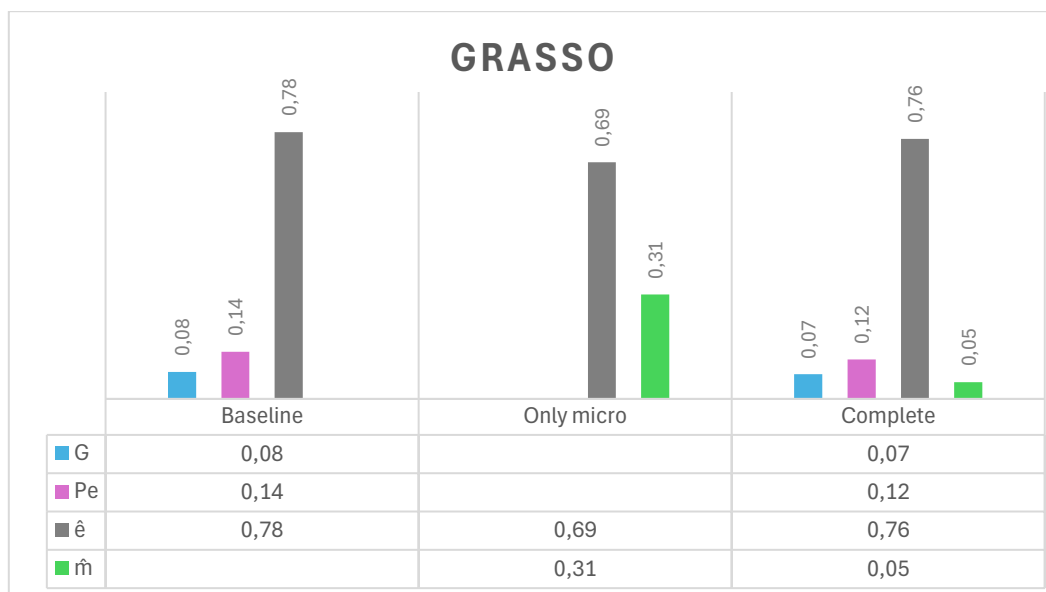


Figura 8: calcolo delle varianze per il contenuto di grasso

Come è possibile notare, l’impatto del microbioma sul contenuto di proteine e grasso è risultato inferiore rispetto alla produzione di latte. Infatti, anche nella razza Holstein il legame tra microbioma e qualità del latte è molto debole o difficile da dimostrare. Brulin et al., (2024), hanno trovato valori molto alti per quanto riguarda l’ereditabilità dei caratteri qualitativi del latte nell’ospite (superiore al 70%), lasciando quindi una quota minore di varianza spiegabile dal microbioma o da altri fattori. Inoltre, a seguito di test statistici, quasi tutte le correlazioni tra batteri e percentuali di grasso/proteine sono risultate non significative, confermando che la composizione del latte è un carattere fenotipico meno influenzabile dalla componente microbica fecale rispetto alla produzione di latte.

L’ultimo fenotipo di interesse in questo elaborato è l’urea, compresa nella frazione dell’azoto non proteico e convertita a partire dall’ammoniaca nel fegato (Matthews et al., 2019). In generale è un parametro utile per monitorare lo stato nutrizionale delle vacche e quindi ad una corretta gestione alimentare dell’allevamento. (Zhao et al., 2025)

Innanzitutto, si può osservare il modello Baseline in Figura 9, dove si trova la quota residua che rappresenta la maggioranza con un valore del 66%, ad indicare che potrebbero esserci altri effetti non inclusi nell’equazione a spiegare la varianza. La parte genetica, invece, spiegherebbe circa il 17% della produzione di urea. Nella razza Simmental, Otwinowska-Mindur et al. (2025) hanno calcolato il valore dell’ereditabilità pari al 22% e, Lopez-Villalobos et al. (2018) il 24% in mandrie miste di Frisona e Jersey in Nuova Zelanda.

Nel modello Complete, si può notare un calo sia nei valori della quota residua sia nell'ereditabilità, rispettivamente a circa 64% e 16%. Invece, il microbioma riesce a catturare circa il 5% della variabilità, in tutti i casi è una situazione non molto diversa da quella analizzata per il contenuto di proteina e di grasso.

Infine, nel modello Only micro è possibile evidenziare il fatto che la quota residua rappresenti nuovamente la maggioranza (53%) ma, il solo microbioma spiegherebbe circa il 47% del fenotipo.

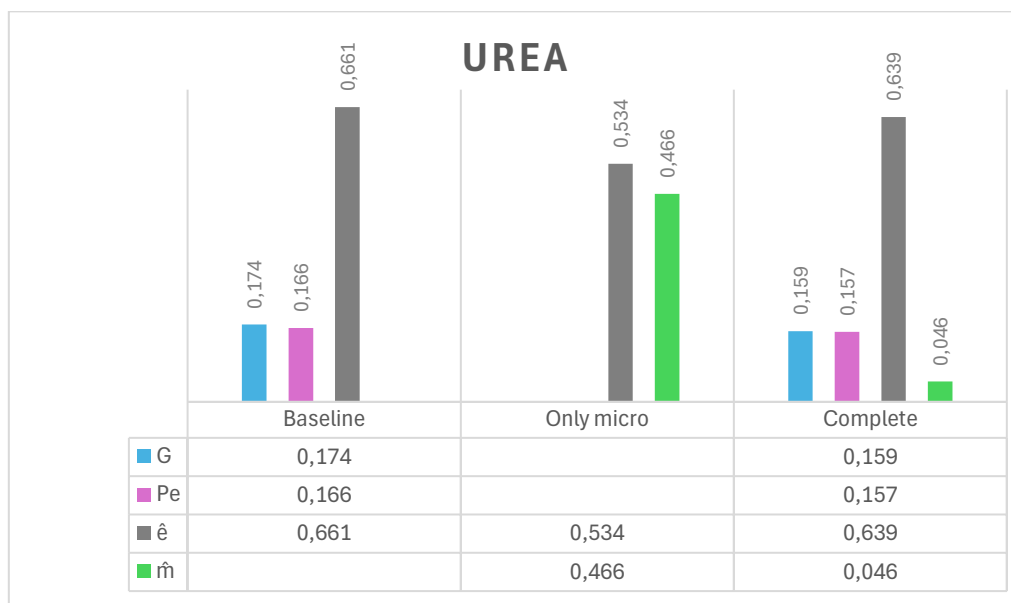


Figura 9: calcolo delle varianze per il contenuto di urea

Da questi risultati si possono evincere due cose fondamentali: la prima è che il microbiota ha una proporzione rilevante sulla produzione di latte e, la seconda, è che essa diminuisce quando vengono inseriti altri effetti.

Sebbene in letteratura ci siano pochi studi che quantificano quanto il microbioma incide sulla produzione di latte e le sue caratteristiche qualitative (es., caseina percentuale) è possibile fare un breve confronto interessante con altre specie in ambito di allevamento animale.

Ad esempio, lo studio di Martinez Boggio et al. (2023) vede come soggetti 795 pecore di razza Laucane ed è uno dei primi ad analizzare il rapporto tra il microbioma del latte e la sua composizione. L'aspetto interessante è legato al fatto che i risultati ottenuti sono stati opposti rispetto a quelli della bovina da latte. La microbiabilità (la variazione dovuta al microbiota ruminale) stimata era prossima allo zero e, pur inserendo l'effetto del microbiota, l'accuratezza non aumentava (Biffani, 2024).

Oltre a ciò, è stato condotto uno studio che riguarda tre diverse razze di suini: Duroc, Landrace e Large White, dove è stato valutato l'effetto del genoma dell'ospite e del microbiota su alcuni

caratteri di accrescimento e composizione. La microbiabilità variava dal 7 al 12% per la razza Duroc, dal 3 al 21% per la Landrace e dal 2 al 24% per la Large White. Questi risultati sono comunque da considerare rilevanti (He et al., 2022b).

Da ultimo, Zhou et al. (2023) volevano capire quanto l'efficienza alimentare in circa 700 galline ovaiole (razza Rhode Island Red) fosse influenzata dalla genetica e quanto dal suo microbioma intestinale. Tale studio ha confermato che l'efficienza alimentare ha una base genetica elevata ($h^2=0,52$) e la microbiabilità risulta del 16%, il microbioma è in grado di spiegare una parte della variazione dell'efficienza.

4.4. Associazione tra i taxa del microbioma e i caratteri produttivi

L'applicazione del modello lineare ha permesso di identificare i taxa la cui abbondanza è significativamente associata alle variazioni del fenotipo. A causa del rigore della correzione di Bonferroni e dell'elevata dimensionalità dei dati, nel presente elaborato vengono discussi dettagliatamente solo i primi 10 taxa che hanno mostrato i p-value più bassi (Figura 10). I restanti taxa che hanno raggiunto la significatività statistica, o che sono stati analizzati nel corso dello studio, sono riportati integralmente in Figura 11, che rappresenta un'informazione supplementare. Per ciascun taxon prioritario, il valore della slope (β_1) permette di interpretare la natura del legame: un valore positivo suggerisce che l'aumento del taxon è associato a un incremento del valore fenotipico, mentre un valore negativo suggerisce un'associazione inversa.

La Figura 10 mostra una heatmap relativa alle associazioni tra l'abbondanza dei generi microbici presenti nel microbioma fecale e i principali fenotipi della razza Rendena oggetto di studio. I taxa sono stati raggruppati in base al phylum di appartenenza e, successivamente elencati a seconda del genere. L'evidenza più significativa emerge all'interno del phylum Actinomycetota, dove il genere *Bifidobacterium* mostra la correlazione positiva più forte con la produzione di latte (0.37), che suggerirebbe un potenziale ruolo di tale batterio nel favorire l'efficienza produttiva; inoltre esso è conosciuto per la sua funzione probiotica.

All'interno del phylum Firmicutes si può osservare una situazione maggiormente eterogenea: generi come *Mammaliococcus*, *Jeotgalicoccus* e *Aerococcus* risultano correlati positivamente solo con il contenuto lipidico. *Lachnospiraceae* sembrano positivamente correlate con il contenuto di urea (0.25), come anche *Escherichia* (0.22). Infine, *Erysipelotrichaceae* e *Methanobrevibacter* risultano positivamente correlati con la produzione di latte (0.27; 0.23).

Nel complesso, questa analisi indica che specifici taxa del microbioma dell'intestino inferiore sono strettamente connessi con i caratteri produttivi e funzionali dell'animale.

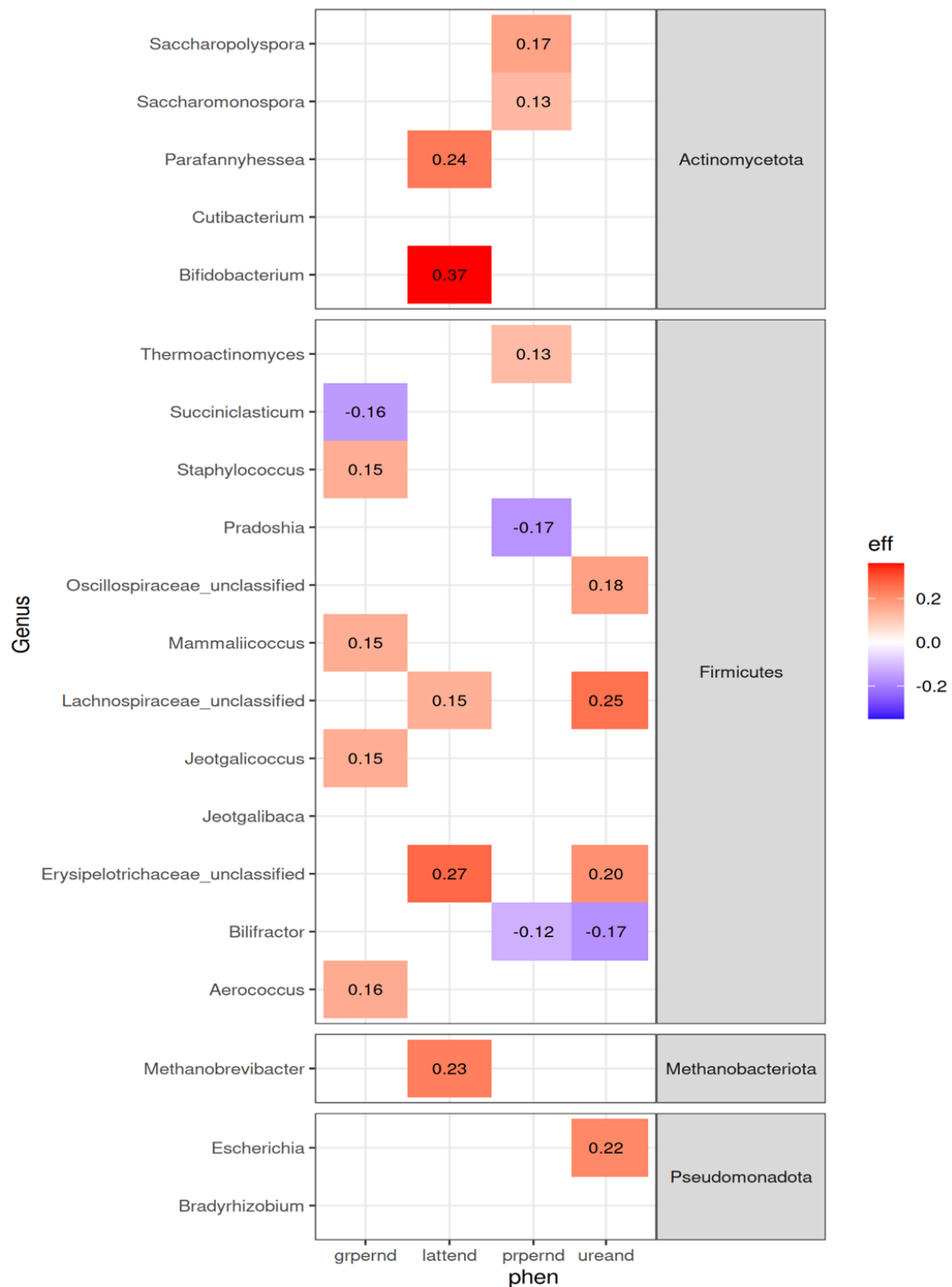


Figura 10: Associazione tra i taxa del microbioma fecale e i fenotipi considerati (grasso %, latte, proteine %, urea).

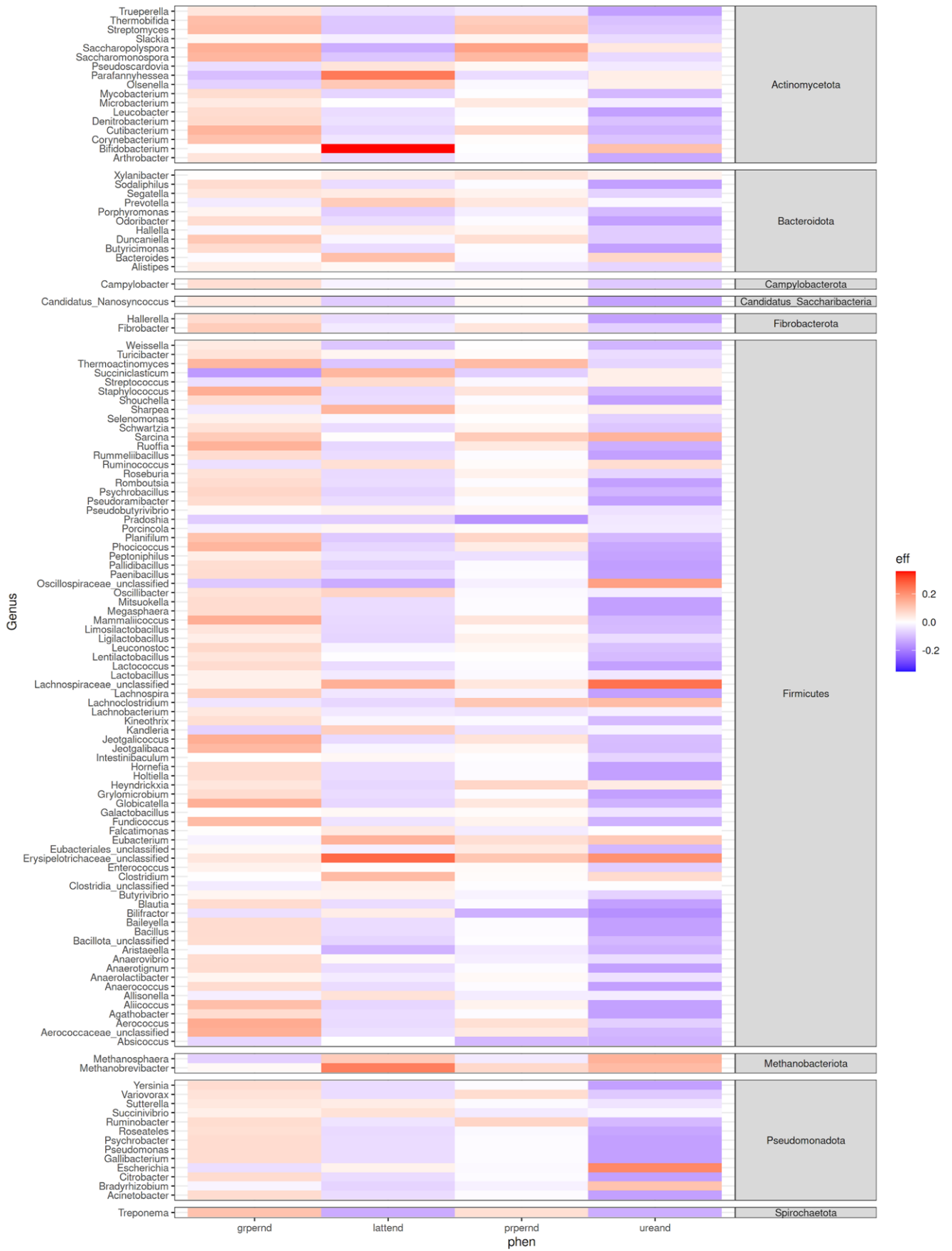


Figura 11: Tutti i taxa significativamente associati con i caratteri di produttività e di qualità del latte (grasso %, latte, proteine %, urea).

4.5. Considerazioni generali

Le analisi svolte in questo elaborato hanno mostrato che il microbiota fecale è in grado di spiegare una quota rilevante di variabilità, soprattutto per quanto riguarda la produzione di latte nella razza Rendena. Grazie all'utilizzo dei diversi modelli statistici è stato possibile comprendere anche che, il contributo del microbioma diminuisce quando vengono inclusi l'effetto genetico, animale ed ambientale. Tale situazione può essere attribuita al fatto che il microbiota possiede una sua componente genetica. Questo è dimostrato da Brulin et al. (2024), confermando che il microbioma è ereditabile e quindi possa essere influenzato dalla componente genetica dell'animale. A dimostrazione di questo, è interessante notare come il microbiota, considerato al netto dei restanti effetti (genetici e ambientali), sia in grado di assorbire più della metà della variabilità fenotipica. L'impatto del microbioma risulta maggiormente visibile nei caratteri quantitativi (kg di latte/d), rispetto ai qualitativi.

Invece, l'analisi dei taxa presenti nei campioni utilizzati ha confermato la maggior presenza di phylum batterici come Firmicutes, trovati anche nello studio di Brulin et al. (2024). Il genere *Bifidobacterium* è il maggiormente correlato a livello positivo con la produzione di latte.

Data la variabilità dei taxa coinvolti nell'associazione con i caratteri produttivi, un ulteriore sviluppo dello studio potrebbe essere studiare nel dettaglio i singoli taxa, andando a caratterizzare l'ereditabilità e quindi la microbialità dei principali taxa fecali coinvolti nella determinazione della variabilità fenotipica. E' stato visto in letteratura, a livello ruminale, in Frisona, che molti taxa ruminali sono moderatamente ereditabili ($h^2 \geq 0,15$), e le caratteristiche microbiche ereditarie sono correlate all'efficienza alimentare e agli acidi grassi volatili (Li et al., 2019). Per quanto riguarda i caratteri del latte, i batteri ruminali ereditabili hanno mostrato una microbialità media per taxon di circa lo 0,16-0,33, rispetto allo 0,03-0,06 per i taxa non ereditabili, indicando la presenza di legami più forti tra componenti genetiche dell'ospite, microbi e produzione (Zang et al., 2022).

La maggior parte degli studi di microbiabilità nei bovini ha riguardato sinora soprattutto il microbiota ruminale, mentre il microbiota fecale, pur in grado di spiegare un'importante parte della variabilità dei caratteri produttivi, è stato studiato, da questo punto di vista, in maniera estremamente limitata. La presente tesi evidenzia però l'importanza del microbiota fecale in ambito di studio della produzione bovina, in quanto esso riveste un ruolo rilevante nella determinazione della variabilità fenotipica, con possibili applicazioni predittive.

5. Conclusioni

La presente tesi ha avuto come obiettivo quello di valutare il contributo del microbiota fecale alla variabilità dei principali caratteri produttivi nella razza Rendena, importante a livello locale per la sua rusticità e resilienza. Tale scopo è risultato possibile grazie al confronto tra modelli statistici che hanno permesso di osservare come l'inclusione del microbiota, con o senza gli effetti genetici e ambientali, sia in grado di spiegare una quota rilevante della variabilità fenotipica.

I risultati evidenziano che il microbioma rappresenta una componente non trascurabile della variabilità fenotipica, in particolare per la produzione giornaliera di latte, dove la quota spiegata risulta più consistente rispetto ai caratteri qualitativi del latte. Per quanto riguarda il contenuto di proteine, grasso e urea, l'effetto del microbiota è risultato appunto più contenuto, aspetto che suggerirebbe una maggiore influenza della componente genetica e di fattori ambientali specifici.

Nonostante il campione analizzato sia relativamente limitato, è possibile tenere in considerazione l'impatto del microbioma fecale rilevato con questo studio. Esso può assumere un ruolo importante nell'ambito del miglioramento genetico e diventare fattore predittivo dei caratteri produttivi, prevedendo ad esempio il quantitativo di latte che una bovina è in grado di produrre grazie alla conoscenza del microbiota.

6. Bibliografia

- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Aguilar, I., Misztal, I., Tsuruta, S., Legarra, A., & Wang, H. (2014, August). PREGSF90–POSTGSF90: computational tools for the implementation of single-step genomic selection and genome-wide association with ungenotyped individuals in BLUPF90 programs. In *Proceedings of the 10th world congress of genetics applied to livestock production* (Vol. 3). Vancouver, BC, Canada: WCGALP.
- Aliakbari, A., Zemb, O., Cauquil, L., Barilly, C., Billon, Y., & Gilbert, H. (2022). Microbiability and microbiome-wide association analyses of feed efficiency and performance traits in pigs. *Genetics Selection Evolution*, 54(1). <https://doi.org/10.1186/s12711-022-00717-7>
- Bastiaanssen TFS, Quinn TP, Loughman A (2022) Treating Bugs as Features: A compositional guide to the statistical analysis of the microbiome-gut-brain axis. arXiv. <https://doi.org/10.48550/arxiv.2207.12475>
- Bernini, F., Mancin, E., Sartori, C., Mantovani, R., Vevey, M., Blanchet, V., Bagnato, A., & Strillacci, M. G. (2024). Genome-wide association studies for milk production traits in two autochthonous Aosta cattle breeds. *Animal*, 18(10). <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101322>
- Biffani, S. (2024). Dall'ereditabilità alla microbiabilità. *Ruminantia* .
- Brulin, L., Ducrocq, S., Estellé, J., Even, G., Martel, S., Merlin, S., Audebert, C., Croiseau, P., & Sanchez, M. P. (2024). The fecal microbiota of Holstein cows is heritable and genetically correlated to dairy performances. *Journal of Dairy Science*, 107(12), 11254–11268. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25003>
- Chang, H., Wang, X., Zeng, H., Zhai, Y., Huang, N., Wang, C., & Han, Z. (2023). Comparison of ruminal microbiota, metabolomics, and milk performance between MontbéliardexHolstein and Holstein cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1178093>
- Chen, S., Luo, S., & Yan, C. (2022). Gut microbiota implications for health and welfare in farm animals: A review. In *Animals* (Vol. 12, Number 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12010093>
- Cholewińska, P., Wołoszyńska, M., Michalak, M., Czyż, K., Rant, W., Smoliński, J., Wrosteck, A., & Wojnarowski, K. (2021). Influence of selected factors on the Firmicutes, Bacteroidetes phyla and the Lactobacillaceae family in the digestive tract of sheep. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03207-w>

- Cremonesi, P., Ceccarani, C., Curone, G., Severgnini, M., Pollera, C., Bronzo, V., Riva, F., Addis, M.F., Filipe, J., Amadori, M. and Trevisi, E. (2018). Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows. *PLoS one*, *13*(10), p.e0205054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205054>
- Difford, G. F., Plichta, D. R., Løvendahl, P., Lassen, J., Noel, S. J., Højberg, O., Wright, A. D. G., Zhu, Z., Kristensen, L., Nielsen, H. B., Guldbandsen, B., & Sahana, G. (2018). Host genetics and the rumen microbiome jointly associate with methane emissions in dairy cows. *PLoS Genetics*, *14*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007580>
- Fantini A. (2025). Ha ancora un senso controllare l'urea nel latte? *Ruminantia*. <https://www.ruminantia.it/ha-ancora-un-senso-controllare-lurea-nel-latte/>
- Guzzo, N., Sartori, C., & Mantovani, R. (2018). Genetic parameters of different measures of somatic cell counts in the Rendena breed. *Journal of Dairy Science*, *101*(9), 8054-8062.
- Guzzo, N., Sartori, C., & Mantovani, R. (2019). Analysis of genetic correlations between beef traits in young bulls and primiparous cows belonging to the dual-purpose Rendena breed. *Animal*, *13*(4), 694–701. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001969>
- He, Y., Tiezzi, F., Jiang, J., Howard, J., Huang, Y., Gray, K., Choi, J. W., & Maltecca, C. (2022a). Exploring methods to summarize gut microbiota composition for microbiability estimation and phenotypic prediction in swine. *Journal of Animal Science*, *100*(9). <https://doi.org/10.1093/jas/skac231>
- He, Y., Tiezzi, F., Jiang, J., Howard, J., Huang, Y., Gray, K., Choi, J. W., & Maltecca, C. (2022b). Exploring methods to summarize gut microbiota composition for microbiability estimation and phenotypic prediction in swine. *Journal of Animal Science*, *100*(9). <https://doi.org/10.1093/jas/skac231>
- Ikeda-Ohtsubo, W., Brugman, S., Warden, C. H., Rebel, J. M. J., Folkerts, G., & Pieterse, C. M. J. (2018). How Can We Define “Optimal Microbiota?”: A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00090>
- Jahnel, R. E., Blunk, I., Wittenburg, D., & Reinsch, N. (2023). Relationship between milk urea content and important milk traits in Holstein cattle. *Animal*, *17*(5). <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100767>
- Kim, E. T., Lee, S. E., Shin, S. M., Lim, D. H., Hur, T. Y., Kim, S. B., Oh, M. G., Jo, W., Lee, W., & Park, T. (2025). Comparative analysis of ruminal and fecal microbiomes in Holstein, Jersey, and Jeju Black cattle using multiple taxonomic classifiers. *Animal Biotechnology*, *36*(1). <https://doi.org/10.1080/10495398.2025.2574622>
- Lei, Y., Zheng, Y., Yan, Y., Zhang, K., Sun, X., Yang, B., Ge, L., Meng, Z., Cao, X., Zhang, X., Yan, X., Xu, Y., Zhang, T., Shi, J., Chen, S., Qiu, Q., Chen, Y., Deng, L., Li, Z., ... Zhang, K. (2025). Deciphering

functional landscapes of rumen microbiota unveils the role of *Prevotella bryantii* in milk fat synthesis in goats. *Genome Biology*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-025-03788-z>

Li, F., Li, C., Chen, Y., Liu, J., Zhang, C., Irving, B., Fitzsimmons, C., Plastow, G., & Guan, L. (2019).

Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. *Microbiome*, 7. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0699-1>

Lopez-Villalobos, N., Correa-Luna, M., Burke, J. L., Ab, S., Donaghy, D. J., & Kemp, P. D. (2018).

Genetic parameters for milk urea concentration and milk traits in New Zealand grazing dairy cattle.

https://www.researchgate.net/publication/326586138_Genetic_parameters_for_milk_urea_concentration_and_milk_traits_in_New_Zealand_grazing_dairy_cattle

Mancin, E., Gomez Proto, G., Tuliozi, B., Schiavo, G., Bovo, S., Fontanesi, L., Sartori, C., &

Mantovani, R. (2024). Uncovering genetic parameters and environmental influences on fertility, milk production, and quality in autochthonous Reggiana cattle. *Journal of Dairy Science*, 107(2), 956–977. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23035>

Mancin, E., Maltecca, C., Huang, Y. J., Mantovani, R., & Tiezzi, F. (2024). A first characterization of the microbiota-resilience link in swine. *Microbiome*, 12(1), 53.

<https://doi.org/10.1186/s40168-024-01771-7>.

Martinez Boggio, G., Christensen, O. F., Legarra, A., Meynadier, A., & Marie-Etancelin, C. (2023).

Microbiability of milk composition and genetic control of microbiota effects in sheep. *Journal of Dairy Science*, 106(9), 6288–6298. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22948>

Martinez Boggio, G., Monteiro, H. F., Lima, F. S., Figueiredo, C. C., Bisinotto, R. S., Santos, J. E. P.,

Mion, B., Schenkel, F. S., Ribeiro, E. S., Weigel, K. A., & Peñagaricano, F. (2024). Host and rumen microbiome contributions to feed efficiency traits in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 107(5), 3090–3103. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23869>

Martinez-Boggio, G., Monteiro, H. F., Lima, F. S., Figueiredo, C. C., Bisinotto, R. S., Santos, J. E. P.,

Mion, B., Schenkel, F. S., Ribeiro, E. S., Weigel, K. A., Rosa, G. J. M., & Peñagaricano, F. (2024). Investigating relationships between the host genome, rumen microbiome, and dairy cow feed efficiency using mediation analysis with structural equation modeling. *Journal of Dairy Science*, 107(10), 8193–8204. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24675>

Matthews, C., Crispie, F., Lewis, E., Reid, M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2019). The rumen

microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. In *Gut Microbes* (Vol. 10, Number 2, pp. 115–132). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1505176>

Mazza, S., Guzzo, N., Sartori, C., & Mantovani, R. (2016). Genetic correlations between type and

test-day milk yield in small dual-purpose cattle populations: The Aosta Red Pied breed as a

case study. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 8127–8136. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11116>

Monteiro, H. F., Zhou, Z., Gomes, M. S., Peixoto, P. M. G., Bonsaglia, E. C. R., Canisso, I. F., Weimer, B. C., & Lima, F. S. (2022). Rumen and lower gut microbiomes relationship with feed efficiency and production traits throughout the lactation of Holstein dairy cows. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08761-5>

Otwinowska-Mindur, A., Ptak, E., Jagusiak, W., & Zarnecki, A. (2025). Genetic parameters for milk production traits of Simmental cows with random regression test-day model. *Animal*, 19(2). <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101395>

Pitta, D. W., Kumar, S., Vecchiarelli, B., Baker, L. D., Ferguson, J. D., Thomsen, N., Shirley, D. J., & Bittinger, K. (2014). Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period. *Journal of Animal Science*, 92(9), 4014–4022. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7621>.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P.I., Daly, M.J. and Sham, P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American journal of human genetics*, 81(3), pp.559-575. <https://doi.org/10.1086/519795>.

Ruegg, P. L. (2022). The bovine milk microbiome – an evolving science. *Domestic Animal Endocrinology*, 79. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106708>

Ruvalcaba-Gómez, J. M., Arteaga-Garibay, R. I., Anaya-Esparza, L. M., Gómez-Godínez, L. J., Martínez-Sotelo, J. G., Hernández-Cruz, E., & Arias-Chávez, L. E. (2025). Fecal Microbiota and Performance of Dairy Cattle from a West Mexican Family Dairy Farm Supplemented with a Fiber-Degrading Enzymatic Complex. *Veterinary Sciences*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/vetsci12060518>

Sartori, C., Guzzo, N., Mazza, S., & Mantovani, R. (2018). Genetic correlations among milk yield, morphology, performance test traits and somatic cells in dual-purpose Rendena breed. *Animal*, 12(5), 906–914. <https://doi.org/10.1017/S1751731117002543>

Sartori, C., Tiezzi, F., Guzzo, N., Mancin, E., Tuliozi, B., & Mantovani, R. (2022). Genotype by Environment Interaction and Selection Response for Milk Yield Traits and Conformation in a Local Cattle Breed Using a Reaction Norm Approach. *Animals*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/ani12070839>

Sargolzaei, M., Chesnais, J.P. and Schenkel, F.S., 2014. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. *BMC genomics*, 15(1), p.478. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-478>

- Venegas, L., López, P., Derome, N., & Yáñez, J. M. (2023). Leveraging microbiome information for animal genetic improvement. In *Trends in Genetics* (Vol. 39, Number 10, pp. 721–723). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.07.004>
- Visentin, G., Penasa, M., Niero, G., Cassandro, M., & De Marchi, M. (2018). Phenotypic characterisation of major mineral composition predicted by mid-infrared spectroscopy in cow milk. *Italian Journal of Animal Science*, *17*(3), 549–556. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1398055>
- Wiggans, G. R., Misztal, I., & Van Vleck, L. D. (1988). Implementation of an Animal Model for Genetic Evaluation of Dairy Cattle in the United States. *Journal of Dairy Science*, *71*, 54–69. [https://doi.org/10.1016/S0022-0302\(88\)79979-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0302(88)79979-8)
- Xue, M. Y., Sun, H. Z., Wu, X. H., Liu, J. X., & Guan, L. L. (2020). Multi-omics reveals that the rumen microbiome and its metabolome together with the host metabolome contribute to individualized dairy cow performance. *Microbiome*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00819-8>
- Zang, X.-W., Sun, H.-Z., Xue, M.-Y., Zhang, Z., Plastow, G., Yang, T., Guan, L. L., & Liu, J.-X. (2022). Heritable and Nonheritable Rumen Bacteria Are Associated with Different Characters of Lactation Performance of Dairy Cows. *MSystems*, *7*(5). <https://doi.org/10.1128/msystems.00422-22>
- Zhao, X., Zheng, N., Zhang, Y., & Wang, J. (2025). The role of milk urea nitrogen in nutritional assessment and its relationship with phenotype of dairy cows: A review. In *Animal Nutrition* (Vol. 20, pp. 33–41). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.08.007>
- Zhou, Q., Lan, F., Gu, S., Li, G., Wu, G., Yan, Y., Li, X., Jin, J., Wen, C., Sun, C., & Yang, N. (2023). Genetic and microbiome analysis of feed efficiency in laying hens. *Poultry Science*, *102*(4). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102393>