

## **Azione 2: Caratterizzazione genetica della razza “Bufala Mediterranea Italiana”.**

Le attività dell'azione 2 di BIG mirano a caratterizzare geneticamente la bufala Mediterranea Italiana, sia mediante analisi cariologiche che attraverso l'applicazione della selezione genomica, per il benessere e la selezione contro anomalie genetiche e per la conservazione della variabilità genetica della razza Mediterranea Italiana.

### **Task 2.1. Caratterizzazione genomiche**

Scopo del task 2.1 è stato quello di effettuare le analisi genomiche dei soggetti il cui DNA è stato raccolto negli step precedenti e durante il quarto step. Nell'azione 8, infatti, sono stati raccolti campioni di DNA da utilizzarsi per la caratterizzazione genomica. In questo step sono stati genotipizzati 1045 soggetti.

### **Task 2.2. Sequenziamento completo capostipiti**

Scopo del task 2.2 è stato quello di effettuare un sequenziamento completo di 20 soggetti appartenenti alla razza Mediterranea Italiana. Il sequenziamento rappresenta uno step fondamentale nell'evoluzione della tecnica genomica. Attraverso tale processo è possibile determinare l'esatta sequenza dei 4 nucleotidi (Adenina, Citosina, Timina, Guanidina) che caratterizzano il DNA e i geni che costituiscono l'intero genoma dei diversi organismi viventi per identificarne la posizione. Le tecniche di sequenziamento si sono evolute nel corso degli anni, giungendo fino ad oggi alla possibilità di raggiungere profondità di analisi molto elevate. Nel caso del progetto BIG, seppur in fase progettuale fosse stato deciso di effettuare un sequenziamento ad una “profondità” di 20 reads per ogni frammento di DNA (comunemente definito anche coverage 20x), la possibilità di ottenere un maggior numero di informazioni con tecniche di sequenziamento ad una profondità maggiore ed a costo contenuto, ha portato alla scelta di effettuare tale tipologia di analisi almeno su una quota dei soggetti da sequenziare.

**A.N.A.S.B. • Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina**

Via F. Petrarca 42/44 - Loc. Centurano 81100 - Caserta (CE) • Tel. 0823/356743 • Fax 0823/320964 • Email: [info@big-anasb.it](mailto:info@big-anasb.it) • [www.big.anasb.it](http://www.big.anasb.it)



FEASR  
Fondo europeo agricolo  
per lo Sviluppo Rurale:  
“l'Europa investe nelle zone rurali”

Progetto finanziato nell'ambito  
della Sottomisura 10.2 - PSRN 2014/2020

Autorità di gestione:  
Direzione Generale dello Sviluppo Rurale  
Ministero delle politiche alimentari e forestali

**mipaaf**  
ministero delle politiche  
agricole alimentari e forestali

### **Task 2.3. Genotipizzazione geni candidati al fine di piani di selezione GAS (Gene Assisted Selection)**

Scopo del task 2.3 è di caratterizzare circa 2000 soggetti di LG con dati fenotipici produttivi e riproduttivi per una serie di mutazioni già conosciute. In particolare, sono stati presi in considerazione i seguenti geni candidati:

- ✓ MFSD14A, SLC35A3, PALMD, RGS22 e VPS13B- per caratteristiche quanti-qualitative del latte;
- ✓ SMARCA4 e WNT7A- responsabili dell'emimelia trasversa nel bufalo;
- ✓ Lattoferrina (LTF) associato alla resistenza alla mastite
- ✓ MBL2 legato ad una maggiore efficienza del sistema immunitario

Nel periodo in oggetto sono stati analizzati i 9 geni candidati.

### **Task 2.4. Analisi cariológica dei soggetti maschi abilitati alla IS**

Scopo del Task 2.4. è di effettuare un'analisi cariológica di alcuni soggetti di particolare valore genetico per identificare potenziali anomalie trasmissibili alla progenie. Infatti, prima di essere abilitato alla riproduzione, oltre che possedere i requisiti previsti dal Libro Genealogico gestito dall'Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina (ANASB), è importante verificare che un toro sia esente da anomalie cromosomiche che possano influenzare negativamente le capacità riproduttive sue e della propria progenie. Pertanto, durante il periodo di riferimento il Laboratorio di Genetica Veterinaria e Biotecnologie applicate alle Produzioni Animali – GENENVET - del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, nell'ambito del Progetto BIG, ha effettuato la valutazione citogenetica di 8 tori bufalini di razza Bufala Mediterranea Italiana, in prova di progenie.

Le anomalie cromosomiche vengono distinte in *numeriche* (aneuploidie), se consistono in deviazioni dal numero diploide tipico della specie, o *strutturali*, se consistono in modificazioni morfo-strutturali dei cromosomi. Quest'ultime, se bilanciate, non comportando alterazioni visibili nella morfologia dell'animale, sfuggono alla selezione e con la pratica dell'inseminazione strumentale possono essere facilmente trasmesse alla progenie ed essere responsabili di ipofertilità o in taluni casi, di alterazioni nello sviluppo. Ad oggi nella specie bufalina le anomalie cromosomiche descritte sono principalmente le aneuploidie a carico dei cromosomi sessuali che,

ben tollerate dalla specie, sono responsabili principalmente di sterilità. Pertanto, il controllo citogenetico, ormai da qualche anno effettuato di *routine* nella filiera bufalina per caratterizzare i tori in prova progenie, riveste un ruolo fondamentale anche nel corretto management dell'allevamento, rappresentando un utile strumento d'ausilio per evitare il rischio di diffondere anomalie che ridurrebbero il potenziale riproduttivo e produttivo della mandria.

Per ogni soggetto sono state applicate le medesime metodiche descritte nel report precedente e che si riportano per completezza di informazione. È stato effettuato un prelievo di circa 5 ml di sangue in provette di tipo vacutainer con sodio eparina quale anticoagulante; il campione è stato processato entro 36 ore dal prelievo. Il campione, refrigerato, portato in laboratorio e identificato con un codice univoco, è stato impiegato per l'allestimento di due colture cellulari finalizzate allo studio:

- ✓ delle bande C (tecnica di bandeggio CBA) per evidenziare eventuali condizioni di aneuploidia a carico dei cromosomi sessuali;
- ✓ del cariotipo (tecnica di bandeggio R), per esaminare in dettaglio i cromosomi.

Le colture sono state allestite in fiasche sterili da 50 ml seguendo un protocollo specifico per la specie bufalina che prevede l'aggiunta di RPMI, siero fetale bovino, penicillina-streptomina, L-glutamina, amfotericina B, concanavalina A ed una goccia di eparina di sodio; successivamente sono poste in incubatore CO<sub>2</sub> a 37,5°C per circa 72 h. Per le colture destinate all'analisi del cariotipo, 5h prima del termine si aggiunge la 5-Bromodesossouridina (5-BrdU), un analogo della timina che agisce durante le fasi S1 e S2 del ciclo cellulare, e l'Hoescht 33528. Per tutte le colture, un'ora prima del termine, è aggiunto il Colcemid, inibitore mitotico che permette di bloccare i cromosomi allo stadio di metafase. La lavorazione delle colture prevede un trattamento ipotonico (KCl 0,075 M) e diversi fissaggi in metanolo/acido acetico (3:1) l'ultimo dei quali effettuato overnight. Tre gocce di sospensione cellulare sono fatte cadere su vetrini sgrassati e immersi in un becker contenente acqua distillata; i vetrini così preparati vengono fatti asciugare a temperatura ambiente per circa 7 giorni per l'analisi del cariotipo con bande R, e 10 giorni per il test delle CBA.

I protocolli per la colorazione dei vetrini sono differenti a seconda del tipo di esame; per l'analisi del cariotipo con bande R i vetrini sono colorati per 20 minuti con H33258 (20µg/ml), quindi dopo essere stati lavati con abbondante acqua distillata sono montati in 2XSSC ed esposti per 45 minuti agli UV. Segue un ulteriore lavaggio e colorazione con arancio d'acridina (0,01%) per 10 minuti.

4

Per lo studio delle bande C, i vetrini sono incubati a temperatura ambiente in HCl (0,1N), quindi dopo essere stati lavati con abbondante acqua distillata vengono incubati con Ba(OH) (5% in H<sub>2</sub>O deionizzata) a 55° C per tempi compresi tra i 20 e i 30 minuti. Segue un ulteriore lavaggio e incubazione in 2XSSC a 60° per 30 min quindi passaggi sequenziali per pochi secondi in 2XSSC, etanolo a 75°, 95° e 99°. I vetrini vengono colorati a temperatura ambiente con Arancio d'acridina (0,01%) per 1 ora e montati in buffer fosfato pH7.

I vetrini sono osservati al microscopio a fluorescenza dopo 24 h dalla colorazione; per ciascun animale sono acquisite le immagini e trasferite su PC per la successiva processazione. In particolare, per l'analisi del cariotipo sono state studiate 5 metafasi RB per la costruzione del Cariotipo, 30 metafasi RB per il controllo specifico del bandeggio dei cromosomi sessuali. Per l'analisi delle CBA sono analizzate 100 metafasi per l'evidenziazione dei cromosomi sessuali e di eventuali anomalie.

In questo step sono stati 8 i tori cariotipizzati, ma uno è stato analizzato due volte in quanto presentava instabilità cromosomica.

Tutti i tori processati hanno presentato un cariotipo normale, 2n=50, XY e assenza di anomalie cromosomiche specifiche (entro i limiti della tecnica).