

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 durante i vari step di progetto. Nell'azione 8, infatti, sono stati raccolti campioni di DNA da utilizzarsi per la caratterizzazione genomica. In totale per questo step sono stati genotipizzati 2606 soggetti.

Task 2.4. Analisi cariologica dei soggetti maschi abilitati alla IS

Scopo del Task 2.4. è di effettuare un'analisi cariologica 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

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 • 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

2 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 CO₂ a 37,5°C per circa 72 h. Per le colture destinate all'analisi del cariotipo, 5h prima del termine si aggiunge la 5-Bromodesossiridina (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.

3

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 H₂O 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.

I campioni analizzati sono stati:

✓ Otto soggetti maschi da destinare alla FA;

Tutti i tori processati hanno presentato un cariotipo normale, 2n=50, XY e assenza di anomalie cromosomiche specifiche (entro i limiti della tecnica). In particolare, sono state studiate 5 metafasi RB per la costruzione del Cariotipo, 30 metafasi RB per il controllo specifico del bandeggio dei cromosomi sessuali, 100 metafasi CBA per il controllo delle aneuploidie.