

AZIONE 6: MONITORAGGIO DELLA DIVERSITÀ GENETICA.

L'obiettivo della presente azione è studiare in maniera approfondita la struttura genetica della popolazione di LG, al fine di garantire la conservazione della variabilità genetica complessiva attualmente disponibile. Questo monitoraggio è assolutamente necessario, anche in considerazione del fatto che a partire degli anni '90, il programma di miglioramento genetico della bufala Mediterranea Italiana è in continua evoluzione, con l'adozione di tecniche riproduttive più sofisticate ed efficienti (quali inseminazione strumentale e trasferimento embrionale) oltre all'applicazione di metodologie BLUP per il calcolo di indici genetici, fattori che hanno sicuramente avuto un effetto sulla struttura genetica della popolazione. La Bufala Mediterranea Italiana costituisce parte del patrimonio storico e culturale del Paese e la sua salvaguardia è una priorità indiscutibile. Pertanto, la corretta gestione della sua diversità genetica è essenziale per la sua sostenibilità (UNEP, 1992). Secondo Gama (2002) la caratterizzazione di un sistema produttivo, compresa la profonda conoscenza della struttura demografica, deve essere effettuata in qualsiasi programma di miglioramento genetico. Conoscere la struttura di una popolazione, la sua variabilità e flusso genico, sono necessari all'interno di qualsiasi programma di selezione, inoltre l'analisi demografica evidenzia le circostanze che influenzano la popolazione (Valera et al., 2005).

Su tali basi è stata analizzata la variabilità genetica della popolazione di bufala Mediterranea Italiana, nella quale il rischio di consanguineità è particolarmente elevato, sia per il ridotto numero di tori utilizzati nei programmi di inseminazione strumentale, sia per l'assoluto isolamento da altre razze avvenuto negli ultimi 70 anni. Basti ricordare che subito dopo la Seconda Guerra Mondiale in Italia erano presenti circa 14.000 capi e la bufala era da molti considerata come una specie in via di estinzione.

Dati utilizzati

Il dataset utilizzato per questo studio consiste nei dati del Libro Genealogico della Bufala Mediterranea Italiana (BMI), gestito dall'Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina (ANASB). I dati sono stati verificati e validati in base alla correttezza della data di nascita, sesso, genitori, escludendo così informazioni discordanti. Dopo il processo di editing, il database includeva 788.660

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

animali (605.920 femmine e 182.740 maschi). Il database includeva le seguenti informazioni: matricola del soggetto, del padre e della madre, sesso, data di nascita, stato (vivo / morto), provincia ed allevamento. La preparazione, l'editing dei dati e tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando l'ambiente di programmazione R v.3.6.1 (R Core Team, 2019). I diversi parametri demografici sono stati calcolati utilizzando il package optiSel v.2.0.3. (Wellmann, 2019). Al fine di monitorare la variabilità genetica, sono stati calcolati e presi in considerazione i seguenti parametri di diversità genetica:

- ✓ Numero effettivo di fondatori (f_e): è definita come la probabilità che due alleli estratti casualmente nella popolazione studiata provengano dallo stesso fondatore. (James, 1972). È calcolato dal contributo genetico dei fondatori nel pool genetico della popolazione. (Lacy, 1989).
- ✓ Numero effettivo di antenati (f_a): definito come il numero minimo di antenati, non necessariamente fondatori, che spiega la completa diversità genetica di una popolazione (Boichard et al., 1997).
- ✓ Numero effettivo di fondatori nel genoma (f_g): rappresenta gli effetti di contributi ineguali da parte di fondatori, strozzature e deriva genetica e pertanto corrisponde al numero di fondatori che dovrebbero produrre la stessa diversità genetica nel studiare la popolazione se i fondatori fossero equamente rappresentati e senza perdita di alleli (Lacy, 1989).
- ✓ I rapporti f_e/f_a : sono stati inoltre calcolati, dove un valore più elevato indica che la popolazione ha subito un forte collo di bottiglia e quindi perdita di variabilità genetica.
- ✓ Native Genome Equivalent: è il numero minimo di fondatori che sarebbero necessari per creare una popolazione composta da individui non imparentati che ha la stessa diversità di alleli nativi della popolazione oggetto di studio (Wellmann et al., 2012).
- ✓ Native effective size: definita come la dimensione di una popolazione di accoppiamento casuale idealizzata per la quale la diversità genetica diminuisce tanto velocemente quanto diminuisce la diversità degli alleli nativi nella popolazione oggetto di studio (Wellmann et al., 2012). Pertanto, la dimensione effettiva nativa quantifica la velocità con cui diminuisce la diversità degli alleli nativi. Al contrario, la dimensione effettiva quantifica quanto velocemente diminuisce la diversità genetica.
 - ✓ Contributo della regione nella composizione della razza.

I risultati della valutazione retrospettiva dei contributi genetici accumulati dai fondatori e dagli gli antenati sono riassunti nella **Tabella 1**.

Tabella 1. Analisi delle probabilità dell'origine dei geni.

ITEM	PERIODO STEP 6
Numero del contributo dei fondatori (f)	29810
Numero della contribuzione degli antenati	14759
Numero effettivo di fondatori (f_e)	460
Numero effettivo di antenati (f_a)	149
Rapporto f_e/f_a	3
Numero di antenati che contribuiscono al 50% della variabilità genetica	202

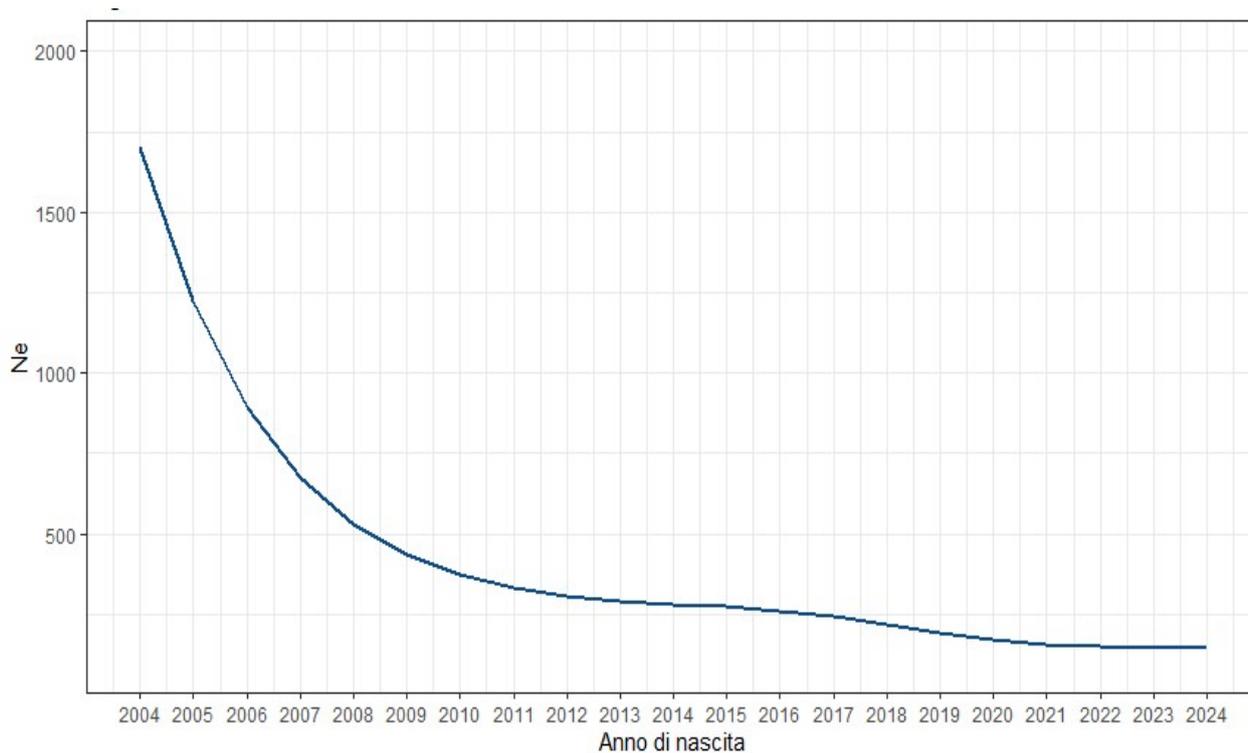


Figura 1. Andamento dei nativi effective size.

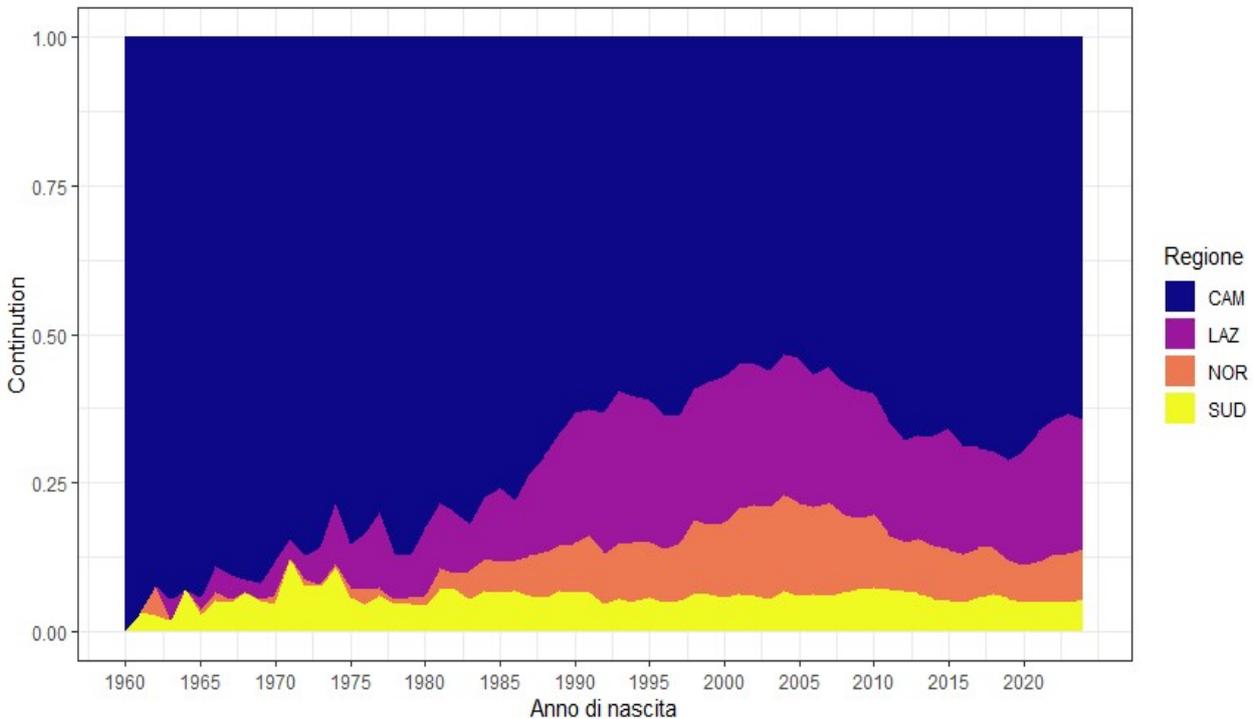


Figura 2. Contributo della regione nella composizione della razza

VARIABILITÀ GENOMICA NELLA BUFALA MEDITERRANEA ITALIANA

La Bufala Mediterranea Italiana costituisce parte del patrimonio storico e culturale del Paese e la sua salvaguardia è una priorità indiscutibile. Pertanto, la corretta gestione della sua diversità genetica è essenziale per la sua sostenibilità (UNEP, 1992). Conoscere la struttura di una popolazione, la sua variabilità e flusso genico, sono necessari all'interno di qualsiasi programma di selezione, inoltre l'analisi demografica evidenzia le circostanze che influenzano la popolazione (Valera et al., 2005). Rispetto ad altri ruminanti, la bufala ha una maggiore capacità di convertire alimenti a basso valore nutritivo ed un'elevata capacità di adattamento e sopravvivenza in diversi ambienti con diversa topografia, clima e vegetazione (Li et al., 2020). In particolare, per quanto riguarda la sua tolleranza al caldo, recenti studi molecolari hanno dimostrato che le razze di bufali storicamente allevate in un clima caldo possono aver sviluppato una maggiore tolleranza al calore (Mokhber et al., 2019). A

questo si aggiunge inoltre, che i bufali hanno una longevità maggiore dei bovini (possono superare i 30 anni, mantenendo la loro capacità riproduttiva fino a 18-25 anni) (Gómez et al., 2021).

Al di là delle caratteristiche fenotipiche che differenziano le varie razze o sub-specie, uno degli obiettivi di tutti i ricercatori a livello mondiale è sempre stato quello di capire e studiare cosa si “nasconde” dietro al fenotipo e quindi la struttura genetica. È la struttura genetica che ci permette di capire davvero quanto 2 individui siano simili e cosa determina, ad esempio, la loro produzione. L'ultimo decennio è stato sicuramente prodigo di novità ed ha fornito strumenti innovativi (come ad esempio pannelli di marcatori ad alta densità) che hanno permesso di esplorare aspetti sino ad ora meno conosciuti.

Diversi studi sulla diversità genetica delle popolazioni di bufali d'acqua sono stati condotti in tutto il mondo, soprattutto utilizzando informazioni provenienti da dati molecolari (microsatelliti, SNP) (Kataria et al., 2009, Ángel-Marín et al., 2010, Gargani et al., 2010, Mekawy et al., 2012, Özkan Ünal et al., 2014, Vohra et al., 2017, Khade et al., 2020). Per quanto detto è evidente l'importanza del monitoraggio dei parametri di diversità genetica e della struttura della popolazione nella BMI, in quanto tali risultati aiuteranno a formulare un'efficace politica di allevamento e gestione, dando forma a futuri piani di conservazione per mantenere la diversità della razza.

La sequenza completa del genoma bufalino per la Bufala Mediterranea Italiana è stata completata dal Water Buffalo Genome Consortium nel 2013 ed una delle attività più impegnative è stata quella relativa al processo di annotazione, cioè quel lavoro che progressivamente colloca i diversi geni nella posizione precisa in cui si trovano sui diversi cromosomi. Il lavoro è poi proseguito nel 2017 quando è stato anche sviluppato e validato un chip con circa 90.000 marcatori da utilizzare per le analisi genomiche delle razze bufaline di tipo River, a cui appartiene la Bufala Mediterranea (Iamartino et al., 2017). Il chip “90K Affimetrix” costituisce, di fatto, una buona base di partenza sia per l'avvio di programmi di selezione genomica che per lo studio della biodiversità.

Il sequenziamento rappresenta il punto di partenza per tutti gli studi genomici e consente di avere accesso ai più moderni strumenti per lo sviluppo del potenziale genetico della razza e di poter gettare le basi della selezione genomica nella Bufala Mediterranea. Per tanto, il presente studio è stato condotto per determinare la diversità e la struttura genetica della Bufala Mediterranea Italiana

Dati utilizzati



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

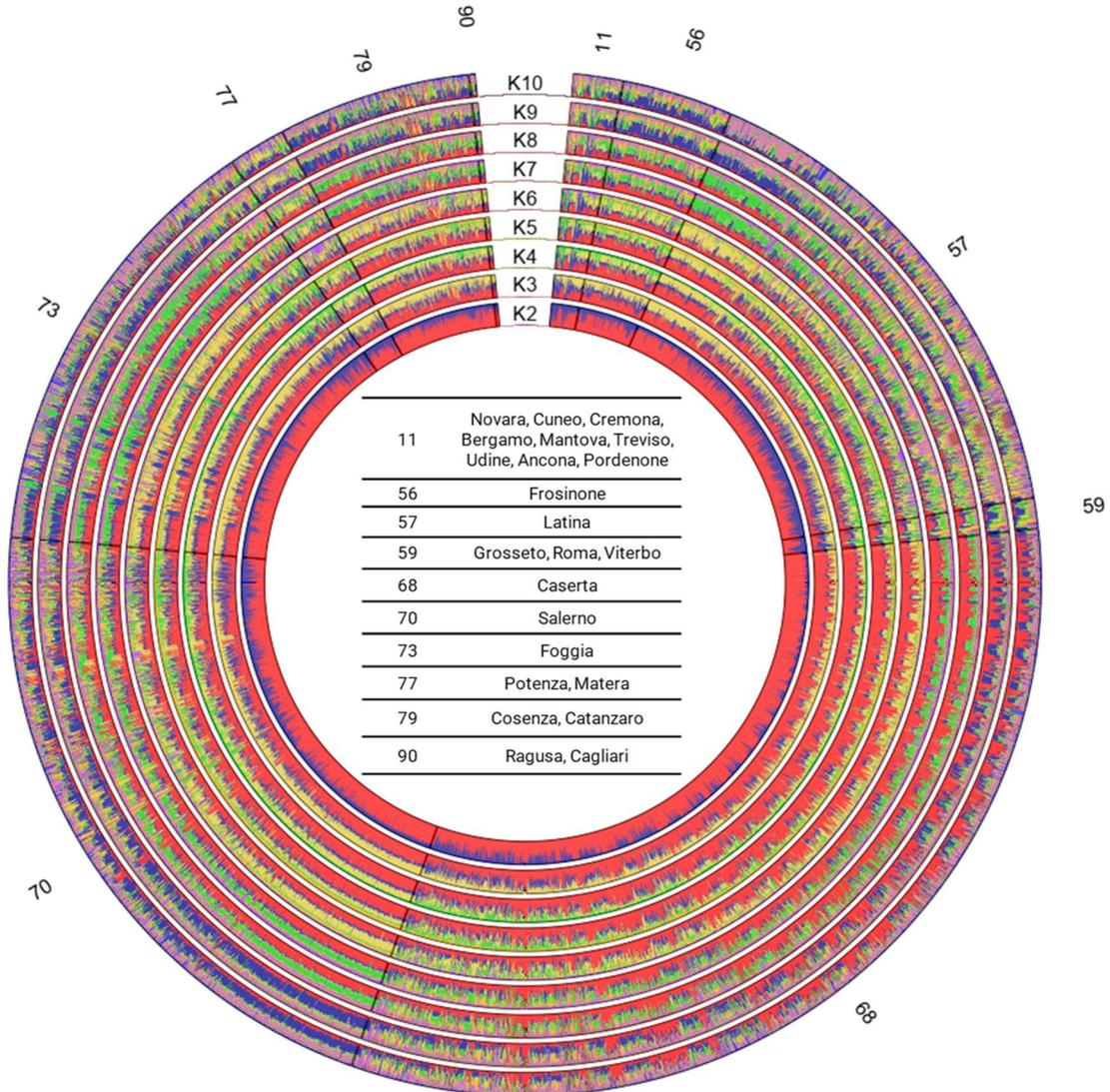
Autorità di gestione:
Direzione Generale dello Sviluppo Rurale
Ministero delle politiche alimentari e forestali



6

I dati utilizzati in questo studio consistono dei dati genomici di animali iscritti al Libro Genealogico della Bufala Mediterranea Italiana (BMI), gestito dall'Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina (ANASB). I campioni biologici sono stati inviati al Laboratorio di Genetica e Servizi (Agrotis) e la genotipizzazione è stata effettuata utilizzando il chip Axiom™ Buffalo Genotyping Array 90k (Thermo Fisher), specifico per la specie bufalina. Questo chip permette la genotipizzazione di 90,000 punti di variazione su tutto il genoma dell'animale.

Grazie alle diverse collaborazioni progettuali nazionali ed internazionali stato possibili genotipizzare un campione rappresentativo della Bufala Mediterranea Italiana è che a permesso fare questo primer studio sulla diversità genomica. Sono stati analizzati un totale di 4.505 animali appartenenti a 23 province, che a posteriori d'accordo a la numerosità sono aggruppate in 10 province/gruppi.



Analisi de ADMIXTURE delle 11 province-gruppi sulla base di un'analisi di 52.917 SNP con un K = 2-10