

RAZZE BOVINE BIANCHE ITALIANE DA CARNE: PROFILO CITOGENETICO

Molteni L. (1), De Giovanni A. (1), De Lorenzi L. (1), Di Meo G.P. (2), Iannuzzi L. (2),
Succi G. (1)

- (1) *Istituto di Zootecnia Generale - Facoltà di Agraria - Università degli Studi di Milano - Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy.*
(2) *CNR-ISPAAAM - Via Argine 1085, 80147 Napoli, Italy.*

RIASSUNTO - Si riportano i risultati relativi alle indagini citogenetiche effettuate nel periodo Gennaio 1980 - Gennaio 2005 su 15355 probabili riproduttori appartenenti alle Razze Bovine Bianche Italiane da Carne al fine di individuare in soggetti fenotipicamente normali l'eventuale presenza di anomalie cromosomiche. Di questi: 14084 animali sono risultati cariologicamente normali ($2n=60,XY$), 108 portatori di chimerismo $2n=60,XX/60,XY$, 1153 portatori di traslocazione Robertsoniana rob(1;29), 1 portatore di traslocazione Robertsoniana rob(14;17) e 1 di traslocazione Robertsoniana rob(13;19). Oltre ad 1 soggetto portatore di traslocazione reciproca rcp(Y;9) ed 1 portatore di traslocazione reciproca rcp(11;21), 5 soggetti sono risultati portatori di trisomia $2n=61,XXY$.

PAROLE CHIAVE: Cariotipo bovino, Anomalie cromosomiche, Traslocazione Robertsoniana, Traslocazione reciproca, Trisomia, Chimerismo cellulare.

INTRODUZIONE

Nell'allevamento bovino intensivo, la fertilità rappresenta uno dei fattori fondamentali su cui è basata la redditività complessiva dell'azienda. Anche se le ricerche in campo zootecnico hanno portato ad una larga diffusione di tecnologie d'allevamento avanzate, il problema dell'ipofertilità persiste nell'allevamento bovino, pur se con entità variabile nel tempo, nell'ambito delle differenti condizioni locali e, in particolare, nelle razze allevate. Una delle cause principali dell'abbassamento di fertilità nei bovini è da ascrivere alla presenza di anomalie cromosomiche bilanciate che, come già accertato, non hanno implicazioni fenotipiche, ma determinano un aumento di ritorni in calore irregolari dovuti a morte dell'embrione nelle prime fasi del suo sviluppo (Gustavsson, 1969, Succi *et al.*, 1979; Succi *et al.*, 1982; Molteni *et al.*, 1996; Ducos *et al.*, 2000; Soto & King, 2004).

MATERIALI E METODI

L'indagine citogenetica è stata condotta su soggetti maschi delle razze bovine Bianche Italiane da Carne iscritti al Libro Genealogico, utilizzati o destinati ad una probabile carriera riproduttiva sia in inseminazione strumentale che in monta naturale (tabella 1), a seguito di una convenzione tra il Laboratorio di Citogenetica dell'Istituto di Zootecnia Generale della Facoltà di Agraria di Milano e l'Associazione Nazionale Allevatori Bovini Italiani da Carne (A.N.A.B.I.C.)

Le analisi citogenetiche sono state eseguite utilizzando colture di sangue intero secondo il metodo di De Grouchy *et al.* (1964), leggermente modificato. Le tecniche di bandeggio RBA, RBG, CBG e di ibridazione in situ (FISH) sono state applicate per i soli soggetti risultati portatori di anomalie non precedentemente identificate. I cromosomi sono stati classificati secondo l'ISCNDB 2000 (2001). Per alcuni soggetti si è potuto studiare il comportamento delle anomalie alla meiosi e la loro presenza nella progenie. Si è studiata la capacità fecondante del materiale seminale dei tori risultati portatori di anomalie cromosomiche di struttura utilizzando la tecnica della fecondazione in vitro. Nei soggetti azoospermici e/o oligospermici si è proceduto allo studio anatomo-morfologico ed istologico dei testicoli.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Accanto ai 14084 soggetti cariologicamente normali ($2n=60,XY$), ai 108 soggetti portatori di chimerismo cellulare $2n=60,XX/60,XY$ e ai 1153 soggetti portatori della ben nota e più frequente traslocazione Robertsoniana $rob(1;29)$, ritrovata nelle razze Chianina, Marchigiana, Maremmana, Podolica e Romagnola sia nello stato eterozigote che in quello omozigote, sono state individuate le anomalie sotto riportate.

Tra le anomalie riguardanti la struttura dei cromosomi si ricordano:

-le traslocazioni Robertsoniane o fusioni centriche:

$rob(6;8)$ + frammento nella razza Chianina (De Giovanni *et al.*, 1988, Di Meo e coll, 2000);

$rob(14;17)$ nella razza Marchigiana (De Giovanni *et al.*, 1993; De Giovanni *et al.*, 1994);

$rob(13;19)$ nella razza Marchigiana (Molteni *et al.*, 1998);

-le traslocazioni reciproche:

$rcp(Y;9)$ nella razza Chianina (Iannuzzi *et al.*, 2001);

$rcp(11;21)$ nella razza Chianina (2004, in corso di studio).

Sono stati pure individuati soggetti portatori di anomalie cromosomiche di numero:

trisomia $2n=61,XXY$ nella razza Chianina (Molteni *et al.*, 1995; Molteni *et al.*, 1999).

La tabella 2 indica i risultati finora ottenuti.

Le anomalie cromosomiche $rob(6;8)+fragm.$, $rob(14;17)$ e $rob(13;19)$, individuate, come la $rob(1;29)$, in soggetti fenotipicamente normali e osservate anche nella progenie, a differenza di quest'ultima, sono comparse de novo. La presenza di un doppio centromero conferma la loro recente formazione. Incroci programmati tra soggetti portatori delle differenti anomalie cromosomiche hanno permesso di ottenere individui portatori di più traslocazioni diversamente combinate tra loro.

Per quanto riguarda la capacità fecondante, le ripetute fecondazioni in vitro non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra il materiale seminale ottenuto dai soggetti portatori delle fusioni centriche sopra citate e quello di tori cariologicamente normali (Molteni *et al.*, 1998; Molteni *et al.*, 2005, in corso di stampa).

Lo studio dei complessi sinaptonemici (Molteni *et al.*, 1991) effettuato sugli spermatozoi ottenuti per biopsia testicolare del soggetto portatore della $rob(6;8)+fragm.$ ha permesso di evidenziare:

-normale appaiamento dei cromosomi nel trivalente (sinapsi completa);

-omologhi liberi in posizione cis, fatto che favorirebbe una successiva segregazione alternata;

-assenza di associazione tra il trivalente e il bivalente sessuale, con conseguente normale spermatogenesi.

Secondo Forejt *et al.* (1981) e Rosemann *et al.* (1985), infatti, nell'uomo e nel topo un'eventuale associazione determinerebbe una riduzione del numero degli spermatozoi con conseguente oligospermia negli individui portatori di fusioni centriche.

Per quanto riguarda la traslocazione reciproca $rcp(Y;9)$, questa è stata individuata in un giovane soggetto di razza Chianina le cui metafasi presentavano un gonosoma Y anormalmente lungo. Il giovane maschio, nato da genitori cariologicamente normali e fratello di tori già utilizzati per la riproduzione, si presentava morfologicamente normale. Il bandeggio CBG e il bandeggio RBG hanno evidenziato un reciproco scambio di segmenti tra il cromosoma Y e uno dei due autosomi della coppia 9.

L'ibridazione in situ (FISH) ha permesso di individuare con precisione i punti di rottura e le regioni cromosomiche implicate nella traslocazione che può essere pertanto indicata come $rcp(Y;9)(q12.3;q21.1)$.

L'esame del liquido seminale del soggetto in esame ha rivelato la presenza di una evidente azoospermia.

Sono risultati portatori di trisomia gonosomica $2n=61,XXY$ (Sindrome di Klinefelter) 5 soggetti di razza Chianina. L'esame clinico dei soggetti diagnosticava un chiaro ipogonadismo (dimensioni dei testicoli mediamente di circa 6 x 3 cm con un peso di circa 30 grammi). L'esame istologico dei testicoli ha evidenziato tubuli seminiferi delimitati dalle sole cellule del

Sertoli e con chiari segni di degenerazione ialina. Le cellule interstiziali erano iperplasiche. L'ejaculato era azoospermico.

CONCLUSIONI

Alla luce del considerevole numero di anomalie cromosomiche riscontrate per la prima volta e dell'ancora elevata presenza della rob(1;29) nelle razze bovine Bianche Italiane da Carne individuate nel nostro Laboratorio grazie alle tecniche di citogenetica clinica, sembra opportuno continuare l'indagine routinaria sui soggetti destinati alla riproduzione al fine di evitare la diffusione di un'eventuale anomalia cromosomica nella popolazione e di individuare precocemente nei giovani soggetti morfologicamente normali tutte quelle patologie cromosomiche che ne ridurrebbero o annullerebbero la fertilità.

Tabella 1 – Soggetti esaminati per razza e per anno.

Table 1 - Subjects examined by breed and year

Anno Year	Razza Breed				
	Chianina <i>Chianina</i>	Marchigiana <i>Marchigiana</i>	Maremmana <i>Maremmana</i>	Podolica Italiana <i>Italian Podolian</i>	Romagnola <i>Romagnola</i>
	n°	n°	n°	n°	n°
Fino al 1990 <i>Until 1990</i>	1859 <i>1859</i>	455	35	—	474
1991	375	213	30	11	243
1992	483	269	43	—	182
1993	454	280	1	—	216
1994	395	226	—	—	255
1995	428	325	—	—	220
1996	408	264	24	—	238
1997	333	207	83	—	182
1998	374	283	84	—	232
1999	326	271	85	—	193
2000	307	240	103	—	177
2001	292	244	34	—	160
2002	354	257	83	—	173
2003	377	275	81	—	142
2004	339	349	89	—	157
2005*	23	24	2	—	14
Totale Total	7127 7127	4182 4182	777 777	11 11	3258 3258

* solo Gennaio

* *only January*

Tabella 2 - Risultati delle analisi kariologiche.

Table 2 - Results of the karyological analyses.

Razze <i>Breeds</i>	Maschi <i>Males</i>				
	Normali <i>Normals</i>	Portatori di anomalie cromosomiche <i>Carriers of chromosome anomalies</i>		Portatori di chimerismo <i>Carriers of chimerism</i>	
	n°	n°	tipo <i>type</i>	n°	tipo <i>type</i>
Chianina <i>Chianina</i>	6959 6959	102 1 5 1 1	rob(1;29) rob(6;8)+fragm. 61,XXY rep(Y;9) rep(11;21)	52 5 1	60,XX/60,XY 60,XX/59t(1;29),XY 59t(1;29),XX/59t(1;29),XY
Totale <i>Total</i>	7127 7127				
Marchigiana <i>Marchigiana</i>	3677 3677	453 16 1 1	rob(1;29) rob(1;29)homoz. rob(14;17) rob(13;19)	33 1	60,XX/60,XY 60,XX/59t(1;29),XY
Totale <i>Total</i>	4182 4182				
Maremmiana <i>Maremmiana</i>	612	143 12	rob(1;29) rob(1;29)homoz.	9 1	60,XX/60,XY 60,XX/59t(1;29),XY
Totale <i>Total</i>	777 777				
Podolica Italiana <i>Italian Podolian</i>	10	1	rob(1;29)homoz.		
Totale <i>Total</i>	11 11				
Romagnola <i>Romagnola</i>	2826 2826	395 21	rob(1;29) rob(1;29)homoz.	14 1 1	60,XX/60,XY 60,XX/59t(1;29),XY 59t(1;29),XX/59t(1;29),XY
Totale <i>Total</i>	3258 3258				
Totale animali esaminati <i>Total animals examined</i>		15355 15355			

BIBLIOGRAFIA - REFERENCES

-De Giovanni A., Molteni L., Succi G., Galliani C., Boscher J., Popescu C. P., 1988. A new type of Robertsonian translocation in cattle. Atti 8th Europ. Colloq. Cytogenet. Domest. anim., July 19-22, Bristol, 53-58.

- De Giovanni Macchi A., Molteni L., Parma P., Laurelli A., 1993. Identification of a new Robertsonian translocation in the Marchigiana cattle breed. Atti 8th North American Colloquium on domestic animal cytogenetics and gene mapping, Guelph (Canada), July 13-16, 3.
- De Giovanni A., Molteni L., Laurelli A., 1994, Una nuova fusione centrica nella razza Marchigiana. Atti VII Congresso internazionale Razza Chianina - I Congresso Internazionale Razza Romagnola e Razza Marchigiana, Perugia 16-18 settembre, 212-216.
- De Groucy J., Roubin M., Passage E., 1964. Microtechnique pour l'étude des chromosomes humains à partir d'une culture de leucocytes sanguins. Ann. Génét., 7, 45.
- Di Meo G. P., Molteni L., Perucatti A., De Giovanni A., Incarnato D., Succi G., Schibler L., Cribeu E. P., Iannuzzi L., 2000. Chromosomal characterization of three centric fusion translocation in cattle using G-, R- and C-banding and FISH technique. Caryologia, 53, 3-4, 213-218.
- Ducos A., Berland H. M., Pinton A., Seguela A., Brun-Baronnat C., Darré A., Darré R., 2000. Contrôle chromosomique des populations animales d'élevage. INRA Prod. Anim., 13, 25-35.
- Forejt J., Gregorova S., Goetz P., 1981. XY pair associates with the synaptonemal complex of autosomal male sterile translocations in pachytene spermatocytes of the mouse (*Mus musculus*). Chromosoma, 82, 41-53.
- Gustavsson I., 1969. Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. Hereditas, 63, 68-169.
- Iannuzzi L., Molteni L., Di Meo G. P., De Giovanni A., Perucatti A., Succi G., Incarnato D., Eggen A., Cribeu E. P., 2001. A case of azoospermia in a bull carrying a Y-autosome reciprocal translocation. Cytogenetics and Cell Genetics, 95, 225-227.
- ISCNDB 2000, 2001. International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids. Di Bernardino D., Di Meo G.P., Gallagher D.S., Hayes H., Iannuzzi L. Cytogenet. Cell Genet., 92, 283-299.
- Molteni L., De Giovanni Macchi A., Parma P., Bouvet A., Popescu C. P., 1991. Analisi meiotica in un toro di razza Chianina portatore di traslocazione Robertsoniana 4;8. Taurus, 6, 84-93.
- Molteni L., De Giovanni Macchi A., Popescu C.P., 1995. A new case of XXY constitution in cattle. Atti 9th North American Colloquium on Domestic Animal Cytogenetics and Gene mapping, College Station, Texas (USA), July 17-20, 63.
- Molteni L., De Giovanni Macchi A., Zannotti M., 1996, Effetti della traslocazione t(1;29) sulla efficienza riproduttiva nelle bovine Marchigiane, Taurus, 5, 23-25.
- Molteni L., De Giovanni Macchi A., Grando P., Stacchezzini Simona, Fornari G., Cremonesi F., 1998. Fertilità dello sperma di tori portatori di differenti traslocazioni Robertsoniane. Taurus, 9, 81-88.
- Molteni L., De Giovanni Macchi A., Succi G., Cremonesi F., Stacchezzini S., Di Meo G. P., Iannuzzi L., 1998. A new centric fusion translocation in cattle: rob (13;19). Hereditas, 129, 177-180.
- Molteni L., De Giovanni Macchi A., Meggiolaro D., Sironi G., Enice F., Popescu C. P., 1999. New cases of XXY constitution in cattle. Animal Reprod. Sci., 55/2, 107-113.
- Nino-Soto M. I., King W. A., 2004. Genetic factors that affect normal reproduction and fertility in domestic cattle. 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada, July, 11-16.
- Rosenmann A., Wahrman J., Richter C., Voss R., Persitz A., Goldman B., 1985. Meiotic association between the XY chromosomes and unpaired autosomal elements as a cause of human male sterility. Cytogenet. Cell Genet., 39, 19-29.
- Succi G., Molteni L., De Giovanni A., 1979. Prime osservazioni sulla fecondità delle figlie di tori portatori della traslocazione 1/29. Atti Soc. It. Sci. Vet., 33, 215.
- Succi G., De Giovanni Macchi A., Molteni L., 1982. Preliminary observations on the influence of 25/27 translocation on fertility and milk production of grey Alpine cows. Atti 5th Europ. Colloq. Cytogenet. Domest. anim., June 7-11, Milano-Gargnano, 142-147.

ITALIAN BEEF CATTLE: CYTOGENETIC PROFILE

Molteni L. (1), De Giovanni A. (1), De Lorenzi L. (1), Di Meo G.P. (2), Iannuzzi L. (2), Succi G. (1)

ABSTRACT - We report the results of karyological analyses carried since January 1980 to January 2005 on 15355 males of Italian Beef Cattle with the aim to characterize in phenotypically normal subjects the eventual presence of chromosomal anomalies. Besides the 14084 karyologically normal subjects ($2n=60,XY$ and 108 carriers of cellular chimerism $2n=60,XX/60,XY$, we found the following anomalies: rob(1;29) (1153 carriers), rob(14;17) (1 carrier), rob(13;19) (1 carrier), rcp(Y;9) (1 carrier), rcp(11;21) (1 carrier) and trisomy $2n=61,XXY$ (5 carriers).

KEYWORDS: Cattle karyotype, Chromosome anomaly, Robertsonian translocation, Reciprocal translocation, Trisomy, Blood chimerism.

INTRODUCTION

In intensive cattle breeding, fertility is fundamental to the financial viability of the farm. Research in the zootechnical field has broadened the use of advanced breeding technology but the problem of hypofertility, still remains. This tends to be time-variable and depends not only on local conditions but also on the breed of the cattle. One of the main causes attributed to lowered fertility is the presence of balanced chromosome anomalies that, and this has already ascertained, are not connected with phenotype but that lead to an increase in irregular heat leading to the death of the embryo in the early phases of its development (Gustavsson, 1969; Succi *et al.*, 1979; Succi *et al.*, 1982; Molteni *et al.*, 1996; Ducos *et al.*, 2000; Soto & King, 2004).

MATERIALS AND METHODS

The cytogenetic investigation was conducted on male subjects of the Italian Beef Cattle breeds, listed in the National Herd Book. The subjects were destined for a breeding career, either by instrumental insemination or natural service (table 1), and for such purposes there is a convention between the Cytogenetic Laboratory of the Institute of General Zootechny - Faculty of Agriculture of the Milan University and the Italian Beef Cattle Breeders Association (A.N.A.B.I.C.).

The cytogenetic analyses were carried out using whole blood cultures, according to a slightly modified version of the method of De Grouchy *et al.* (1964). The RBA, RBG, CBG banding and in situ hybridization (FISH) were applied for individuals found to be carriers of not previously identified anomalies. Chromosomes were classified according to ISCNDB 2000 (2001). For several subjects it was possible to study the behaviour of the anomalies at meiosis and in the progeny. The in vitro fertilization technique was used to investigate the fertilizing capacity of the semen of bulls carrying structural chromosomal anomalies; anatomic/morphological and histological studies of the testicles were carried out for the azoospermic and/or oligospermic subjects.

RESULTS AND DISCUSSION

Besides the 14084 karyologically normal subjects ($2n=60,XY$), 108 carriers of cellular chimerism $2n=60,XX/60,XY$ and 1153 carriers of the well known and more frequent translocation rob(1;29), found in Chianina, Marchigiana, Maremmana, Podolica and Romagnola breeds, in both the heterozygote and homozygote states, the following anomalies were identified:

among the anomalies concerning the structure of the chromosomes:

-Robertsonian translocations or centric fusions:

rob(6;8) + fragment in Chianina breed (De Giovanni *et al.*, 1988, Di Meo *et al.*, 2000);

rob(14;17) in Marchigiana breed (De Giovanni *et al.*, 1993; De Giovanni *et al.*, 1994);

rob(13;19) in Marchigiana breed (Molteni *et al.*, 1998);

-reciprocal translocations:

rcp(Y;9) in Chianina breed (Iannuzzi *et al.*, 2001);

rcp(11;21) in Chianina breed (2004, study in progress).

-among the anomalies concerning the number of chromosomes:

trisomy XXY in Chianina breed (Molteni *et al.*, 1995; Molteni *et al.*, 1999).

Table 2 indicates the results obtained to date.

The chromosomal anomalies rob(6;8)+fragm., rob(14;17) and rob(13;19), identified as rob(1;29) in phenotypically normal subjects and observed also in the progeny, appeared de novo. The presence of a double centromere confirms their recent formation. Programmed crossbreeding among the carriers of the different chromosomal anomalies led to individual carriers of combinations of different translocations.

With regard to fertility capacity, the repeated in vitro fertilizations showed no significant statistical differences between the semen obtained from the carriers of the above cited centric fusions and that of the karyologically normal bulls (Molteni *et al.*, 1998; Molteni *et al.*, 2005, in press).

The study of the synaptonemal complexes (Molteni *et al.*, 1991) carried out on the spermatocytes obtained by testicle biopsy of the rob(6;8)+fragment carrier showed:

normal chromosome pairing in the trivalent (complete synapsis);

free homologues in position cis, favouring subsequent alternate segregation;

absence of association between sexual trivalent and bivalent, with a consequent normal spermatogenesis. Indeed, according to Forejt *et al.*, (1981) and Rosemann *et al.* (1985), in man and the mouse a possible association would lead to a reduction in the number of spermatozooids with consequent oligospermia in centric fusions carriers.

For what concerns the reciprocal translocation rcp(Y;9), this was identified in a young Chianina subject in which the metaphases had an abnormally long Y gonosome. The young male, born to karyologically normal parents and the brothers of bull already used for breeding purposes, appeared morphologically normal. The CBG and RBG banding revealed a reciprocal segment exchange between chromosome Y and one of the two autosomes of pair 9.

Hybridization in situ (FISH) allowed the accurate identification of the breaking points and the chromosomal regions implicated in the translocation that can be indicated as rcp(Y;9)(q12.3;q21.1).

Examination of the seminal fluid of the studied subject revealed the presence of an obvious azoospermia.

Five subjects of the Chianina breed were found to be carriers of trisomy XXY 2n=61,XXY (Klinefelter Syndrome). The clinical examination of the subjects resulted in the diagnosis of definite hypogonadism (testicle size averaged about 6 x 3 cm and weighed about 30 grams). The histological examination of the testicles revealed seminiferous tubules with clear signs of hyaline degeneration, delimited by Sertoli cells. The interstitial cells were hyperplastic and the ejaculate was azoospermic.

CONCLUSIONS

In the light of our findings for the Italian Beef Cattle we wish to draw attention to the considerable number of chromosomal anomalies encountered for the first time and the marked presence of rob(1;29), identified in our Laboratory by means of clinical cytogenetic techniques. Thus, it would seem opportune that cytogenetic profiles of all potential breeders be made routinely to avoid spreading possible chromosome anomalies throughout the population and to identify in young morphologically normal subjects those chromosomal pathologies that can reduce or annul fertility.

