



**FONDO EUROPEO AGRICOLO
PER LO SVILUPPO RURALE:**
l'Europa investe nelle zone rurali

TUTELA DELLA BIODIVERSITÀ NELLE RAZZE AVICOLE ITALIANE TuBAvI



Criobanca Italiana del Seme di Razze Avicole Autoctone

Standard Operative Procedure

Azione 8 – Raccolta di materiale biologico e germoplasma



**di
me
vst**



https://ec.europa.eu/agriculture/rural-development-2014-2020_it

mipaft

ministero delle politiche agricole
alimentari, forestali e del turismo

**MIPAAFT – Programma Sviluppo Rurale
Nazionale 2014/2020**

**Sottomisura 10.2 – Sostegno per la
conservazione, l'uso e lo sviluppo sostenibile
delle risorse genetiche in agricoltura.**

Criobanca Italiana del Seme di Razze Avicole Autoctone
Standard Operative Procedure (SOP)

1. Premessa.....	pag 1
2. Razze italiane di pollo e tacchino e priorità di conservazione.....	pag 2
3. Infrastrutture e siti di stoccaggio.....	pag 7
4. Scelta dei donatori di seme.....	pag 9
5. Gestione del materiale seminale.....	pag 11
5.1 Valutazione del seme.....	pag 11
5.2 Procedure di congelamento.....	pag 12
5.3 Inseminazione artificiale con seme crioconservato.....	pag 13
6. Tracciabilità delle dosi di seme.....	pag 14
7. Bibliografia.....	pag 15

1. PREMESSA

La stesura delle Standard Operative Procedures (SOP) per la creazione della Criobanca Italiana del Seme di Razze Avicole Autoctone è una delle attività (task 8.3) programmate in Azione 8, raccolta di materiale biologico e germoplasma, del progetto collettivo “Tutela della biodiversità nelle razze avicole italiane – TuBAvI” approvato dal MIPAAFT nell’ambito dell’avviso pubblico PSRN 2014-2020 sottomisura 10.2 Biodiversità, comparto avicoli, e svolto nel periodo 2018-2020.

Le specie considerate sono *Gallus gallus* e *Meleagris gallopavo*, corrispondenti a quelle di maggiore interesse zootecnico.

La creazione di una criobanca del seme di razze autoctone rappresenta una tra le più importanti azioni di conservazione *ex situ*, che diventa strategica quando le metodologie di conservazione *in situ* sono inefficaci, a causa della ridotta dimensione delle popolazioni, per mantenere la variabilità genetica ed evitare l'estinzione della razza. In particolare, la criobanca del seme ha le seguenti potenzialità:

1. Contribuire al mantenimento e alla moltiplicazione delle razze all'interno dei sistemi di produzione (conservazione *in situ*) rendendo disponibili dosi di seme provenienti da riproduttori di elevato valore genetico e di stato sanitario controllato.
2. Ricostituire razze in caso di estinzione o di drastica riduzione numerica della popolazione (razze reliquia).
3. Consentire il backup delle popolazioni conservate *in situ* in caso di problemi genetici (es. perdita diversità allelica, comparsa alleli indesiderati) e/o sanitari con lo scopo di aumentare la popolazione effettiva.
4. Riorientare la selezione di una popolazione.
5. Ricerca e sperimentazione.

Il presente documento è stato realizzato utilizzando come principale riferimento il volume “Animal Production and Health Guidelines No. 12 - Cryoconservation of Animal Genetic Resources” pubblicato dalla FAO nel 2012.

2. RAZZE ITALIANE DI POLLO E TACCHINO E PRIORITA' DI CONSERVAZIONE

Prima di procedere alla Creazione della Criobanca, appare di fondamentale importanza conoscere quale sia il patrimonio genetico avicolo attualmente presente in Italia e quali razze, tra quelle ancora oggi presenti, abbiano caratteristiche tali da giustificare la conservazione del loro materiale genetico in una Criobanca per il futuro utilizzo secondo la tecnica di conservazione *ex situ in vitro*.

Secondo la classificazione FAO (1998), lo stato di conservazione di una razza può essere diviso in 7 categorie di rischio descritte in sintesi in Tabella 1. La classificazione si basa sulla dimensione complessiva della popolazione, sul numero di femmine riproduttrici e sul trend della popolazione (in aumento, stabile o in diminuzione). Le caratteristiche delle diverse categorie sono descritte di seguito.

- Estinta: quando non esistono più le condizioni per ricostituire la razza.
- Critica: quando il numero di femmine riproduttrici è inferiore a 100, oppure quello dei maschi riproduttori è inferiore o uguale a 5, oppure la dimensione totale della popolazione è leggermente superiore a 100 in diminuzione e le femmine riproduttrici utilizzate in purezza sono meno dell'80%.
- Critica conservata: ha le stesse condizioni della categoria critica, ma la razza è parte di un programma di conservazione oppure è mantenuta da aziende avicole commerciali o Enti di ricerca.
- Minacciata: quando il numero di femmine riproduttrici è compreso fra 100 e 1000, oppure quello dei maschi riproduttori è compreso fra 5 e 20, oppure la dimensione totale della popolazione è leggermente inferiore a 100 in aumento e le femmine riproduttrici utilizzate in purezza sono meno dell'80%, oppure la dimensione totale della popolazione è leggermente inferiore a 1000 in diminuzione e le femmine riproduttrici sono meno dell'80%.
- Minacciata conservata: ha le stesse condizioni della categoria minacciata, ma la razza è parte di un programma di conservazione oppure è mantenuta da aziende avicole commerciali o Enti di ricerca.
- Non a rischio: quando il numero di femmine riproduttrici è maggiore di 1000, oppure quello dei maschi riproduttori è maggiore di 20, oppure la dimensione totale della popolazione è circa 1000 capi in aumento e le femmine riproduttrici sono prossime al 100%.

Il progetto TuBAvI ha sviluppato un programma di attività in grado di fornire strumenti utili all'identificazione della priorità di conservazione. In particolare, queste attività includono il censimento delle razze avicole italiane allevate (Azione 1), la caratterizzazione genetica con marcatori molecolari di tutte le razze italiane di pollo e tacchino (Azione 2), lo studio dello stato di variabilità genetica all'interno delle razze e di conservazione delle popolazioni (Azione 4, 5). Ulteriori criteri di priorità che possono essere considerati sono rappresentati dal particolare valore economico e/o culturale delle razze.

Tabella 1 – Categorie di rischio relative allo stato di conservazione di una razza.

Categoria di rischio	Femmine riproduttrici (n)	Maschi riproduttori (n)	Popolazione complessiva (n)	Programmi di conservazione
Estinta	-	-	-	-
Critica	< 100	≤5	~100	-
Critica conservata	< 100	≤5	~100	in atto
Minacciata	100 < n < 1000	5 < n ≤ 20	100 < n < 1000	-
Minacciata conservata	100 < n < 1000	5 < n ≤ 20	100 < n < 1000	in atto
Non a rischio	> 1000	> 20	> 1000	-
Sconosciuto	-	-	-	-

Da: FAO, 2003

Il censimento TuBAvI

Il censimento ha coinvolto tutti i proponenti associati allo scopo di svolgere l'indagine su tutto il territorio nazionale e conoscere la reale attuale consistenza delle popolazioni e le caratteristiche degli allevamenti di razze avicole autoctone, con particolare attenzione alle specie *Gallus gallus* e *Meleagris gallopavo*.

Il censimento ha rilevato la presenza sul territorio della netta maggioranza delle razze italiane di pollo e tacchino incluse nel Libro Genealogico e l'assenza di quattro razze di pollo (Collo nudo italiana, Millefiori piemontese, Pollo trentino, Tirolese) e di una razza di tacchino (Castano precoce). L'elenco delle razze censite è riportato in Tabella 2.

Tabella 2 – Razze italiane di pollo e tacchino censite sul territorio nazionale.

Pollo	Tacchino
Ancona	Brianzolo
Bianca di Saluzzo	Bronzato comune
Bionda Piemontese	Ermellinato di Rovigo
Ermellinata di Rovigo	Nero d'Italia
Livorno	Romagnolo
Mericanella della Brianza	Tacchino di PR & PC
Millefiori di Lonigo	
Modenese	
Mugellese	
Padovana	
Pepoi	
Polverara	
Robusta Lionata	
Robusta Maculata	
Romagnolo	
Siciliana	
Valdarnese bianca	
Valdarno	

Le aziende censite sono state 121, un numero veramente esiguo considerata l'ampiezza territoriale dell'indagine. La maggior parte (62%) delle aziende censite era di tipo agricolo, quindi l'allevamento era a scopo zootecnico, e una minoranza (38%) di tipo amatoriale. La dimensione delle popolazioni di razza è risultata molto ridotta e variabile in funzione della

razza. La maggioranza delle razze di pollo ($n=10$) presenta una popolazione totale inferiore a 500 capi e solo 4 razze (Bionda piemontese, Livorno, Padovana, Polverara) hanno una popolazione totale superiore a 1000 capi; inoltre, alcune popolazioni presentano una consistenza estremamente ridotta, corrispondente a poche decine di capi, come nel caso delle razze Modenese e Cornuta di Sicilia. Le popolazioni di tacchino hanno dimensioni ancora inferiori e solo le razze venete Bronzato comune e Ermellinato di Rovigo hanno una consistenza di circa 400 capi, tutte le altre razze hanno una consistenza variabile da 9 a 50 capi.

Oltre alla consistenza dei capi allevati, il censimento ha rilevato numerosi dati relativi alle seguenti condizioni: anagrafica degli allevatori, tipologia aziendale, strutture, attrezzature, gestione dell'allevamento, commercializzazione dei prodotti. Una scheda con la sintesi dei risultati del censimento TuBAvI è disponibile nel portale www.pollitaliani.it e i risultati completi sono stati pubblicati sulla rivista scientifica *Animals* nel 2021 (Castillo et al., 2021; Franzoni et al., 2021).

Il censimento ha messo in evidenza la grave mancanza di informazioni relative all'allevamento di razze avicole presso le associazioni locali di categoria (ARA, APA) e la difficoltà di colmare tale lacuna a causa della frammentazione degli allevamenti. Di conseguenza, il censimento TuBAvI rappresenta una prima fondamentale indagine che è opportuno proseguire ed ampliare per confermare la consistenza totale delle popolazioni di razza e per valutare la consistenza dei gruppi con diverso indirizzo produttivo.

Considerando le categorie di rischio indicate dalla FAO, la maggioranza delle razze italiane delle due specie avicole principali, pollo e tacchino, possono essere classificate nella categoria critica e un numero limitato nella categoria minacciata.

Stato di conservazione delle popolazioni

La caratterizzazione genetica delle razze italiane di pollo e tacchino, svolta in azione 2 del progetto collettivo, ha permesso la stima di indici di diversità genetica per ogni razza evidenziando variabilità fra di esse. Gli indici calcolati comprendono gli indici di eterozigosi attesa (H_E) e osservata (H_O), che permettono di analizzare la variabilità entro razza, e i coefficienti di consanguineità F_{HOM} e F_{ROH} . Tutte le razze considerate presentano indice H_O relativamente basso e il valore maggiore, pari a 0.339, è stato osservato nella razza di pollo Bianca di Saluzzo. F_{HOM} rappresenta il coefficiente di consanguineità calcolato sulla base di un eccesso di omozigosi e indica la frazione di individui di una popolazione con variante omozigote; più tende a 1 maggiore è l'omozigosi. F_{ROH} è un coefficiente di consanguineità stimato sulla presenza di regioni specifiche del genoma in continua omozigosi (ROH = Runs of Homozygosity); le loro dimensioni e la loro frequenza sono elevate nel caso di elevata consanguineità. I coefficienti di consanguineità calcolati nelle razze italiane di pollo e tacchino sono riportati in Tabella 3 e risultano ampiamente variabili fra razze; diverse razze in entrambe le specie presentano coefficienti di consanguineità elevati > 0.5 e solo 3 razze di pollo e 2 di tacchino presentano valori < 0.2 .

La parentela molecolare all'interno della stessa popolazione è stata calcolata con approcci diversi e i risultati hanno dimostrato un valore medio di parentela variabile da un minimo di 0,47 calcolato nella razza Bionda piemontese, a un valore massimo di 0,81 nella razza Livorno.

Tabella 3 – Coefficienti di consanguineità F_{HOM} e F_{ROH} calcolati in razze italiane di pollo e tacchino.

Specie	Razza	F_{HOM}		F_{ROH}	
		Media	DS	Media	DS
<i>Gallus gallus</i>	<i>Siciliana</i>	0.648	0.034	0.607	0.037
<i>Gallus gallus</i>	<i>Padovana Argenta</i>	0.588	0.098	0.509	0.118
<i>Gallus gallus</i>	<i>Pepoi</i>	0.579	0.039	0.482	0.096
<i>Gallus gallus</i>	<i>Robusta Maculata</i>	0.572	0.032	0.410	0.113
<i>Gallus gallus</i>	<i>Padovana Camosciata</i>	0.538	0.095	0.410	0.109
<i>Gallus gallus</i>	<i>Robusta Lionata</i>	0.508	0.039	0.353	0.109
<i>Gallus gallus</i>	<i>Ermellinata di Rovigo</i>	0.459	0.044	0.305	0.082
<i>Gallus gallus</i>	<i>Polverara Nera</i>	0.454	0.062	0.353	0.087
<i>Gallus gallus</i>	<i>Livorno Bianca</i>	0.465	0.061	0.427	0.059
<i>Gallus gallus</i>	<i>Polverara Bianca</i>	0.411	0.052	0.310	0.068
<i>Gallus gallus</i>	<i>Padovana Dorata</i>	0.404	0.081	0.230	0.070
<i>Gallus gallus</i>	<i>Mericanel della Brianza</i>	0.368	0.127	0.326	0.135
<i>Gallus gallus</i>	<i>Livorno Nera</i>	0.365	0.062	0.296	0.063
<i>Gallus gallus</i>	<i>Ancona</i>	0.284	0.100	0.201	0.099
<i>Gallus gallus</i>	<i>Mugellese</i>	0.236	0.115	0.225	0.112
<i>Gallus gallus</i>	<i>Millefiori di Lonigo</i>	0.202	0.080	0.166	0.073
<i>Gallus gallus</i>	<i>Valdarnese</i>	0.127	0.098	0.121	0.095
<i>Gallus gallus</i>	<i>Bionda Piemontese</i>	0.116	0.025	0.081	0.024
<i>Gallus gallus</i>	<i>Bianca di Saluzzo</i>	0.076	0.059	0.081	0.057
<i>Meleagris gallopavo</i>	Brianzolo	0.283	0.121	0.309	0.091
<i>Meleagris gallopavo</i>	Bronzato comune	0.399	0.076	0.220	0.035
<i>Meleagris gallopavo</i>	Colli Euganei	0.450	0.224	0.355	0.153
<i>Meleagris gallopavo</i>	Ermellino di RO	0.729	0.034	0.401	0.030
<i>Meleagris gallopavo</i>	Nero di Italia	0.142	0.228	0.193	0.146
<i>Meleagris gallopavo</i>	Tacchino di PR&PC	0.059	0.128	0.121	0.061
<i>Meleagris gallopavo</i>	Romagnolo	0.249	0.114	0.133	0.063

Una valutazione del rischio di estinzione, legato principalmente alla depressione da consanguineità, è stata fatta considerando i seguenti indici di variabilità genetica: He stima della variabilità globale, Na numero di alleli, Ne ricchezza allelica, Ho consanguineità, numero di alleli con frequenza < 5% come stima del rischio di riduzione di variabilità globale. La combinazione dei diversi indici ha permesso di definire un indice di rischio di estinzione (IRC) rappresentato in Figura 1. Le popolazioni più a rischio sono risultate la Livorno bianca, la Robusta maculata e l'Ermellinata di Rovigo, mentre quelle a minor rischio le due razze piemontesi, Bionda e Bianca, e la Millefiori di Lonigo.

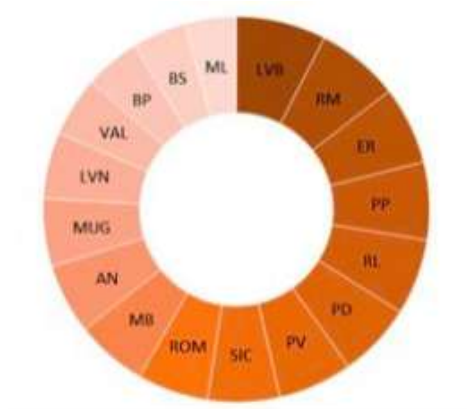


Figura 1 – Indice di rischio di estinzione calcolato nelle razze italiane di pollo. L'intensità del colore è proporzionale al rischio di estinzione.

Legenda delle razze: LVB Livorno bianca, RM Robusta maculata, ER Ermellinata di Rovigo, PP Pepoi, RL Robusta lionata, PD Padovana, PV Polverara, SIC Siciliana, ROM Romagnola, MB Mericanel della brianza, AN Ancona, MUG Mugellese, LVN Livorno nera, VAL Valdarnese bianca, BP Bionda piemontese, BS Bianca di Saluzzo, ML Millefiori di Lonigo

Una sintesi dei risultati relativi allo studio dello stato di variabilità genetica e di conservazione delle razze italiane di pollo e tacchino è disponibile nel portale www.pollitaliani.it; i risultati completi sono stati pubblicati in riviste scientifiche nel 2020 (Cendron et al., 2020) e 2021 (Soglia et al., 2021).

In conclusione, tutte le razze italiane di pollo e tacchino possono essere classificate a rischio e sono considerate per la conservazione *ex situ in vitro* di germoplasma. Lo stoccaggio delle dosi di seme nella Criobanca è stato programmato nel periodo 2020-2023 in previsione dello svolgimento di una seconda fase del progetto TuBAvI.

3. INFRASTRUTTURE E SITI DI STOCCAGGIO

Le principali attività previste nella gestione di una criobanca del seme sono la raccolta, la lavorazione e il congelamento del seme, e la conservazione delle dosi. L'infrastruttura necessaria è quindi composta da tutte le sedi idonee a svolgere queste attività che non necessariamente devono essere tutte presenti nello stesso luogo fisico.

La raccolta del seme - La presenza di una struttura per il mantenimento dei maschi donatori di seme è fortemente auspicabile per una corretta gestione dei riproduttori finalizzata alla raccolta del seme nelle condizioni idonee a garantire la migliore qualità possibile dei campioni. Tutti i volatili necessitano di un periodo di addestramento al prelievo, che può essere più o meno prolungato in funzione della specie, della razza e dell'individuo, prima di fornire una produzione quanti-qualitativa di materiale seminale stabile che permetta una corretta valutazione del donatore. Di conseguenza, la selezione dei maschi donatori in funzione della qualità dell'eiaculato può essere fatta solo al termine del periodo di addestramento. Inoltre, una volta individuati i donatori, nella maggior parte dei casi sarà necessario ripetere il prelievo di seme in diverse giornate per preparare e conservare il numero richiesto di dosi per soggetto. In assenza di una struttura dedicata, il materiale seminale potrebbe essere raccolto direttamente in campo (allevamenti privati), ma sempre adottando una gestione mirata dei maschi idonea a garantire la qualità del materiale seminale.

Il Centro Zootecnico Didattico Sperimentale (CZDS), presso il PA UniMI (Polo Universitario Veterinario, Lodi) è identificato come struttura idonea al mantenimento dei maschi donatori di seme. In particolare, il CZDS dispone del Reparto Zooculture (RZ) dedicato all'allevamento avicolo dove sono presenti diversi locali attrezzati per l'allevamento dei maschi adulti in gabbia singola e in parchetti a terra in funzione della specie. Tutti i locali sono dotati di ambiente controllato per garantire condizioni di benessere secondo linee guida standard di allevamento avicolo. Inoltre, il RZ applica elevati standard di biosicurezza che garantiscono il controllo igienico-sanitario degli individui.

La lavorazione e il congelamento del seme – Questa attività prevede la disponibilità di un laboratorio attrezzato per la valutazione della qualità del seme e le successive fasi di lavorazione e congelamento del materiale seminale (vedi capitolo 5).

I PA UniMI e UniMOL dispongono di laboratori da tempo impegnati in attività di ricerca inerente la crioconservazione del seme nelle specie *Gallus gallus* e *Meleagris gallopavo*, quindi adeguati a garantire l'attività richiesta. I laboratori universitari presentano tutte le caratteristiche richieste per i locali adibiti al congelamento del seme: superfici di lavoro adeguate e disinfettabili, illuminazione e ventilazione adeguata, ricircolo di acqua calda e fredda, disponibilità di acqua purificata, numero sufficiente di spine elettriche protette dall'acqua per tutta la strumentazione presente, adeguati punti di conservazione per materiali di consumo. Inoltre, le due Sedi sono attrezzate con le seguenti strumentazioni: fotometro, microscopio a contrasto di fase con videocamera e software dedicato (SCA, Microptic, Spain) per analisi della motilità cellulare, microscopio a fluorescenza, citofluorimetro, spettrofotometro, centrifuga, misuratore di pH, osmometro, bagno termostato, frigo-congelatore, bidoni criogenici.

I laboratori di Zoocolture UniMI e UniMOL sono identificati come sedi idonee alla preparazione delle dosi di seme della Criobanca.

La conservazione delle dosi - In accordo con le linee guida FAO (2012), è necessario allestire almeno due siti di stoccaggio delle dosi di seme presso centri specializzati al fine di ridurre il rischio di perdita delle dosi stoccate. Nella fase di avvio della Criobanca, le dosi di seme saranno conservate presso i PA UniMI e UniMOL. Tuttavia, si prevede di verificare la possibilità di condividere l'attività di conservazione delle dosi anche con centri per il miglioramento genetico, anche di altre specie animali, allo scopo di ridurre i costi sul medio e lungo termine.

4. SCELTA DEI DONATORI DI SEME

In seguito alla scelta delle razze, è indispensabile individuare i donatori migliori dai quali prelevare il seme per la produzione delle dosi da sottoporre al processo di crioconservazione.

I criteri fondamentali da considerare nella creazione di una criobanca sono l'acquisizione di una quantità di germoplasma idonea a ricostituire la popolazione target e la conservazione di campioni in grado di rappresentare la diversità genetica della popolazione.

La valutazione dei **soggetti donatori** è auspicabile che sia di tipo sia morfologico sia genetico. I soggetti devono essere sottoposti a caratterizzazione morfologica e corrispondere allo standard di razza, come riportato nel Libro Genealogico delle Razze Avicole (RAA) (<https://www.anci-aia.it/il-libro-genealogico-delle-razze-avicole-autoctone/>). I soggetti donatori è opportuno che abbiano il più basso grado di parentela possibile e questa situazione può essere valutata con diversi metodi in funzione delle informazioni disponibili: se il pedigree è disponibile sarà sufficiente selezionare i maschi che non hanno progenitori comuni, al contrario, se il pedigree non è disponibile, è opportuno valutare la parentela genetica dei potenziali donatori utilizzando tecniche di genetica molecolari. La seconda opzione offre anche il vantaggio di poter valutare la variabilità genetica dell'individuo e quindi selezionare i donatori che meglio contribuiscono al mantenimento della massima variabilità genetica nella popolazione. Infine, i soggetti donatori saranno selezionati anche in funzione della produzione di materiale seminale e della qualità dell'eiaculato.

Secondo le linee guida della FAO (2012) per la creazione di una criobanca del seme, è raccomandabile: a) utilizzare un minimo di 25 donatori per ogni razza scelta (laddove è possibile reperire i soggetti); b) conservare almeno 40 dosi di seme di un singolo donatore per ricreare, in sei generazioni, una razza fortemente a rischio di estinzione (Figura 2). Ai fini della gestione di popolazioni a numero limitato per il controllo dell'inbreeding, si raccomanda di individuare da 3 a 10 donatori di seme ogni anno e di stoccare almeno 20 dosi/donatore, considerando eventuali variazioni del numero di dosi in funzione della capacità riproduttiva della razza (FAO, 2012).

Considerando le dimensioni decisamente esigue delle popolazioni di razza italiana di pollo e tacchino, si prevede una prima fase di implementazione della Criobanca con l'obiettivo di produrre dosi di seme nel maggior numero possibile di razze italiane, selezionando 3-10 donatori per razza e stoccando un numero totale di circa 400 dosi per razza. A questa fase iniziale, farà seguito una seconda fase di ampliamento del numero di dosi conservate per razza.

Il controllo sanitario dei donatori è di fondamentale importanza per evitare di trasmettere patologie attraverso le dosi di seme crioconservato alle future generazioni. I maschi donatori devono ricevere un programma vaccinale per la prevenzione delle malattie più diffuse e ad alta mortalità: malattia di Marek nel pollo, malattia di Newcastle nel pollo e nel tacchino. Inoltre, test sanitari devono essere svolti individualmente per garantire l'assenza delle seguenti patologie:

- ✓ influenza aviaria
- ✓ pullorosi/tifosi aviaria (*Salmonella enterica*, sierotipi *pullorum* e *gallinarum*)
- ✓ salmonellosi

✓ micoplasmosi (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*)

I riproduttori individuati come potenziali donatori di seme devono essere isolati all'interno delle strutture di allevamento (centri di conservazione, aziende agricole) per un periodo di quarantena necessario alla verifica dello stato sanitario e solo i capi esenti da patologie possono essere trasferiti nella zona di allevamento destinata alla produzione di seme.



Figura 2 – Raccomandazioni FAO per la creazione della criobanca (n° soggetti e dosi).

5. GESTIONE DEL MATERIALE SEMINALE

5.1 Valutazione del seme

Il materiale seminale proveniente da ogni donatore, prima di essere avviato alla procedura di crioconservazione, è sottoposto ad una valutazione quanti-qualitativa, la quale permette di identificare e selezionare i campioni idonei al processo di congelamento. I parametri di valutazione dell'eiaculato sono distinti in macroscopici e microscopici (Tabella 4).

Tabella 4 – Parametri utilizzati per la valutazione qualitativa del materiale seminale

Macroscopici	Microscopici
Volume	Concentrazione
Colore	Motilità
Densità	Integrità membrana cellulare
Presenza feci, urine, sangue	Resistenza osmotica

Tutti i parametri macroscopici sono valutati subito dopo il prelievo e solo gli eiaculati ritenuti idonei sono trasferiti al laboratorio per la valutazione dei parametri microscopici. Gli eiaculati idonei sono quelli che presentano un volume adeguato alle caratteristiche della specie (vedi Tabella 5), colore bianco perlato, elevata densità e assenza di contaminazione da altre componenti biologiche.

I parametri microscopici sono valutati con metodiche indicate in sintesi di seguito.

La concentrazione è valutata ($\times 10^9/\text{mL}$) con metodo emocitometrico oppure spettrofotometrico in funzione delle attrezzature disponibili in laboratorio.

La motilità spermatica è valutata con metodo CASA utilizzando il software Sperm Class Analyzer (SCA) (version 4.0, Microptic S.L., Barcelona, Spain). I parametri cinetici calcolati sono i seguenti: motilità totale (%), motilità progressiva (%), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), straight-line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude of lateral head displacement (ALH, μm), beat cross frequency (BCF, Hz), linearity of the curvilinear path ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$, %), straightness of the average path ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAL} \times 100$, %), wobble of the actual path about the average path ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL} \times 100$, %).

L'integrità della membrana cellulare è valutata (%) con doppia colorazione fluorescente SYBR14/ioduro di propidio e conta al microscopio in fluorescenza oppure al citofluorimetro.

La resistenza osmotica della membrana cellulare è valutata (%) come l'integrità di membrane, ma dopo incubazione del campione in soluzione iposmotica (0,9% NaCl) per pochi minuti.

Il seme di tacchino e di gallo è considerato idoneo al congelamento se i parametri qualitativi rispettano i requisiti minimi riportati in Tabella 5.

La qualità del seme è valutata prima e dopo congelamento/scongelamento per ogni donatore della criobanca e si prevede di valutare almeno 4 repliche per donatore.

Tabella 5 – Requisiti qualitativi minimi del seme di gallo e tacchino per essere ritenuto idoneo al processo di crioconservazione.

Parametri qualitativi	Valore minimo	
	Gallo	Tacchino
Volume μL	100	100
Concentrazione $\times 10^9/\text{mL}$	2	4
Motilità totale %	65	65
Motilità progressiva %	15	15
Vitalità spermatica %	70	70
Resistenza osmotica %	55	55

5.2 Procedura di congelamento

Il protocollo di riferimento per il congelamento e scongelamento degli eiaculati di pollo e tacchino sono stati identificati in seguito ai risultati ottenuti in diversi protocolli sperimentali svolti con l'obiettivo di studiare l'effetto di alcuni fattori: tipo di diluente e di crioprotettore (Mosca et al. 2016a, 2016b, 2019; Zaniboni et al., 2021; Iaffaldano et al. 2016a; Di Iorio et al. 2020) durata delle fasi di equilibrio, gradiente termico di congelamento (Madeddu et al., 2018; Iaffaldano et al. 2016b) e scongelamento (Mosca et al., 2020).

Le procedure di crioconservazione identificate per il seme di gallo e tacchino sono descritte in sintesi rispettivamente in Tabella 6 e 7, mentre in Figura 3 sono illustrate le diverse fasi di lavorazione.

Gallo	
1)	Diluizione del seme a $1,5 \times 10^9$ sperm in Lake pre-freezing con 0.1M Trealosio (LP)
2)	Equilibrio a 5°C per 20-30 min
3)	Ulteriore diluizione a 1.0×10^9 sperm in LP con NMA 2%
4)	Equilibrio di 1 min a 4°C
5)	Confezionamento in paillettes (0,25 mL) con 250×10^6 sperm/paillette
6)	Congelamento in vapori di azoto a una distanza di 3 cm per 10 min
7)	Trasferimento e stoccaggio in bidone criogenico
8)	Scongellamento in bagno termostato a 5°C per 100 sec.

Tabella 6 – Procedura di crioconservazione per il seme di gallo.

Tacchino	
1)	Diluizione del seme a 6×10^9 sperm in Lake o Tselutin pre-freezing (LP)
2)	Equilibrio a 4°C per 25 min
3)	Ulteriore diluizione a 3×10^9 sperm in LP + DMSO 20% + Ficoll 1 mM
4)	Confezionamento in paillettes (0,25 mL) con 750×10^6 sperm/paillette
5)	Equilibrio a 4°C per 20 min
6)	Congelamento in vapori di azoto a una distanza di 10 cm per 10 min
7)	Trasferimento e stoccaggio in bidone criogenico
8)	Scongellamento in bagno termostato a 50°C per 10 sec

Tabella 7 – Procedura di crioconservazione per il seme di tacchino.

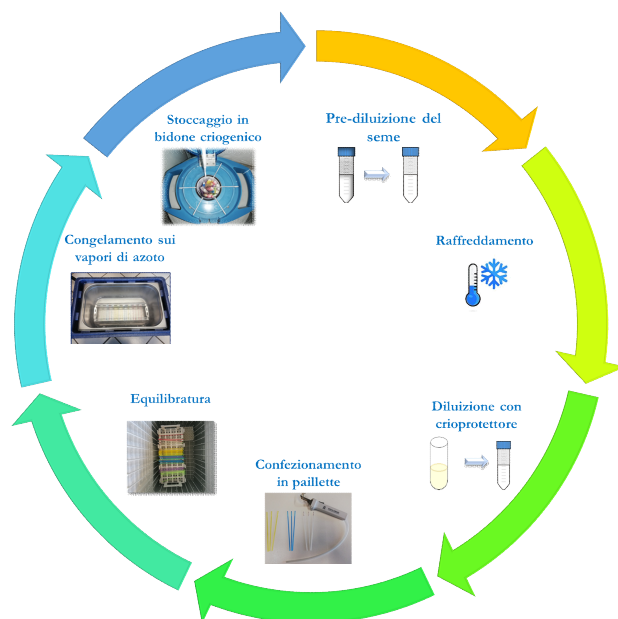


Figura 3 – Rappresentazione schematica delle operazioni per il congelamento del seme di gallo e tacchino.

5.3 Protocollo di inseminazione artificiale con seme crioconservato

I protocolli di inseminazione artificiale sono stati studiati utilizzando diverse concentrazioni di spermatozoi congelati/scongelati per singola dose di inseminazione in galline (Cerolini et al., 2019) e tacchine (Di Iorio et al., 2020b) di tipo genetico commerciale, per poter avere disponibilità di un numero elevato di capi. I risultati sono indicati separatamente per specie.

Specie *Gallus gallus* – La dose di inseminazione efficace per ottenere la fertilità massima è 250×10^6 sperm, corrispondente a una paillette. Questa dose permette di ottenere uova fertili per 3 giorni consecutivi (giorni 2-4) dopo una singola inseminazione (giorno 0); per mantenere la fertilità massima è necessaria 1 inseminazione ogni 3 giorni. Dosi di inseminazione superiori (fino a 750×10^6) non aumentano la percentuale di fertilità, ma allungano il periodo fertile a 9 giorni (giorni 2-10).

Specie *Meleagris gallopavo* - La dose di inseminazione efficace per ottenere la fertilità massima è 400×10^6 sperm, corrispondente a 135 μL di seme scongelato. Inseminazioni successive svolte con una frequenza regolare di 3 giorni permettono di mantenere la fertilità massima costante.

6. TRACCIABILITÀ DELLE DOSI DI SEME

Per una corretta costituzione e successiva gestione della criobanca delle dosi di seme è fondamentale assicurare la tracciabilità di queste. A tal riguardo ogni dose di seme, impacchettata in *paillettes* deve riportare un codice alfa-numerico che racchiuda le seguenti informazioni:

- Specie, razza
- Soggetto donatore (es. matricola)

Parallelamente all'identificazione delle differenti *paillettes* tramite la codificazione alfa-numerica è necessario altresì creare un database nel quale vengano immagazzinate le seguenti informazioni:

- Data di congelamento
- Protocollo di congelamento
- Codici alfa-numerici delle *paillettes*
- Numero di *paillettes* congelate
- Posizione nel contenitore criogenico

Tale database deve essere accessibile a tutti gli operatori della criobanca. Questa banca dati può essere controllata tramite specifici software informatici che permettono di creare file con tabelle e schemi immediati per la consultazione e organizzazione dei dati stessi.

7. BIBLIOGRAFIA

- Castillo A, Gariglio M, Franzoni A, Soglia D, Sartore S, Buccioni A, Mannelli F, Cassandro M, Cendron F, Castellini C, Mancinelli Cartoni A, Iaffaldano N, Di Iorio M, Marzoni M, Salvucci S, Cerolini S, Zaniboni L, Schiavone A. 2021. Overview of native chicken breeds in Italy: conservation status and rearing systems in use. *Animals*, 11: 490.
- Cendron F, Perini F, Mastrangelo S, Tolone M, Criscione A, Bordonaro S, Iaffaldano N, Castellini C, Marzoni M, Buccioni A, Soglia D, Schiavone A, Cerolini S, Lasagna E, Cassandro M. 2020. Genome-wide SNP analysis reveals the population structure and the conservation status of 23 Italian chicken breeds. *Animals*, 10: 1441.
- Cerolini S, Abdel Sayed A, Mosca F, Iaffaldano N, Zaniboni L. 2019. Artificial insemination of cryopreserved chicken semen: do different concentration doses affect fertility? IFRG-WG6 2019 Meeting, Tours (FR), 28-30 August. Poster presentation.
- Di Iorio M, Rusco G, Iampietro R, Colonna MA, Zaniboni L, Cerolini S, Iaffaldano N. 2020a. Finding an Effective Freezing Protocol for Turkey Semen: Benefits of Ficoll as Non-Permeant Cryoprotectant and 1:4 as Dilution Rate. *Animals*. 10:42.
- Di Iorio M, Rusco G, Iampietro, Maiuro L, Schiavone, Cerolini S, Iaffaldano N. 2020b. Validation of the Turkey semen cryopreservation by evaluating the effect of two diluents and the inseminating doses. *Animals*. 10:8-1329.
- FAO. 1998. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans – management of small populations at risk. FAO Animal Production and Health Division. Rome.
- FAO. 2003. Community-based management of animal genetic resources. Proceedings of the workshop held in Mbabane, Swaziland 7-11 May 2001. Rome. [accessed on 19 November 2020]. www.fao.org/DOCREP/006/Y3970E/Y3970E00.htm.
- FAO. 2012. Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12. Rome.
- Franzoni A, Gariglio M, Castillo A, Soglia D, Sartore S, Buccioni A, Mannelli F, Cassandro M, Cendron F, Castellini C, Mancinelli Cartoni A, Cerolini S, Sayed AA, Iaffaldano N, Di Iorio M, Marzoni M, Salvucci S, Schiavone A. 2021. Overview of Native Chicken Breeds in Italy: Small Scale Production and Marketing. *Animals*, 11: 629.
- Iaffaldano N, Di Iorio M, Cerolini S, Manchisi A, 2016a. Overview of turkey semen storage: Focus on Cryopreservation A review. *Ann Anim Sci*. 16:961–974.
- Iaffaldano N, Di Iorio M, Miranda M, Zaniboni L, Manchisi A, Cerolini S. 2016b. Cryopreserving turkey semen in straws and nitrogen vapour using DMSO or DMA: Effects of cryoprotectant concentration, freezing rate and thawing rate on post-thaw semen quality. *Br Poult Sci*. 57:264–270.
- Madeddu M, Mosca F, Sayed AA, Zaniboni L, Mangiagalli MG, Colombo E, Cerolini S. 2016. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: Comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. *Anim Reprod Sci*. 171:58–64.
- Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. 2016a. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* 73:343–347.

- Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. 2016b. Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm. *Data Brief*. 9:1118–1121.
- Mosca F, Zaniboni L, Sayed AA, Iaffaldano N, Soglia D, Schiavone A, Cerolini S. 2020. Effect of N-Methylacetamide concentration and thawing rate on chicken sperm quality after cryopreservation. *Animals*. 10(5): 824.
- Mosca F, Zaniboni L, Sayed AA, Madeddu M, Iaffaldano N, Cerolini S. 2019. Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed chicken semen. *J Poult Sci*. 98:6071–6077.
- Soglia D, Sartore S, Lasagna E, Castellini C, Cendron F, Cassandro M, Marzoni M, Iaffaldano I, Buccioni A, Dabbou S, Castillo A, Maione S, Bianchi S, Profiti M, Sacchi P, Cerolini S, Schiavone S. 2021. Italian poultry biodiversity of 17 Autochthonous Chicken Breeds and their extinction risk status. *Frontiers in Genetics*, 12: article 715656.
- Zaniboni L, Madeddu M, Mosca M, Abdel Sayed Ahmad, Marelli SP, Di Iorio M, Iaffaldano N, Cerolini S. 2021. Concentration dependent effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of cryopreserved chicken semen. *Cryobiology*, submitted for publication.