

Programma di Sviluppo Rurale Nazionale 2014-2022
Sottomisura 10.2 – Biodiversità

Progetto TuBAVI-2 (2021-2024)

RELAZIONE DELLE ATTIVITA' SVOLTE NEL SECONDO ANNO

UniMI

La presente relazione descrive le attività svolte dal 01.05.2022 al 30.04.2023. L'attività è descritta per azione, in base al programma iniziale.

Azione 1 – Caratterizzazione fenotipica delle razze e delle specie autoctone

Task 1.1 – Caratterizzazione fenotipica di polli di razza MB

Le attività di allevamento a ciclo chiuso della popolazione nucleo di razza Mericanel della Brianza (MB) sono proseguite presso il Centro Avicolo UniMI (Lodi) per tutto il secondo anno di progetto.

I pulcini schiusi nel periodo marzo-aprile 2022 (n=138) sono stati allevati per la selezione dei capi di rimonta interna. I pulcini sono stati marcati e pesati individualmente alla schiusa e sono stati allevati a terra su lettiera permanente in ambiente chiuso controllato per tutto il periodo di crescita. La curva di crescita, registrata da 1 a 225 giorni di vita, è riportata per sesso in Figura 1.1. Un campione biologico (penne) è stato prelevato dai maschi (n=61) per la caratterizzazione genetica finalizzata alla valutazione di un piano di accoppiamenti (servizio esterno Università di Torino). I riproduttori di rimonta sono stati selezionati nel mese di ottobre in base alla parentela, a indici genetici (indice di variabilità individuale, indice di parentela molecolare familiare) e alla numerosità dei capi disponibili per linea familiare. I capi selezionati sono stati organizzati in 4 gruppi familiari (A, BC, DEF, G), con la perdita di 3 linee familiari rispetto all'anno precedente, costituiti ognuno da 1 gallo e 10-12 galline. Ogni famiglia è stata allevata in recinto a terra su lettiera permanente in ambiente chiuso e controllato. La maturità sessuale è avvenuta all'età di 24-26 settimane (settembre-ottobre 2022).

Nel mese di novembre è stata accasata presso il Centro Avicolo una nuova popolazione di capi adulti MB (n=40, 20 galli + 20 galline) per l'individuazione di nuove linee familiari. La popolazione è stata mantenuta in quarantena, per lo svolgimento di controlli sanitari, e valutata in base a caratteri morfologici. I capi idonei alla caratterizzazione genetica (n=26) sono stati campionati nel mese di dicembre. Il report di valutazione genetica (prodotto dal laboratorio UniTO) ha individuato 2 nuove linee familiari (5, 6) e valutato il piano di accoppiamenti, includendo anche i maschi del nucleo di rimonta interna.

Le caratteristiche di tutte le linee familiari in riproduzione da febbraio a maggio è riportato in Tabella 1.1. Il numero e il peso delle uova deposte sono stati registrati giornalmente da settembre 2022 a maggio 2023. La curva di ovodeposizione settimanale (%) è presentata in Figura 1.2. Il peso medio dell'uovo calcolato su tutto il periodo di ovodeposizione è risultato 38,5 g (DS=3,64), con una variazione da 31,4 g a 34,5 da ottobre 2022 a maggio 2023.

Al momento, si sono svolte due incubazioni per la schiusa della progenie destinata alla rimonta interna. I valori generali di fertilità e schiusa sono presentati in Tabella 1.2. La fertilità e la schiudibilità (% uova fertili) delle uova da cova è stata ampiamente influenzata dalla linea familiare (Tabella 1.3).

Task 1.2 Caratterizzazione fenotipica di polli di razza MO

Le uova di galline Modenesi reperite presso un allevatore amatoriale sono state incubate presso l'azienda Pollaio Ornamentale della Brianza (LC). I pulcini schiusi (n=10) sono stati trasferiti presso il Centro Avicolo a 30 giorni di vita e sottoposti a quarantena per la verifica dello stato sanitario.

Il peso vivo è stato registrato in 8 soggetti, 2 galline e 6 galli, e la curva di crescita è riportata in Figura 1.3. A gennaio è stato possibile formare una unica coppia in riproduzione e, di conseguenza, i dati riproduttivi registrati

non si ritengono rappresentativi della razza. Il reperimento di altre galline adulte si rende necessario per poter avere più gruppi familiari e svolgere una caratterizzazione fenotipica attendibile.

Task 1.3 Caratterizzazione fenotipica di tacchini di razza NI e BR

Razza Brianzolo – Tacchini di razza Brianzolo (BR) sono stati accasati presso il Centro Avicolo a luglio 2022. In totale, sono stati introdotti 10 tacchini di 11 settimane di vita sottoposti a quarantena per la verifica dello stato sanitario. Sei capi, 3 maschi e 3 femmine, sono stati mantenuti in allevamento per lo svolgimento della fase di riproduzione; i capi sono stati organizzati in 3 coppie allevate in recinti a terra su lettiera permanente in ambiente chiuso e controllato. Il peso vivo è stato registrato a 14, 30 e 47 settimane di vita; i valori medi sono presentati per sesso in Tabella 1.4. La maturità sessuale delle tacchine è stata registrata a 27 settimane di vita e la curva di ovodeposizione registrata nel periodo ottobre 2022-maggio 2023 è presentata in Figura 1.4. Il peso medio delle uova deposte corrisponde a 69 g (DS=5,9 g), con un progressivo aumento da 64 a 76 g nelle uova deposte da novembre a maggio. Alcune incubazioni sono state programmate nel periodo maggio-giugno per la schiusa di progenie di rimonta.

Razza Nero di Italia – Il reperimento di tacchini di razza Nero di Italia è proseguito durante tutto il secondo anno di attività e si prevede di accasare capi in crescita nel prossimo mese di luglio.

Task 1.4 Caratterizzazione fenotipica del materiale seminale in razze di pollo e tacchino

Nel secondo anno di attività si sono svolte le attività di laboratorio relative all'analisi del profilo proteico e lipidico dei campioni di spermatozoi e plasma seminale stoccati nell'anno precedente delle razze MB, Bionda piemontese (BP), Bianca di Saluzzo (BS), Pepoi (Pe) e Robusta maculata (RM). Inoltre, la produzione quantitativa di materiale seminale è stata valutata nelle razze di pollo Ermellinata di Rovigo (ER) e Robusta lionata (RL).

Analisi proteomica - Il profilo proteomico di spermatozoi e plasma seminale è stato valutato mediante approccio proteomico shotgun con quantificazione label-free. A tale scopo, le proteine contenute in ogni campione sono state estratte, ridotte, alchilate e digerite con tripsina. La miscela triptica ottenuta, è stata sottoposta ad analisi LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (Orbitrap Fusion Tribrid, Thermo Fisher Scientific). I raw file acquisiti sono stati analizzati con il software MaxQuant (versione 1.6.1.0) per l'identificazione e quantificazione delle proteine di ogni singolo dataset.

La buona riproducibilità del metodo di estrazione proteica, l'efficacia dell'intero work flow proteomico, così come la bassa variabilità dei campioni all'interno dello stesso gruppo di animali, sono stati valutati sulla base (I) del numero di proteine identificate, (II) della percentuale di MS/MS effettuate, (III) della somma dei valori di intensità del segnale LFQ (Label Free Quantification) e (IV) dei valori del coefficiente di correlazione di Pearson tra i diversi dataset.

Questa analisi preliminare ha permesso di scegliere i dataset (n=4 per ogni razza) da sottoporre all'analisi differenziale (Tabella 1.5, Tabella 1.6), atta ad identificare le proteine comuni ed esclusivamente presenti nelle diverse razze (Figura 1.5, Figura 1.6). Tali proteine saranno oggetto di una futura analisi bioinformatica funzionale.

Analisi lipidica – I lipidi totali sono stati estratti dal campione secondo il metodo di Folch. I lipidi totali sono stati separati nelle classi di lipidi neutri mediante cromatografia su strato sottile. Le classi fosfolipidi totali, trigliceridi, acidi grassi liberi e esteri del colesterolo sono stati sottoposti a trans-metilazione in reflux e la composizione in acidi grassi è stata determinata mediante gascromatografia con rivelatore FID e colonna capillare. Il colesterolo libero è stato determinato mediante kit spettrofotometrico. I dati di laboratorio sono in fase di organizzazione ed elaborazione per ottenere i risultati.

Produzione e qualità di materiale seminale - La produzione di materiale seminale è stata valutata nelle razze di pollo ER (n=20) e RL (n=20). Tutti i galli sono stati allevati in gabbia singola in ambiente controllato e addestrati al prelievo manuale di seme. I prelievi di seme sono stati effettuati regolarmente due volte/settimana nel periodo febbraio-maggio su 15 galli ER e 10 galli RL individuati in fase di addestramento. I valori medi dei parametri quanti-qualitativi misurati nei singoli eiaculati sono riportati per razza in Tabella 1.7. Aliquote di seme

(pool di eiaculati), dopo separazione di spermatozoi e plasma seminale, sono state conservate a -20°C per la successiva analisi proteomica e lipidica.

Azione 2 – Caratterizzazione genetica delle razze e delle specie allevate in Italia anche mediante l'impiego di informazioni genomiche

Task 2.1 Caratterizzazione genetica mediante marcatori microsatelliti

Vedi report UniTO

*Task 2.3 Caratterizzazione genomica mediante sequenziamento della specie *Meleagris gallopavo*.*

Il campione definitivo di razze e individui per la caratterizzazione genomica include: 8 capi Castano precoce, 7 capi Bronzato comune, 7 capi Ermellinato di Rovigo, 9 capi Romagnolo, 6 capi tacchino di PR&PC. I campioni di DNA, dopo estrazione e valutazione quali-quantitativa, sono stati inviati a un laboratorio esterno (Novogene, Company Limited, UK) per il servizio di sequenziamento e analisi bioinformatica. I dati genomici sono stati acquisiti nel mese di maggio e sono in fase di elaborazione statistica.

Azione 4 – Stima di indici genetici e genomici e gestione riproduttiva in relazione alle nuove finalità (benessere animale, emissioni gas ad effetto serra nell'ambiente, miglioramento dell'efficienza riproduttiva e salvaguardia della biodiversità) anche con l'ausilio di marcatori genetici in linkage con geni utili (MAS), di geni candidati (GAS) e della selezione genomica (GS).

Task 4.1 Scelta dei maschi per la riproduzione e la produzione di materiale seminale

Vedi report UniTO

Task 4.2 Gestione riproduttiva

Vedi report UniTO

Azione 8 – Raccolta di materiale biologico e germoplasma

Task 8.2 Raccolta di germoplasma nella Criobanca del Seme delle Razze Avicole Italiane

La Criobanca del Seme delle Razze Avicole Italiane è stata ampliata e dosi di seme delle razze descritte in azione 1 task 1.4 sono state preparate e stoccate in azoto liquido. Il seme è stato congelato utilizzando la procedura descritta per la specie *Gallus gallus* nelle SOP della criobanca. I galli donatori di seme, selezionati in base alla quantità e qualità dell'eiaculato, sono 7 di razza ER e 7 di razza RL. L'attività di preparazione e congelamento di dosi di seme è in corso e si prevede la sua conclusione nel mese di giugno. A oggi, le dosi di seme prodotte di razza ER sono 158 e di razza RL 35.

Azione 10 – Azioni di accompagnamento

Le attività di comunicazione sono state molteplici e sono descritte in sintesi.

- Schede tecniche di razza, specie *Gallus gallus*, sono state pianificate, prodotte e pubblicate online. Dopo una fase iniziale di messa a punto di un form condiviso con tutti i PA, le schede tecniche sono state compilate utilizzando le informazioni ricevute dai PA. Inoltre, in accordo con il laboratorio di genetica molecolare UniTO, la scheda è stata ampliata inserendo indici genetici valutati nelle popolazioni nucleo. Le schede sono state pubblicate online nel portale di progetto pollitaliani.it, dove è disponibile anche una versione stampabile in formato *booklet* pdf.
- Il portale di progetto è stato costantemente aggiornato, in particolare relativamente alle pagine dedicate alle pubblicazioni, alla partecipazione a congressi e ad eventi di carattere fieristico e divulgativo, oltre che

con l'inserimento della sezione dedicata al primo meeting annuale e ai risultati del primo anno di progetto.

- Due volantini, dedicati al progetto e alle razze conservate, sono stati prodotti e stampati. I volantini sono disponibili a tutti i PA e ai consulenti UniTO e ANCI per la distribuzione in iniziative a carattere divulgativo rivolte ad un ampio pubblico.
- Articoli scientifici in riviste open access, di cui uno collettivo di progetto, e comunicazioni in congressi nazionali ed internazionali sono stati pubblicati, come comunicato nella pagina web pollitaliani.it/pubblicazioni.

FIGURE E TABELLE

Figura 1.1 – Curva di crescita di polli Mericanel della Brianza misurata da 1 a 32 settimane di vita in entrambi i sessi

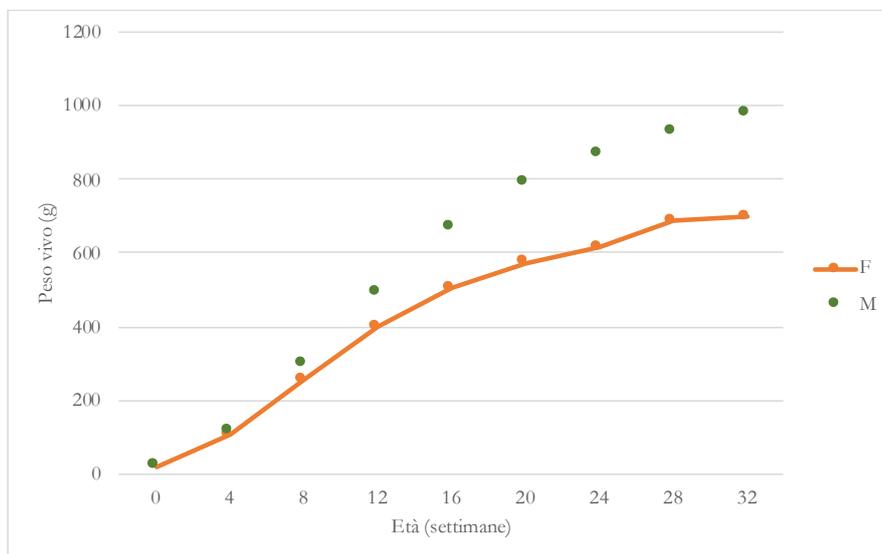


Tabella 1.1 – Numerosità familiare, peso vivo dei riproduttori e indice di parentela molecolare per famiglia (IPM) nella popolazione nucleo Mericanel della Brianza

Linea familiare	Numero capi		Peso vivo (g)		IPM
	gallo	galline	gallo	galline	
A*	1	10	1040	655	0,48
BC*	1	11	910	645	0,45
DEF*	1	12	950	641	0,60
G*	1	12	905	784	0,58
5**	1	8	850	829	0,57
6**	1	7	800	727	0,58

* linea familiare interna; ** nuova linea familiare esterna

Tabella 1.2 – Parametri di incubazione artificiale registrati nella razza Mericanel della Brianza nel periodo aprile-maggio 2023

Schiusa	Uova fertili (%)	Embrioni morti (%)	Pulcini schiusi (% su totale)	Pulcini schiusi (% su fertile)
1*	74,1	12,1	62,0	83,8
2**	85,0	10,0	75,0	88,2

* uova da cova conservate 14 giorni; ** uova da cova conservate 7 giorni

Figura 1.2 – Curva di ovodeposizione registrata da ottobre 2022 a maggio 2023 in galline Mericanel della Brianza di linee familiari nucleo e nuove

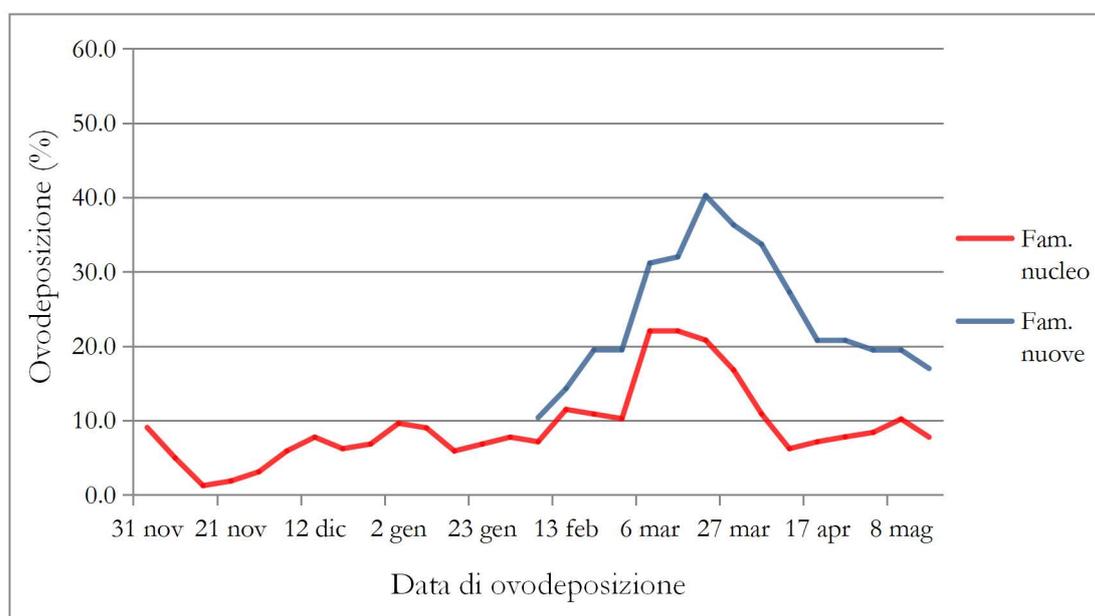


Tabella 1.3 – Parametri di incubazione artificiale registrati in diverse linee familiari Mericanel della Brianza nel periodo aprile-maggio 2023

Linea familiare	Fertilità (%)	EM ¹ (%)	Schiusa (% su totale)	Schiusa (% su fertile)
A	97	10	87	89
BC	86	14	72	84
DEF	61	6	56	91
G	43	7	36	83
5	64	13	51	80
6	79	13	66	83

¹ EM embrioni morti

Figura 1.3 – Curva di crescita di polli Modenesi misurata da 8 a 46 settimane di vita in entrambi i sessi

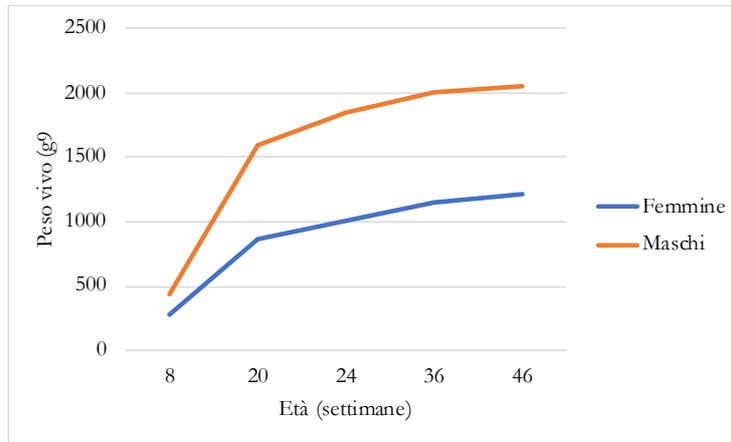


Tabella 1.4 – Peso vivo (media±DS) di tacchini Brianzolo misurato in entrambi i sessi durante la fase di crescita

Età (sett.)	Maschi	Femmine
14	1779 ± 88	1379 ± 96
30	4357 ± 145	2713 ± 204
47	4527 ± 186	2658 ± 30

Figura 1.4 – Curva di ovodeposizione registrata da ottobre 2022 a maggio 2023 in tacchine Brianzolo

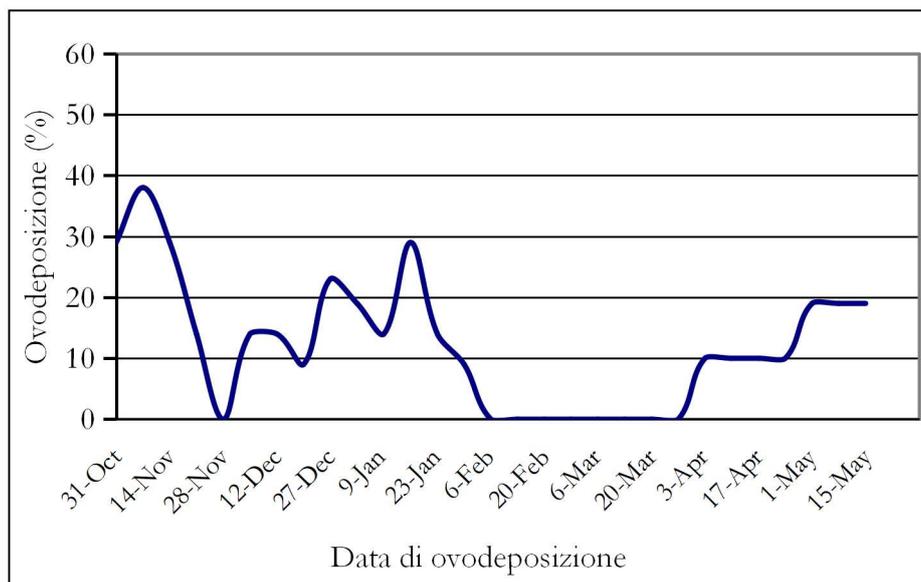


Tabella 1.5 – Numero di proteine identificate, percentuale di MS/MS effettuate e somma dei valori di intensità del segnale LFQ relativi ai dataset scelti per l'analisi differenziale

	Cellule spermatiche			Plasma seminale		
	Numero di proteine identificate	% di MS/MS effettuate	Somma dei valori di intensità del segnale LFQ	Numero di proteine identificate	% di MS/MS effettuate	Somma dei valori di intensità del segnale LFQ
Mericanel della Brianza						
Dataset 1	997	14,88	22665	686	9,29	15642
Dataset 2	1020	13,04	23186	677	10,27	15307
Dataset 3	993	12,51	22602	689	10,37	15616
Dataset 4	1044	14,61	23643	633	8,79	14454
Bionda Piemontese						
Dataset 1	1000	11,72	22737	719	7,11	16103
Dataset 2	1009	11,21	23073	675	8,04	15274
Dataset 3	1006	10,88	22965	703	8,75	15818
Dataset 4	998	9,95	22854	688	6,61	15468
Bianca di Saluzzo						
Dataset 1	1035	10,98	23504	670	10,13	15170
Dataset 2	1038	11,00	23567	584	8,18	13430
Dataset 3	1086	13,74	24449	590	8,05	13454
Dataset 4	1039	16,07	23619	607	8,13	13875
Pepoi						
Dataset 1	955	11,55	21829	509	5,52	11719
Dataset 2	967	13,22	22064	543	4,37	12418
Dataset 3	977	15,31	22162	545	3,83	12509
Dataset 4	858	12,28	19815	571	4,26	12998
Robusta Maculata						
Dataset 1	858	12,25	19804	525	5,31	11937
Dataset 2	822	10,53	19023	613	6,77	13870
Dataset 3	927	15,47	21260	514	4,91	11736
Dataset 4	982	17,03	22332	543	5,23	12339

Tabella 1.6 – Coefficienti di correlazione di Pearson tra i dataset scelti per l'analisi differenziale

	Cellule spermatiche				Plasma seminale			
Mericanel della Brianza								
	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4
Dataset 1	1	0.95	0.94	0.96	1	0.93	0.96	0.94
Dataset 2	0.95	1	0.96	0.96	0.93	1	0.98	0.96
Dataset 3	0.94	0.96	1	0.97	0.93	0.98	1	0.96
Dataset 4	0.96	0.96	0.97	1	0.94	0.96	0.96	1
Bionda Piemontese								
	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4
Dataset 1	1	0.96	0.95	0.95	1	0.92	0.9	0.91
Dataset 2	0.96	1	0.98	0.97	0.92	1	0.94	0.95
Dataset 3	0.95	0.98	1	0.97	0.9	0.94	1	0.94
Dataset 4	0.95	0.97	0.97	1	0.91	0.95	0.94	1
Bianca di Saluzzo								
	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4
Dataset 1	1	0.98	0.95	0.94	1	0.96	0.86	0.92
Dataset 2	0.98	1	0.93	0.94	0.96	1	0.84	0.91
Dataset 3	0.95	0.93	1	0.98	0.86	0.84	1	0.94
Dataset 4	0.94	0.94	0.98	1	0.92	0.91	0.94	1
Pepoi								
	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4
Dataset 1	1	0.98	0.96	0.96	1	0.92	0.84	0.89
Dataset 2	0.98	1	0.97	0.96	0.92	1	0.85	0.89
Dataset 3	0.96	0.97	1	0.96	0.84	0.85	1	0.91
Dataset 4	0.96	0.96	0.96	1	0.89	0.89	0.91	1
Robusta Maculata								
	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4	Dataset 1	Dataset 2	Dataset 3	Dataset 4
Dataset 1	1	0.97	0.97	0.96	1	0.9	0.92	0.93
Dataset 2	0.97	1	0.97	0.95	0.9	1	0.93	0.92
Dataset 3	0.97	0.97	1	0.97	0.92	0.93	1	0.95
Dataset 4	0.96	0.95	0.97	1	0.93	0.92	0.95	1

Figura 1.5 – Diagramma di Venn relativo alle proteine identificate in spermatozoi delle razze di pollo Bionda piemontese (BP), Bianca di Saluzzo (BS), Mericanel della Brianza (MB), Pepoi (Pe) e Robusta maculata (RM)

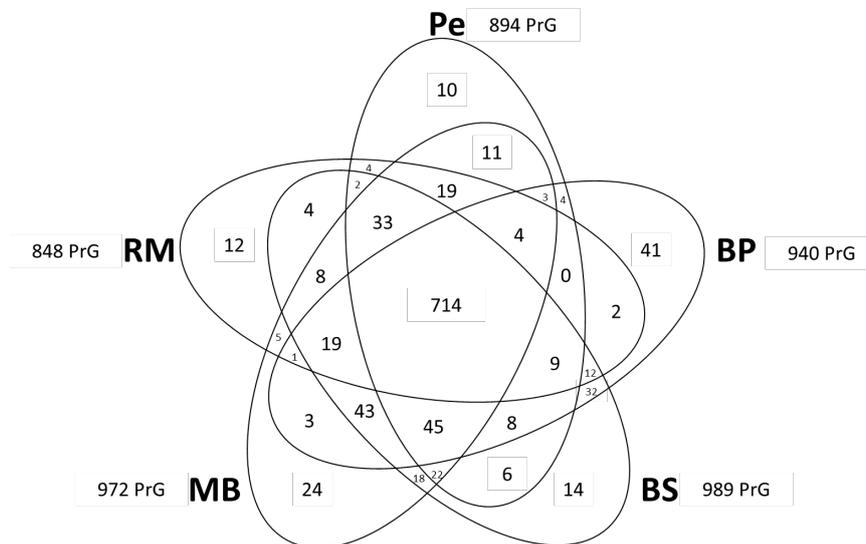


Figura 1.6 – Diagramma di Venn relativo alle proteine identificate nel plasma seminale delle razze di pollo Bionda piemontese (BP), Bianca di Saluzzo (BS), Mericanel della Brianza (MB), Pepoi (Pe) e Robusta maculata (RM)

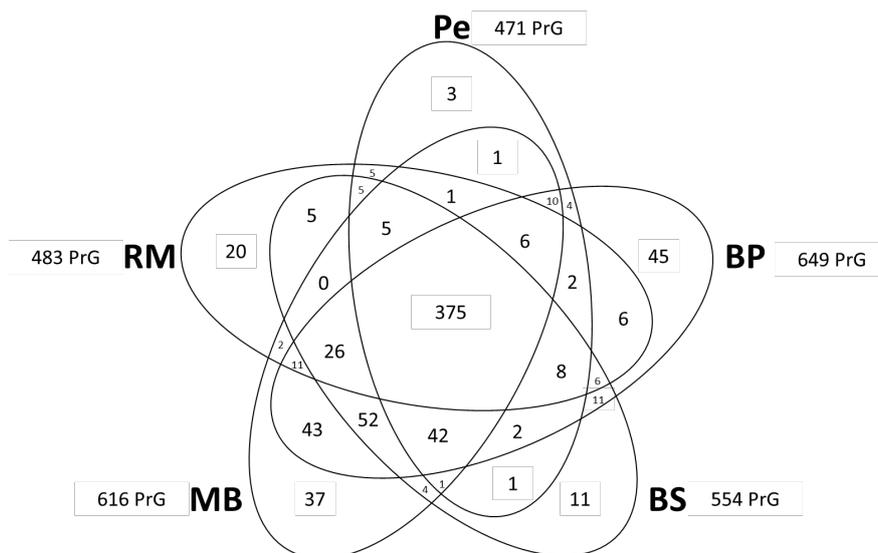


Tabella 1.7 – Caratteristiche quanti-qualitative del seme di galli di razza Ermellinata di Rovigo (ER) e Robusta lionata (RL)

Parametro*	Razza	
	ER	RL
Volume (mL)	0,248 ± 0,098	0,167 ± 0,073
Concentrazione (x10 ⁹ /mL)	1,35 ± 0,80	1,43 ± 0,39
Spermatozoi/eiaculato (x10 ⁹)	0,368 ± 0,309	0,255 ± 0,148
IM (%)	94,0 ± 3,20	93,0 ± 2,82
Motilità (%)	97,2 ± 2,29	96,1 ± 4,35
MP (%)	38,3 ± 4,38	40,4 ± 8,27
VCL (µm/s)	103,1 ± 13,4	112,6 ± 14,5
VSL (µm/s)	43,9 ± 5,15	49,9 ± 8,49
VAP (µm/s)	68,4 ± 7,66	75,2 ± 9,46
LIN (%)	43,7 ± 4,47	45,3 ± 8,37
STR (%)	64,6 ± 3,67	66,5 ± 7,16
WOB (%)	67,0 ± 3,09	67,3 ± 5,69
ALH (µm)	4,18 ± 0,43	4,52 ± 0,52
BCF (Hz)	7,19 ± 0,52	7,54 ± 0,74

*IM: integrità membrana cellulare, MP: motilità progressiva, VCL: velocità curvilinea, VSL: velocità in linea retta, VAP: velocità media vettoriale, LIN: VSL/VCL, STR: VSL/VAP, WOB: AP/VCL, ALH: ampiezza dello spostamento laterale della testa, BCF: frequenza ritmica di corsa.