Crioconservazione del germoplasma di riproduttori di interesse genetico per la tutela di razze caprine autoctone a rischio estinzione

NOTA TECNICA

Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

Progetto condotto nell'ambito del:

FEASR – Programma di Sviluppo Rurale 2014-2020
MISURA 10. – "Pagamenti agro climatici ambientali"
SOTTOMISURA 10.2 – "Sostegno per la conservazione, l'uso e lo sviluppo sostenibili delle risorse genetiche in agricoltura"
OPERAZIONE 10.2.01 – "Conservazione della biodiversità animale e vegetale"

Enti Coinvolti

Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani

ASSONAPA

Regione Lombardia

A cura di:

Roberto Puglisi

Valeria Bornaghi

Andrea Galli

Foto e immagini

Istituto Spallanzani

ASSONAPA

Copertina

Laura Paoli

Contatti:

Roberto Puglisi (roberto.puglisi@istitutospallanzani.it)

Valeria Bornaghi (valeria.bornaghi@istitutospallanzani.it)

Indice

Introduzione 5
Le Razze 6
Consistenze delle razze caprine autoctone 11
Come preservare le razze a limitata diffusione 16
La Crioconservazione 16
La Criobanca 18
L'organizzazione della criobanca 18
Congelamento 19
Scongelamento 20
La valutazione del materiale seminale 20
IVOS II Hamilton Thorne 20
NucleoCounter SP100 ChemoMetec 21
Guava easyCyte Luminex 22
Tecniche di fecondazione in vitro 24
Il Progetto CRIOGERM 25
Scopo 25
Obiettivi 25
Descrizione del progetto 26
L'operatività 27
Azione 1 27
Scelta dei riproduttori 27
Valutazione dei maschi riproduttori 27
Riproduttori testati 27
Azione 2 29
Prelievo del materiale seminale 29
Costituzione della criobanca 29
Le analisi 30
Azione 3 33
Risultati ottenuti 34
Azione 1 34

Azione 2 34
Costituzione della criobanca 34
Le analisi 38
Azione 3 43
Il Progetto in sintesi 44
Bibliografia consultata 45
Ringraziamenti 47

Introduzione

L'allevamento delle razze caprine autoctone è strettamente legato agli equilibri ambientali e alle tradizioni agroalimentari locali. Lontano dalle logiche del profitto tipico delle attività allevatoriali intensive, la passione che un numero limitato, ma fondamentale, di allevatori ancora dedica a tale attività concorre alla valorizzazione dei prodotti tipici e al sostegno delle aree marginali. Infatti, privilegiare l'allevamento di animali meno produttivi, ma che offrono garanzie di maggiore qualità e tipicità è fondamentale per lo sviluppo sostenibile che può essere perseguito favorendo l'allevamento di razze autoctone secondo modalità di tipo estensivo. In questo, le specie "minori", quella caprina in particolare, appaiono le più indicate in quanto nonostante le difficoltà, la grande cura delle tradizioni locali, che non ha mai del tutto abbandonato i nostri territori, ha consentito la sopravvivenza di piccole popolazioni locali all'interno di sistemi pastorali spesso sfavorevoli per altre attività agricole. Sebbene in tale contesto la Lombardia rappresenti la terza regione italiana per consistenza di capi allevati, segno dello sforzo impiegato dai sostenitori del patrimonio zootecnico autoctono, interventi sempre più incisivi sono auspicabili per salvaguardarne la continuità all'interno di sistemi che per propria natura non si avvalgono delle tipiche strategie di riproduzione e selezione basate, ad esempio sulla fecondazione artificiale (FA), esponendoli così a rischi collaterali. È, infatti, proprio in queste piccole popolazioni gestite unicamente tramite monta naturale che i vantaggi dell'utilizzo della FA si tradurrebbe in un vero e proprio approccio strategico indirizzato alla loro salvaguardia. L'utilizzo della FA con seme congelato di becchi esterni all'allevamento permetterebbe, infatti, di abbassare il livello di consanguineità del gregge privandolo al contempo dei rischi sanitari collaterali insiti nella movimentazione di animali tra allevamenti. In tale ambito, non bisogna, infatti, dimenticare che proprio l'eccesso di consanguineità, oltre che a portare in evidenza tutta una serie di caratteri recessivi non visibili che si traducono in anomalie morfologiche, è spesso accompagnato da problemi riproduttivi legati all'inevitabile calo della fertilità. Nello specifico, per rispondere alla necessità di limitare il rischio di una eventuale perdita di parte, se non totale, delle risorse genetiche delle popolazioni ancora presenti, le azioni previste partendo dal patrimonio d'informazioni in possesso di ASSONAPA mirava alla creazione di una criobanca di materiale seminale altamente caratterizzato per qualità e fertilità dei riproduttori. Nell'insieme, le attività di caratterizzazione del materiale seminale in termini di qualità e potenziale fertilità sono state pensate quale ulteriore strumento per la salvaguardia delle razze in quanto consentono di identificare i soggetti potenzialmente più idonei alla creazione della criobanca allestita con seme controllato di riproduttori selezionati.

Le Razze

Frisa Valtellinese o Frontalasca

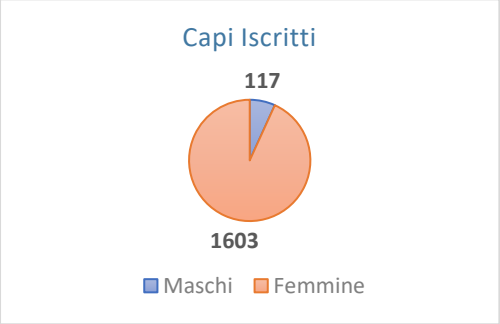
Da tempo è conosciuta come razza Frontalasca, dal nome di Frontale in Val di Rezzalo, località dell'alta Valtellina (SO), da dove viene considerata originaria. È da ritenere di ceppo analogo a quello della razza Striata Grigionese. Dalla sua culla di origine negli anni si è diffusa in tutta l'alta Valtellina; esistono gruppi consistenti anche sul versante retico (Valmalenco e Val Masino) ed in Valchiavenna.
Indirizzo produttivo prevalente: ***Latte e Carne***

Prodotti Tipici: *Il Violino*

Taglia: grande, lunga e robusta, piuttosto muscolosa ma ben proporzionata.
Testa: leggera e fine nelle femmine, con profilo fronto nasale rettilineo; orecchie portate di lato, obliquamente ed in avanti, con sfumature bianche. Le corna sono portate indietro a scimitarra, esistono però soggetti acorni. Collo lungo ma robusto, con presenza o meno di tettole nei due sessi.
Tronco: lungo, con linea dorso-lombare rettilinea, groppa di buono sviluppo e mediamente spiovente. Mammella per lo più globosa nelle primipare, tendente al piriforme con l'avanzare dell'età, capezzoli ben sviluppati e forte apparecchio legamentoso di sostegno.
Mantello: è tipicamente nero, ad eccezione di due caratteristiche striature bianche ai lati della testa, del ventre (carattere che può mancare), del sottocoda e delle estremità degli arti, anch'essi di colore bianco; il pelo è di media lunghezza, folto e lucido. Pelle fine ed elastica.

Misura Somatica	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	80	79
Peso (kg)	75	65

Numero di Allevamenti	**45**
Rimonte maschi	11
Rimonte femmine	308
Adulti maschi	107
Adulti femmine	1.295
Maschi Iscritti	117
Femmine Iscritte	1.603
Totale iscritti	**1.720**



Orobica o di Valgerola

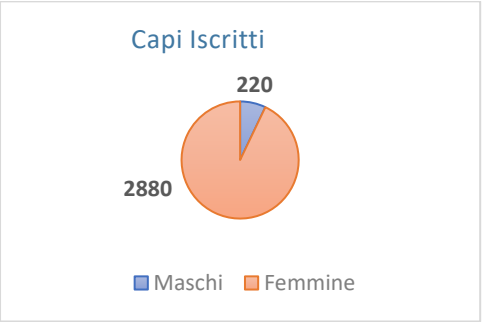
La capra Orobica, detta anche Valgerola, è presente sul versante orobico e sul fondovalle della bassa Valtellina, oltre che nella valle Gerola, in provincia di Sondrio; alcune greggi sono presenti anche in provincia di Lecco, Como e Bergamo
Indirizzo produttivo prevalente: ***Latte***

Prodotti Tipici*:* *Formagìn (Valsassina), Matuscin (Valtellina), Roviola (Val Brembana), Bitto*

Taglia: media.
Testa: proporzionata, leggera, tendenzialmente fine; profilo fronto-nasale leggermente camuso o rettilineo, barba nei maschi e spesso presente anche nelle femmine, orecchie non molto lunghe, erette, portate obliquamente in avanti, mai pendenti; corna molto lunghe anche nelle femmine, di sezione appiattita con lieve torsione elicoidale, incurvate lateralmente alla base e verso l'alto all'apice. Rari i soggetti acorni tollerati solo se femmine.
Tronco: torace e addome ben sviluppati, regione dorso lombare rettilinea ed orizzontale, groppa larga e lievemente spiovente.
Mantello: molto vario e pelo di notevole lunghezza sia sull'anteriore che sul posteriore, la lunghezza del pelo è uniforme e coprono la groppa e le cosce. Si riconoscono anche diverse varietà di mantello con tipi intermedi: Farinel: di colore grigio, beige, beige con riflessi violacei, bianco crema; Marin: pezzato tipico con prevalenza di nero o grigio nel posteriore e del bianco crema nell'anteriore, la testa è contraddistinta da due striature su entrambi i lati di colore nero o grigio; Nigru: nero focato; Camosch: scuro con peli mescolati bianchi, neri e rossi nelle diverse tonalità, la testa è sempre più scura del fondo.

Misura Somatica	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	79	73
Peso (kg)	80	65

Numero di Allevamenti	**102**
Rimonte maschi	5
Rimonte femmine	498
Adulti maschi	218
Adulti femmine	2.414
Maschi Iscritti	220
Femmine Iscritte	2.880
Totale iscritti	**3.100**



Lariana o di Livo

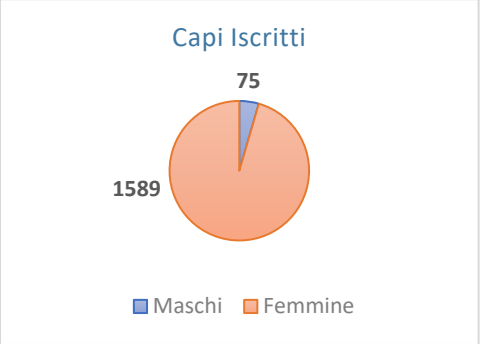
Il nome «Lariana» di questa razza – conosciuta anche come capra di Livo – deriva dalla constatazione che, pur risultando il Comune di Livo (provincia di Como) un centro privilegiato di allevamento, la sua diffusione, concentrata nell'Alto Lario, è estesa a tutta l'area lariana (del lago di Como, detto anche «Lario») occidentale.
Indirizzo produttivo prevalente: ***Latte (discreta) e Capretto***

Prodotti Tipici: *Capretto, Formaggi d'alpeggio, Lariano d'alpe grasso, Lariano d'alpe semigrasso, Formaggini a coagulazione presamica, Zincarlin*

Taglia: medio-grande.
Testa: proporzionata, con profilo front-nasale in genere rettilineo. Le corna possono essere assenti o presenti, con portamento "a stambecco" (scimitarra) o di tipo "markar" (rivolte all'indietro e divaricate). La barba può essere presente o assente.
Tronco: con torace e addome ben sviluppati, regione dorso-lombare rettilinea e orizzontale, groppa sviluppata e mediamente spiovente.
Mantello: molto eterogeneo. Sono presenti soggetti a mantello uniforme di tipo eumelanico (nero, bruno), feomelanico (rosso o giallo) o roano (peli bianchi mescolati a peli pigmentati), soggetti con aree feomelaniche ed eumelaniche con diversa distribuzione ed estensione e soggetti con pezzature bianche, tipo regolare o irregolare. Il pelo può essere corto, intermedio o lungo.

Misura Somatica	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	70	60
Peso (kg)	60	45-50

Numero di Allevamenti	**36**
Rimonte maschi	2
Rimonte femmine	235
Adulti maschi	73
Adulti femmine	1.355
Maschi Iscritti	75
Femmine Iscritte	1.589
Totale iscritti	**1.664**



Verzaschese o nera di Verzasca

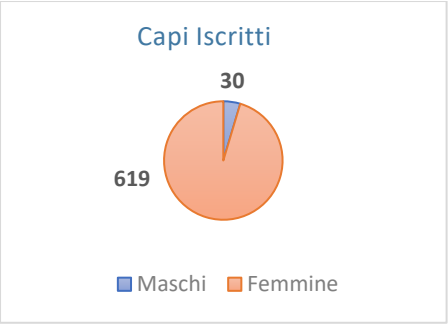
La popolazione Verzaschese o nera di Verzasca ha la sua culla di origine nella omonima Valle, ubicata nelle Prealpi Svizzere a monte di Locarno (Lago Maggiore), dove viene allevata in forma semibrada da tempo imprecisabile degli anni 70, riproduttori sia maschi che femmine sono stati introdotti nella provincia di Varese e successivamente di Como. La notevole rusticità e sobrietà della razza ha determinato la sua graduale diffusione, nell'area montana della provincia di Varese.
Indirizzo produttivo prevalente: ***Latte***

Prodotti Tipici*: Formaggella del Luinese DOP*

Taglia: medio-grande.
***Testa*:** leggera, fronte ampia non montonina, musello grande; orecchie sviluppate ed erette, mai pendenti. *Collo*: robusto, ben unito alla spalla e al garrese.
***Corna*:** sempre presenti in ambo i sessi, lunghe 30-40cm, lievemente arcuate all'indietro, con una leggera torsione verso l'esterno.
***Tronco*:** spalla larga ben legata al torace, garrese di lunghezza media, torace profondo e largo, con coste ben arcuate; cosce muscolose.
***Arti*:** con tendini ben marcati, ossa di media grossezza, articolazioni asciutte, pastoie robuste, unghielli duri e larghi.
Mantello: Completamente nero, lucido, con pelo corto e fine, più fitto nella stagione invernale: nei becchi c'è presenza di barba e di peli più lunghi sul garrese; pelle morbida, fine ed elastica.

Misura Somatica	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	80-90	75-80
Peso (kg)	90	60

Numero di Allevamenti	**9**
Rimonte maschi	3
Rimonte femmine	127
Adulti maschi	31
Adulti femmine	521
Maschi Iscritti	30
Femmine Iscritte	619
Totale iscritti	**649**



Bionda dell'Adamello

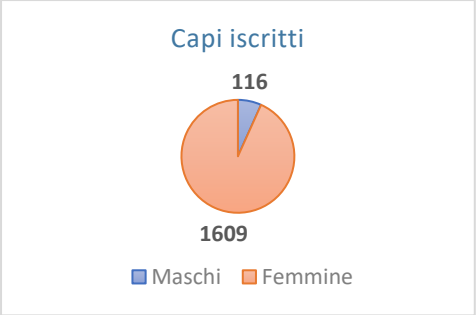
L'area di diffusione è rappresentata dal massiccio dell'Adamello (principalmente nella sua parte sud), la Valle Camonica e la montagna bresciana con presenza di nuclei nelle zone bergamasche di confine Val di Scalve e Sebino.
Indirizzo produttivo prevalente: **Latte**

Prodotti Tipici: *Fatulì, Berna*

Taglia: medio-grande.
Testa: leggera e fine con presenza di barba nei maschi e nella stragrande maggioranza delle femmine; la presenza delle corna è legata alla scelta degli allevatori e alle tradizioni locali.
Tronco: torace e addome ben sviluppati, regione dorso-lombare rettilinea e orizzontale, groppa di buono sviluppo e mediamente spiovente.
Mantello: di colore uniforme con tonalità variabili dal marrone chiaro al biondo, la zona ventrale bianca, si estende dal torace alla coda e comprende la parte interna delle cosce; sulla testa sono presenti due striature bianche estese dall'attacco delle orecchie al muso; il pelo è uniformemente lungo.

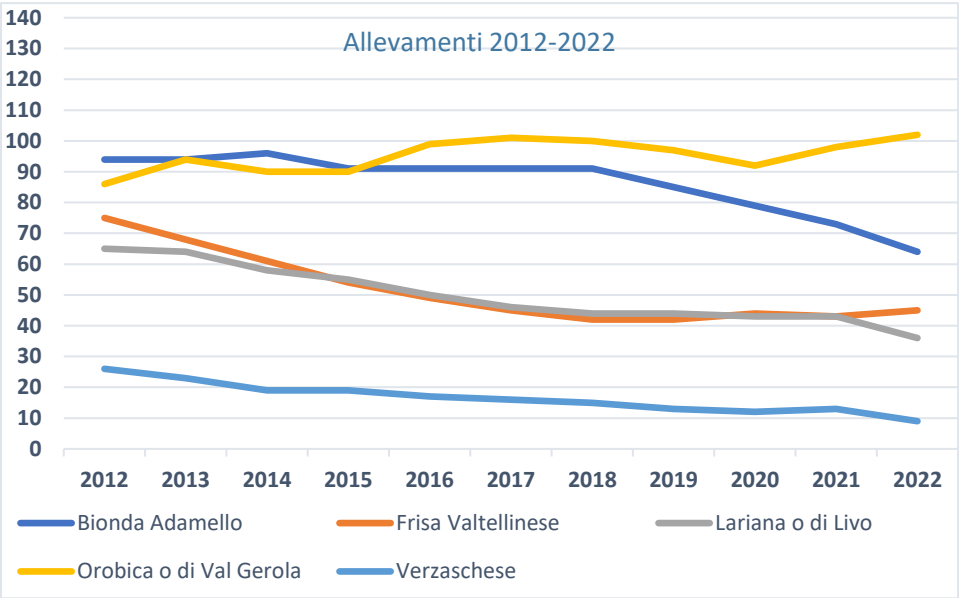
Misura somatica	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	75	74
Peso (kg)	70-75	55-60

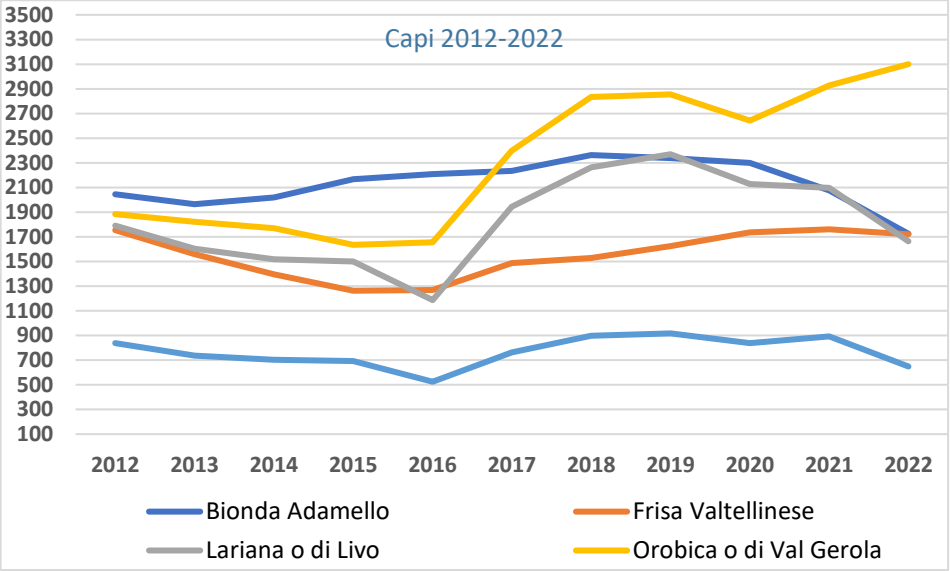
Numero di allevamenti	**64**
Rimonte maschi	3
Rimonte femmine	306
Adulti maschi	122
Adulti femmine	1.687
Maschi Iscritti	116
Femmine Iscritte	1.609
Totale iscritti	**1.725**



Consistenze delle razze caprine autoctone

Gli animali custoditi negli allevamenti Lombardi rappresentano un tesoro unico al mondo che va tutelato e protetto, anche perché a rischio non c'è solo la biodiversità delle razze, ma anche il presidio di un territorio dove la manutenzione è garantita proprio dall'attività di allevamento, con il lavoro silenzioso di pulizia e compattamento dei suoli svolto dagli animali (dati ASSONAPA 2022).

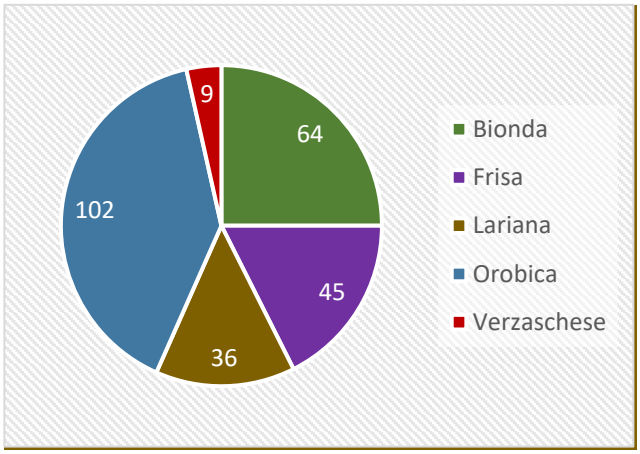




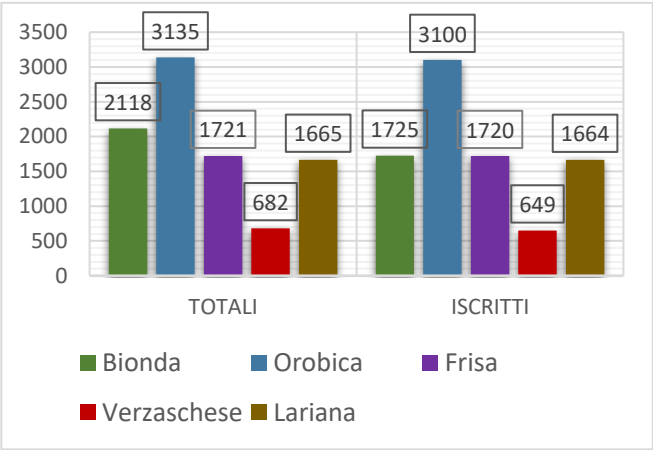
Consistenze Lombardia-2022

Razza	Allevamenti	Maschi		Femmine		TOTALI	
		Totale	Iscritti	Totale	Iscritte	Capi	Iscritti
Bionda Adamello	64	125	116	1.993	1.609	2.118	1.725
Frisa Valtellinese	45	118	117	1.603	1.603	1.721	1.720
Lariana	36	75	75	1.590	1.589	1.665	1.664
Orobica	102	223	220	2.912	2.880	3.135	3.100
Verzaschese	9	34	30	648	619	682	649
TOTALI	**256**	**575**	**558**	**8.746**	**8.300**	**9.321**	**8.858**

Allevamenti



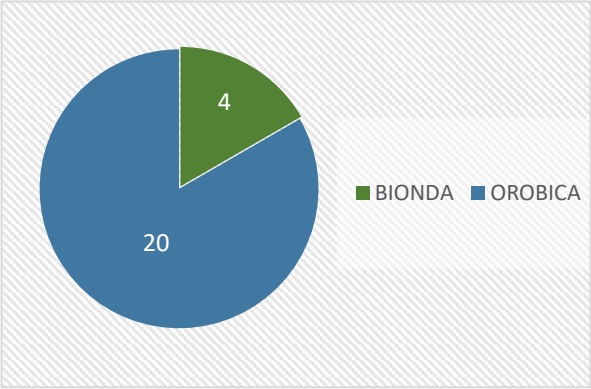
Capi



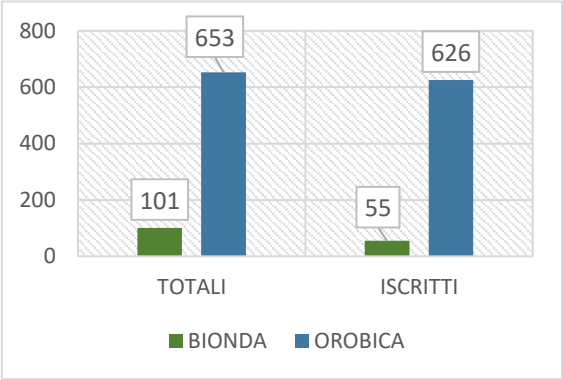
Consistenze provincia di Bergamo-2022

Razza	Allevamenti	Maschi		Femmine		TOTALI	
		Totale	Iscritti	Totale	Iscritte	Capi	Iscritti
Bionda Adamello	4	7	5	94	50	101	55
Orobica	20	51	49	602	577	653	626
TOTALI	**24**	**58**	**54**	**696**	**627**	**754**	**681**

Allevamenti



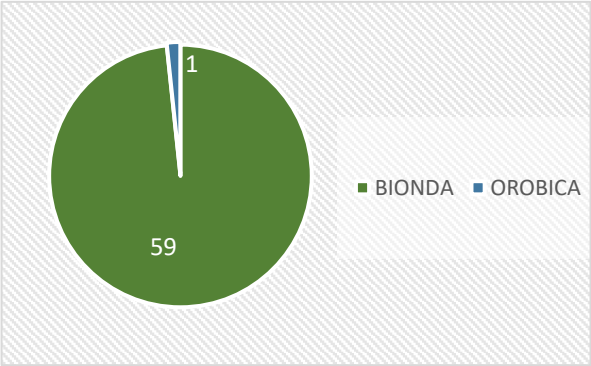
Capi



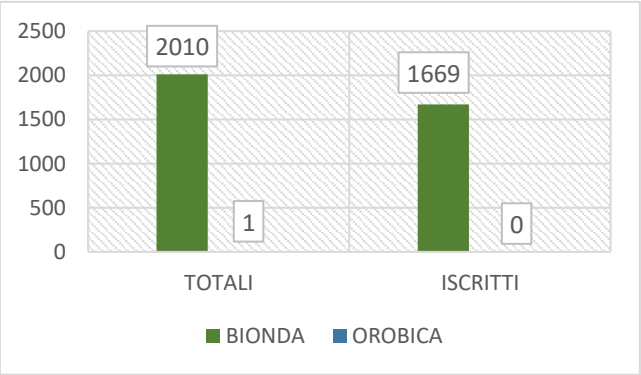
Consistenze provincia di Brescia-2022

Razza	Allevamenti	Maschi		Femmine		TOTALI	
		Totale	Iscritti	Totale	Iscritte	Capi	Iscritti
Bionda Adamello	59	117	111	1.893	1.558	2.010	1.669
Orobica	1	0	0	1	0	1	0
TOTALI	**60**	**117**	**111**	**1.894**	**1.558**	**2.011**	**1.669**

Allevamenti



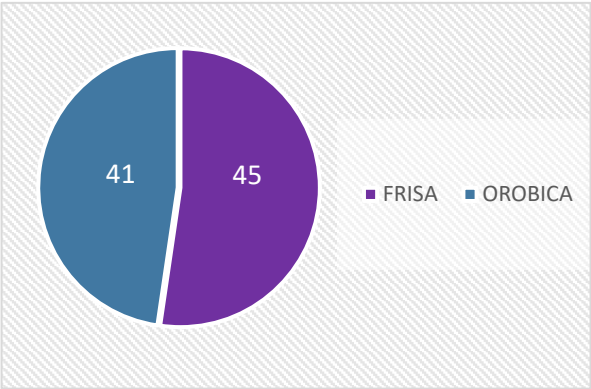
Capi



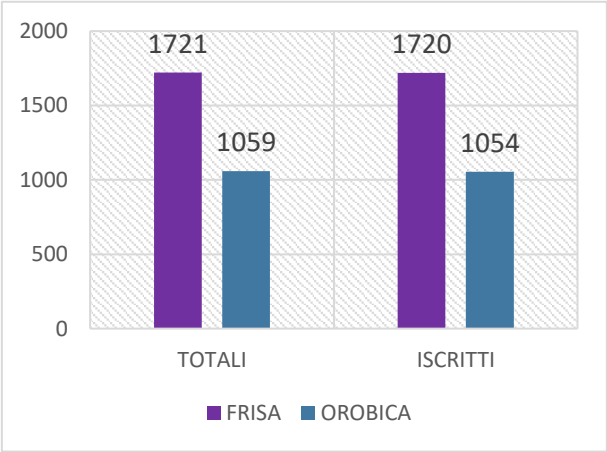
Consistenze provincia di Sondrio-2022

Razza	Allevamenti	Maschi		Femmine		TOTALI	
		Totale	Iscritti	Totale	Iscritte	Capi	Iscritti
Frisa	45	118	117	1.603	1.603	1.721	1.720
Orobica	41	77	76	982	978	1.059	1.054
TOTALI	**86**	**195**	**193**	**2.585**	**2.581**	**2.780**	**2.774**

Allevamenti



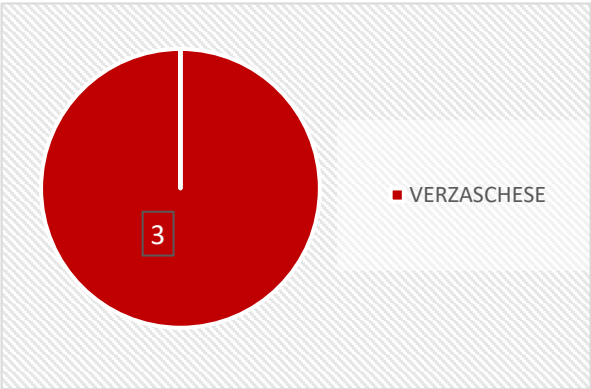
Capi



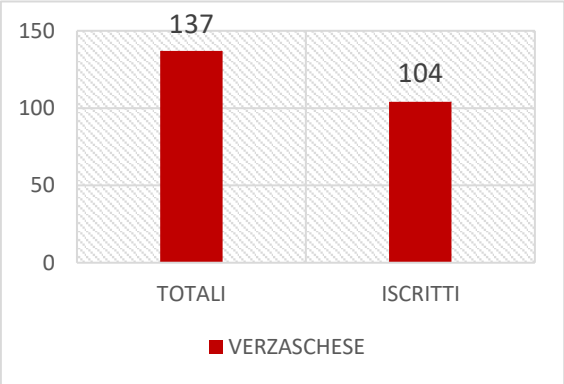
Consistenze provincia di Varese-2022

Razza	Allevamenti	Maschi		Femmine		TOTALI	
		Totale	Iscritti	Totale	Iscritte	Capi	Iscritti
Verzaschese	3	13	9	124	95	137	104
TOTALI	**3**	**13**	**9**	**124**	**95**	**137**	**104**

Allevamenti



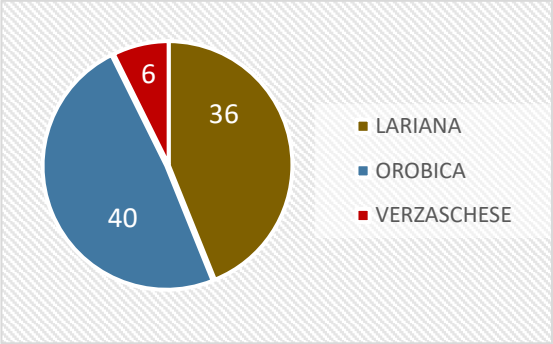
Capi



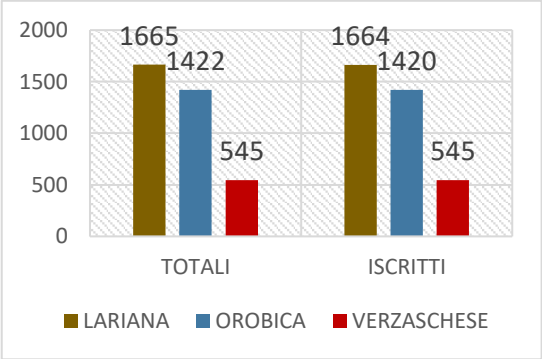
Consistenze provincia di Como-2022

Razza	Allevamenti	Maschi		Femmine		TOTALI	
		Totale	Iscritti	Totale	Iscritte	Capi	Iscritti
Lariana	36	75	75	1.590	1.589	1.665	1.664
Orobica	40	95	95	1.327	1.325	1.422	1.420
Verzaschese	6	21	21	524	524	545	545
TOTALI	**82**	**191**	**191**	**3.441**	**3.438**	**3.632**	**3.629**

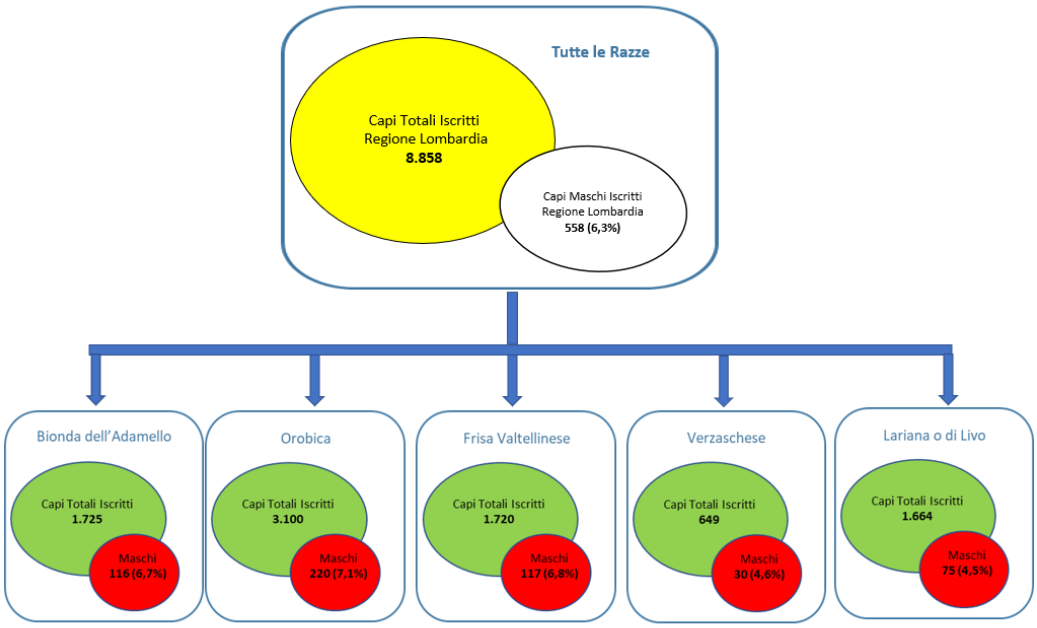
Allevamenti



Capi



Nello schema sottostante vengono riportati il numero di capi totali e divisi per razza censiti sul territorio Lombardo nell'anno 2022.



Come preservare le razze a limitata diffusione

Le tecniche ex situ rappresentano un utile strumento per la salvaguardia delle risorse genetiche animali da considerarsi complementari agli strumenti in situ che, sebbene potenzialmente validi per perseguire tutti gli obiettivi di conservazione, non sempre sono applicabili in assenza di determinate condizioni legate agli equilibri economici, sociali, culturali o di tipo ecologico. In tale contesto, la creazione di una criobanca per la salvaguardia delle risorse genetiche animali (conservazione ex situ) complementare al mantenimento e allo sviluppo delle razze all'interno dei sistemi di produzione (conservazione in situ) risulta di grande importanza. Tale approccio diviene, tuttavia, strategico quando le metodologie di conservazione in situ sono inefficaci per mantenere la variabilità genetica ed evitare l'estinzione della razza.

La Crioconservazione

La crioconservazione consente di conservare le cellule vitali a basse temperature per lunghi periodi di tempo garantendone la capacità di riprendere le normali funzionalità biologiche. Come noto, la crioconservazione del materiale seminale è una delle procedure più importanti nello sviluppo delle biotecnologie per la riproduzione assistita. Sebbene il raggiungimento di tale risultato parrebbe scontato, la "*crioresistenza"* degli spermatozoi di animali da allevamento varia a seconda delle loro caratteristiche specifiche, quali dimensione, forma e composizione lipidica. Pertanto, è impossibile sviluppare una procedura di congelamento unica e standardizzata per le diverse specie di animali. L'istituzione di un efficiente protocollo di crioconservazione del seme, considerando che le fasi di congelamento/scongelamento provocano ingenti danni alle cellule, deve essere correttamente gestito per evitare il mancato ripristino della funzionalità cellulare allo scongelamento.

Tali protocolli oltre ad essere studiati ad *hoc* per la specie in esame, risultano subordinati anche alla conoscenza approfondita del processo di congelamento e all'ottimizzazione del contenuto di spermi vitali per dose che variano in funzione del tipo di inseminazione praticabile sulla femmina. La mancata padronanza di una delle componenti implica inevitabilmente l'impossibilità di utilizzare il materiale biologico crioconservato che si traduce nel mancato obiettivo di generare progenie vitale.

A tale proposito è bene sottolineare che benché la più nota peculiarità dello spermatozoo sia riconducibile alle sue caratteristiche di motilità, il rilievo del semplice movimento dopo scongelamento non può più essere considerato l'unico parametro della funzionalità di una cellula spermatica. Proprio in base a questa esigenza, l'evoluzione della criobiologia è supportata dai concomitanti progressi delle tecnologie per l'analisi approfondita del materiale seminale consentendo lo sviluppo di nuovi protocolli di congelamento tramite il rilievo dei danni cellulari di tipo strutturale (membrane cellulari plasmatiche ed acrosomali), metabolici (attività mitocondriale e stress ossidativo) e cinetici che si possono creare con l'applicazione di un protocollo non ottimizzato.

Considerando quanto sopra descritto, numerosi studi si sono concentrati prevalentemente sulla scelta e composizione degli *extender* per la diluizione del materiale seminale e sulla messa a punto di curve di congelamento specifiche ottimizzate e standardizzate tramite l'utilizzo di camere di congelamento automatiche.

I punti maggiormente critici della crioconservazione sono le fasi di transizione che avvengono durante l'iniziale processo di raffreddamento e durante il rispristino della temperatura fisiologica. I principali obiettivi di un processo di crioconservazione sono rivolti alla riduzione degli effetti negativi dei seguenti fenomeni fisici:

- ✓ *Formazione dei cristalli di ghiaccio* - La nucleazione del ghiaccio, in seguito alla rapida discesa termica al di sotto di 0°C, inizia con la casuale aggregazione delle molecole di acqua che formano nuclei microscopici. La presenza di nuclei di ghiaccio nel compartimento cellulare non comporta, di per sé, il danneggiamento delle strutture cellulari, ma la progressiva aggregazione delle molecole di acqua circostanti determina il rapido accrescimento del nucleo, fino alla formazione di macroscopici cristalli con esiti potenzialmente letali. La fase maggiormente critica in cui avviene la formazione dei cristalli è l'iniziale fase di raffreddamento. Tuttavia, se il ripristino della temperatura non avviene con sufficiente rapidità, l'acqua libera rilasciata ha alte probabilità di tornare nuovamente nella forma cristallina, danneggiando le strutture circostanti.
- ✓ *Shock osmotico* - Durante il congelamento e lo scongelamento, se eseguiti troppo lentamente, l'eccessiva acqua libera nello spazio extracellulare induce un'improvvisa caduta della pressione osmotica nello spazio extracellulare. Per fenomeni osmotici si ha un netto movimento di acqua dal compartimento extracellulare verso il citosol, che determina il rigonfiamento e lisi cellulari.

La corretta modalità di raffreddamento/riscaldamento del seme e l'impiego di sostanze chimiche, indicate con il termine generale di crioprotettori (CPA), permette di limitare il danneggiamento cellulare indotto dai fenomeni fisici collegati con la transizione di stato dell'acqua. A tal proposito, il materiale seminale fresco deve essere diluito in un *extender* da crioconservazione che deve fornire le condizioni necessarie di energia, pH, osmolarità e protezione affinché gli spermatozoi resistano alla diminuzione della temperatura minimizzando le variazioni fisiche che portano a danni strutturali. Ciò include l'inibizione della formazione di cristalli di ghiaccio dall'interno della cellula e l'ossidazione di composti cellulari, come DNA, acrosoma e plasma membrana, che alla fine portano a una minore capacità fecondante degli spermatozoi.

Nella maggior parte delle specie, gli *extender* da crioconservazione dello sperma sono composti da sostanze tampone, crioprotettori non permeabili, crioprotettori permeabili, zuccheri quali fonte di energia e altri additivi batteriostatici e antiossidanti. Gli agenti crioprotettivi in particolare prevengono la formazione di cristalli di ghiaccio dovuti all'abbassamento della temperatura e, minimizzando l'effetto dello shock da freddo, riducono le alterazioni delle strutture preservando le funzioni dello spermatozoo. Nella maggior parte degli studi, l'inclusione di queste sostanze ha portato a una migliore qualità dello sperma dopo lo scongelamento ed alla sua capacità fertilizzante riducendo al minimo gli effetti negativi sulla struttura e sulla funzione degli spermatozoi.

- ✓ *Crioprotettori e extender* - I comuni crioprotettori impiegati durante le procedure di crioconservazione si dividono in due categorie principali: penetranti e non penetranti. I crioprotettori penetranti sono una famiglia di piccole molecole con PM < 400 g/mol in grado di oltrepassare la membrana cellulare. Essi fluiscono nel compartimento

intracellulare sostituendo la maggior parte delle molecole di acqua e formano legami ad idrogeno con le molecole acquose residue. Per le proprietà colligative delle soluzioni, si ottiene l'abbassamento del punto di congelamento e riduzione della probabilità di formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare. Durante il congelamento lento, la presenza di crioprotettori penetranti, combinata con una lenta e graduale discesa termica, favorisce l'inizio della nucleazione del ghiaccio preferenzialmente nel compartimento extracellulare. La presenza di nuclei cristallini extracellulari richiama l'acqua libera dal citoplasma, inducendo una graduale disidratazione. In tal modo, il modesto quantitativo residuo di acqua libera intracellulare può formare solo piccoli cristalli non letali. L'aggiunta di crioprotettori penetranti prima del congelamento consente la riduzione degli effetti di soluzione. Infatti, essi, restando in soluzione, diluiscono gli elettroliti che sono esclusi dall'acqua durante le fasi di solidificazione. I più comunemente utilizzati nella pratica comprendono molecole quali glicole propilenico (PROH), etilenglicol (EG), dimetilsolfossido (DMSO) e il glicerolo.
I crioprotettori non penetranti sono rappresentati da molecole di grandi dimensioni. Essi aumentano la concentrazione di soluti extra cellulari generando un gradiente osmotico, attraverso la membrana cellulare, che conduce l'acqua fuori dalla cellula causando la disidratazione cellulare prima della procedura di congelamento. Inoltre, la loro concentrazione all'interno della soluzione di congelamento è importante dal momento che determina la velocità di disidratazione della cellula: più alta è la concentrazione del crioprotettore più essa si disidrata velocemente. I crioprotettori non permeabili hanno lo scopo di preservare lo spermatozoo dalla disidratazione e dall'aumento della concentrazione di sali (saccarosio), proteggerlo dallo shock termico e salvaguardare l'integrità della membrana cellulare (tuorlo d'uovo), e ottimizzare l'osmolarità nei fluidi extracellulari (zuccheri). Gli zuccheri fanno parte di questa categoria di crioprotettori e sono molecole molto grandi con un elevato peso molecolare che favoriscono la disidratazione cellulare durante il raffreddamento. Le loro funzioni sono molteplici ma principalmente contribuiscono all'osmolarità e forniscono energia allo spermatozoo; infatti, glucosio e fruttosio sono zuccheri glicosilabili ovvero ossidabili per esso. Il tuorlo d'uovo, spesso aggiunto nel medium di crioconservazione, non è di per sé un crioprotettore ma sembra conferire maggiore fluidità alle membrane citoplasmatiche degli spermatozoi, grazie alla componente fosfolipidica delle proteine. La presenza quindi di un'alta concentrazione di molecole non permeanti, come il saccarosio, controbilanciano l'alta concentrazione del crioprotettore nella cellula riducendo lo shock osmotico e controllando l'afflusso di acqua all'interno di essa.

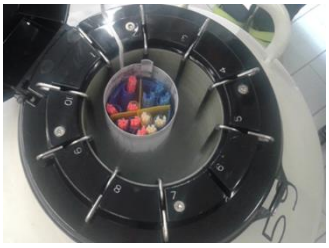
La Criobanca

L'organizzazione della criobanca

L'istituto Spallanzani possiede un locale dedicato allo stoccaggio del materiale biologico di diverse specie di animali d'interesse zootecnico e d'affezione nonché materiale per la tracciabilità genetica. Per questo motivo, visto il valore di tale risorsa, il locale che accoglie i contenitori criobiologici è stato attrezzato sia in funzione della sicurezza dei campioni che del personale che vi deve accedere ed operare.

Le dotazioni della criobanca possono essere così riassunte:

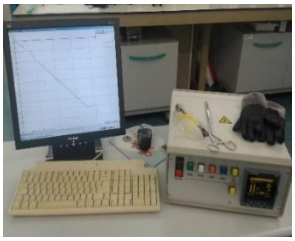
- serbatoio/erogatore contenente azoto liquido verificato da remoto
- sensori di monitoraggio ambientale gestiti da centraline e rilevatori di ossigeno ambientale
- visualizzazione esposta delle caratteristiche ambientali, per l'accesso in sicurezza
- sistemi di aspirazione e ricambio dell'aria
- selettori di messa a freddo manuale della linea criogenica
- pulsanti di emergenza
- sistemi di allarme visivi e acustici
- sistema di aspirazione dell'aria
- sistema di controllo degli accessi all'interno dei locali crio biologici mediante predisposizione di badge consentito esclusivamente al personale formato sia in termini di sicurezza sul lavoro che per la conoscenza approfondita della gestione dei campioni crioconservati.



Inoltre, è stato messo a punto un protocollo particolareggiato che consente in modo costante e tracciabile di monitorare i livelli di azoto all'interno dei tanks di stoccaggio dotati di mappe costantemente aggiornate per una veloce tracciabilità dei campioni contenuti nei singoli canister.

Congelamento

Tramite sistema automatico dotato di camera di congelamento automatica completa di centralina e software dedicato. Le camere di congelamento automatiche, supportate da software dedicato, permettono la discesa della temperatura di raffreddamento/congelamento a velocità controllata gestendo in modo ottimale la fase critica legata alla formazione dei cristalli di ghiaccio, massimizzando così la vitalità degli spermatozoi dopo la crioconservazione.



Inoltre, la perfetta ermeticità e isolamento della camera, la sua potenza e la sua costante regolazione dei parametri dei dati, consentono all'utente di determinare curve di congelamento ottimali e fornire una ripetizione semplice e accurata. Le temperature sono costantemente e precisamente monitorate da due sonde separate (camera e prodotto) per garantire il perfetto controllo delle principali fasi di congelamento.

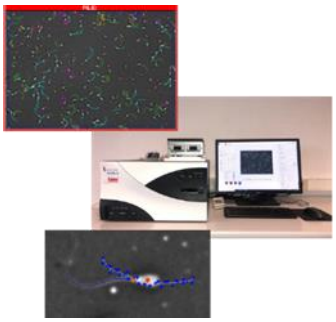
Scongelamento

Durante il processo di scongelamento le cellule vengono esposte alla stessa tipologia di stress osservata durante il congelamento ma in modo diametralmente opposto. In questa fase si assiste alla reidratazione, alla riorganizzazione della membrana cellulare e alla ripresa delle normali funzioni fisiologiche degli spermatozoi. Se lo scongelamento viene effettuato in modo improprio rispetto al protocollo di congelamento (troppo veloce o troppo lento) si incorre in un decremento della motilità spermatica, nonché in una riduzione della probabilità di ottenere una gravidanza per una precoce rottura delle membrane.

La valutazione del materiale seminale

IVOS II Hamilton Thorne

La valutazione della motilità è fondamentale ed è propedeutica a tutte le successive analisi. La determinazione viene effettuata tramite analizzatore d'immagini (sistema CASA) a garanzia della sua oggettività. Lo strumento possiede un sistema di discriminazione degli spermatozoi basato sulla determinazione di oggetti in movimento. Il suo corretto utilizzo prevede la definizione di un valore minimo di taglia (MINIMUM CELL SIZE) e di luminosità (MINIMUM CONTRAST) che un oggetto deve avere per essere riconosciuto. Per l'analisi e la discriminazione degli spermatozoi immobili vengono utilizzate le medie della dimensione e dell'intensità di luce degli oggetti in movimento.
La classificazione degli spermatozoi si basa sulla velocità di spostamento degli stessi. Vengono misurate: la velocità lineare (VSL), data dalla distanza fra la prima e l'ultima posizione assunta dallo spermatozoo (percorso rettilineo) diviso il tempo; la velocità curvilinea (VCL), data dalla somma dei segmenti sottesi fra le varie posizioni della traiettoria dello spermatozoo (percorso curvilineo) diviso il tempo; la *average-path-velocity* (VAP), data dal rapporto fra la lunghezza della traiettoria dello spermatozoo calcolata tramite algoritmo utilizzante la media mobile ed il tempo.



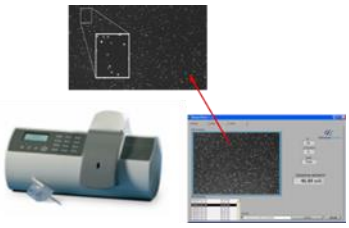
Gli spermatozoi sono considerati mobili per VAP superiore ad un valore di riferimento impostato nel settaggio e diverso a seconda della specie (la percentuale di tali spermi rappresenta la motilità totale). La velocità media di spostamento (VM) è la media delle VAP di tutti gli spermatozoi classificati come mobili. La motilità progressiva (MP) viene valutata escludendo dal numero di spermatozoi mobili quelli che posseggono un rapporto VSL/VAP inferiore a 0.75: THRESHOLD STRAIGHTNESS (75%).
Lo strumento è dotato di un microscopio integrato, di una sorgente di illuminazione stroboscopica, di due obiettivi 10x uno a contrasto di fase negativo e uno a fluorescenza nonché di un tavolinetto termostatato posto all'interno del corpo macchina.

NucleoCounter SP100 ChemoMetec

La concentrazione viene determinata su seme fresco al fine di calcolare, insieme al volume dell'eiaculato, l'output seminale finalizzato alla produzione di dosi. Mentre sul seme congelato e scongelato la determinazione di tale parametro, associato alla motilità e/o all'integrità della membrana, permette di definire il numero di spermi vitali contenuti nella dose inseminante.

L'integrità di membrana su seme fresco è finalizzata all'individuazione di particolari caratteristiche insite nell'eiaculato o più semplicemente ad escludere eventuali manipolazioni scorrette durante la fase di prelievo dell'eiaculato stesso. Il significato del dato di integrità di membrana sul seme congelato/scongelato oltre a concorrere al calcolo di spermi vitali per dose, può essere un buon marcatore utilizzabile al fine di migliorare i protocolli di crioconservazione.

Ad oggi, lo stato della membrana rappresenta uno dei maggiori presupposti per la definizione di normalità funzionale dello spermatozoo. Infatti, se è vero che la motilità è essenziale affinché uno spermatozoo sia fecondante e che uno spermatozoo con gravi anomalie della coda non è mobile, è altrettanto vero che uno spermatozoo mobile può possedere la membrana della testa alterata con gravi ripercussioni sulle fasi di riconoscimento e fusione fra lo spermatozoo e l'ovocita. L'analisi della concentrazione e dell'integrità di membrana vengono effettuate tramite NucleoCounter SP100 (ChemoMetec). Per la determinazione della concentrazione spermatica, l'analisi è preceduta dal trattamento degli spermatozoi con un apposito reagente in grado di indurre la lisi delle membrane plasmatiche di tutti gli spermatozoi del campione. Tale trattamento consente al colorante Ioduro di Propidio (IP) contenuto nelle cassette SP1 di penetrare all'interno dei nuclei colorandone il DNA e allo strumento di rilevarne la fluorescenza rossa emessa dagli spermatozoi. La stima viene effettuata tramite il numero di spot fluorescenti emessi corrispondenti al numero di spermatozoi nel campione espressi in milioni per mL.



Come per la concentrazione, il dato di integrità di membrana è ottenuto utilizzando il NucleoCounter SP100 con l'apposito protocollo previsto per questo tipo di analisi. Per descrivere questa applicazione occorre però fare la seguente precisazione: il colorante IP, è un fluorocromo che emette fluorescenza rossa quando si intercala alla doppia elica del DNA. Questo colorante è impermeabile alle membrane plasmatiche e per tale motivo solamente gli spermatozoi con membrana plasmatica danneggiata sono in grado di emettere fluorescenza rossa in seguito all'incorporazione del colorante. Al contrario, gli spermatozoi con membrana plasmatica integra non mostrano fluorescenza in quanto il fluorocromo non è in grado di attraversare la membrana plasmatica e legarsi al suo target. Diversamente da quanto avviene durante l'analisi della concentrazione, che prevede l'utilizzo di un lisante, l'analisi dell'integrità di membrana non prevede questo passaggio. In questo caso, quindi, lo strumento rileva la fluorescenza rossa imputabile ai soli spermatozoi che presentano la membrana plasmatica danneggiata riportandone il numero di spot fluorescenti.

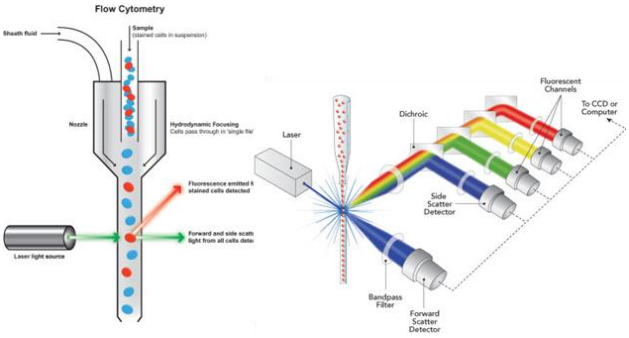
Guava EasyCyte Luminex

La stima accurata della fertilità maschile è di grande importanza economica nell'industria zootecnica. Tuttavia, le analisi convenzionali del materiale seminale sono scarsamente predittive dell'efficienza riproduttiva ottenibile in campo limitando l'efficacia della selezione per la fertilità maschile. Infatti, la sola determinazione di parametri seminali standard (come motilità, concentrazione), sebbene indispensabile ad escludere problematiche evidenti in un eiaculato, non è sufficiente per assicurare il successo riproduttivo. Questo, infatti, è il risultato del corretto svolgimento di una serie di processi fisiologici che possono essere compromessi da svariati fattori più o meno evidenziabili, tra i quali la presenza di danno mitocondriale, dei disordini fosfolipidici associati alla membrana, dell'integrità delle membrane e degli acrosomi e della struttura della cromatina nucleare. Lo stato dei fattori sopramenzionati viene determinato tramite la citofluorimetria che, in combinazione con coloranti fluorescenti, permette di effettuare un'analisi rapida, riproducibile, semplice, multiparametrica e accurata delle diverse caratteristiche funzionale degli spermatozoi.

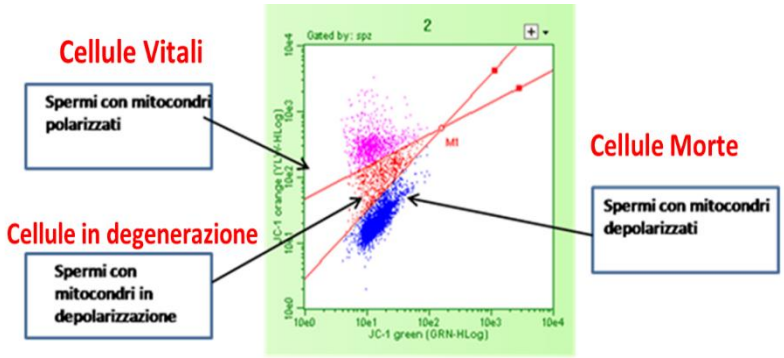
Il citofluorimetro a flusso è un sistema costituito da:

- un sistema idrodinamico, che immette le cellule del campione da analizzare in un flusso di un liquido isotonico;
- uno o più raggi laser che attraversano il campione;
- una serie di sensori (fotodiodi e/o fotomoltiplicatori);
- un computer per l'analisi dei dati in tempo reale;
- un sistema di sorting per separare le cellule in base ai valori delle misure effettuate.

Le cellule vengono preventivamente colorate con fluorocromi, sostanze che emettono una particolare fluorescenza quando investite dalla luce coerente del laser. L'analisi si basa sulla valutazione della luce emessa dalle cellule in esame una volta che incrociano il raggio laser (schema di illuminazione ortogonale). La fluorescenza viene acquisita ed amplificata da fotodiodi o fotomoltiplicatori, quindi analizzata in tempo reale da un software in grado di ottimizzare il segnale in uscita e di renderlo interpretabile.

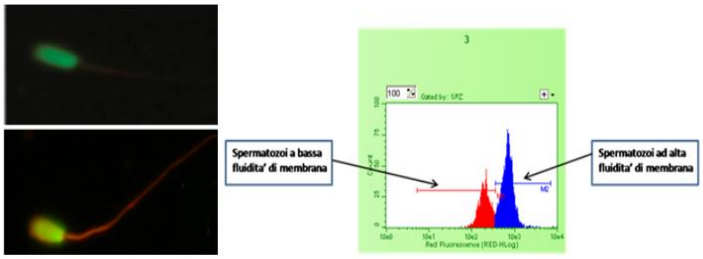


✓ *Danno mitocondriale* - Gli spermatozoi sono capaci, a livello mitocondriale, di generare energia in maniera autonoma attraverso la produzione di ATP mediante la via metabolica aerobica o anaerobica. Questa energia, prodotta dai mitocondri situati nel segmento intermedio della coda, viene utilizzata in maniera preponderante dallo spermatozoo per il mantenimento della motilità. Pertanto, la valutazione della funzionalità mitocondriale fornisce dati relativi allo stato metabolico della cellula



Ad oggi, le tecniche più avanzate di analisi basate sulla citofluorimetria a flusso consento di stabilire l'eventuale danno a carico dell'attività mitocondriale tramite colorazione differenziale delle cellule e dei suoi comparti.

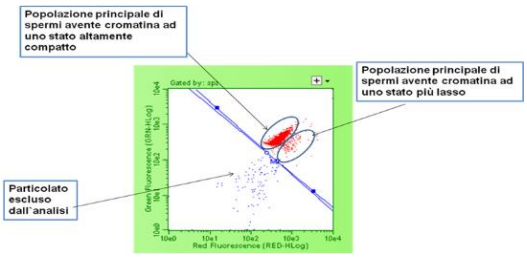
✓ *Disordini fosfolipidici associati alla membrana* - Gli spermatozoi eiaculati vanno incontro a cambiamenti nell'architettura della membrana e del loro metabolismo solitamente conosciuti con il termine di capacitazione. Normalmente questo processo avviene nel tratto genitale femminile affinché il gamete maschile si possa legare alla zona pellucida della cellula uovo, ma la capacitazione può essere provocata anche da manipolazioni del materiale seminale quali il congelamento.



A tal fine, lo studio accurato dell'architettura lipidica della membrana, che comprende il rilievo di eventuali alterazioni della stabilità dei fosfolipidi ancor meglio se tramite metodi innovativi come la citometria a flusso e marcatura con specifici florocromi risulta essere di estrema importanza al fine di ottenere un dato che possa spiegare situazioni altrimenti non definibili.

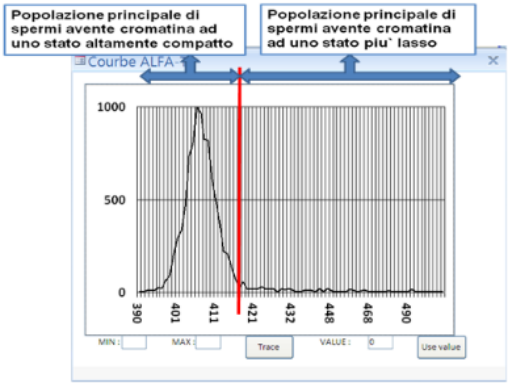
✓ *Stato della cromatina spermatica* - La cellula germinale maschile non può essere considerata solo come "*corriere*" delle informazioni genetiche contenute nel genoma paterno ma anche come portatore di informazioni epigenetiche molto importanti per lo sviluppo embrionale.

È interessante notare come spermatozoi affetti da questa tipologia di danneggiamento, pur inducendo un arresto precoce dello sviluppo embrionale, possano apparire normali per quanto concerne i parametri seminologici standard.



Ad oggi esistono diversi approcci per la rilevazione di alterazioni a carico della cromatina che spaziano dalle classiche tecniche citologiche in microscopia alle più avanzate tecnologie basate sulla citofluorimetria a flusso.

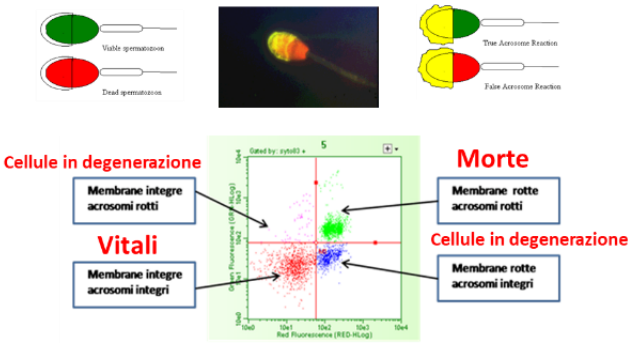
Alcuni dei vantaggi dell'approccio citometrico a flusso utilizzato rispetto ai test basati sulla lettura microscopica, sono il numero di cellule valutate significativamente maggiore e l'analisi oggettiva delle stesse. Su queste basi, la valutazione del parametro DNA fragmentation index (DFI) in cito-fluorimetria rappresenta una valutazione relativamente semplice, informativa e affidabile della qualità dello sperma contribuendo alla stima della fertilità dei riproduttori in modo oggettivo e ripetibile.



✓ *Integrità delle membrane e degli acrosomi* – L'acrosoma trae origine da una grossa cisterna dell'apparato del Golgi ricca di enzimi litici che successivamente va ad incappucciare il nucleo cellulare. Durante la fecondazione, l'unione dello spermatozoo con l'ovocita secondario, innesca la liberazione degli enzimi idrolitici responsabili della digestione della membrana extracellulare dell'oocita, facilitando così l'accesso dello spermatozoo alla membrana plasmatica dell'oocita stesso. Questo processo prende il nome di "reazione acrosomiale" che deve avvenire quando lo spermatozoo è già in prossimità dell'oocita. Una scorretta manipolazione del materiale seminale o una tecnica di crioconservazione dello stesso non ottimizzata potrebbero portare ad una precoce rottura dell'acrosoma e della membrana impedendo allo spermatozoo di penetrare nell'oocita.

La metodica consiste nella colorazione degli spermatozoi con tre fluorocromi differenti.

La tripla colorazione permette la valutazione simultanea dell'integrità sia della membrana plasmatica che dell'acrosoma.



Tecniche di fecondazione in vitro

Le tecniche di fecondazione in vitro e di coltura di embrioni sono approcci finalizzati allo studio di svariati aspetti legati alla riproduzione. Di notevole interesse, oltre allo studio della fertilità maschile nel senso più ampio del termine, è l'utilizzo di queste tecniche anche per la valutazione funzionale del materiale seminale dopo congelamento/ scongelamento. Grazie ai modelli in vitro è infatti possibile studiare le interazioni tra i due gameti, maschile e femminile, fin dai primissimi istanti in cui avvengono i fenomeni di riconoscimento e fusione da cui origina la prima cellula embrionale denominata zigote. I momenti successivi alla fecondazione, che prevedono lo sviluppo dell'embrione attraverso lo stadio di morula e quindi di blastociste, forniscono importanti informazioni relative ai meccanismi che portano alla nascita di un nuovo individuo e che sono legate alle caratteristiche qualitative dei gameti.

Il Progetto CRIOGERM

Il progetto CRIOGERM ha contribuito all'implementazione di azioni per il sostegno alle attività di conservazione ex situ, tramite conservazione del germoplasma, di cinque razze caprine autoctone lombarde a limitata diffusione, in modo da tutelarne la biodiversità ed il patrimonio genetico in ambito allevatoriale. Pertanto, il contributo sia scientifico che di innovazione si configura nella capacità di sfruttare sinergicamente le competenze del mondo della ricerca e l'enorme bagaglio culturale e di tradizione del comparto allevatoriale locale. In tal modo, il primo ha avuto accesso al materiale biologico a supporto delle proprie attività, sfruttando le più recenti innovazioni tecnologiche, mentre il secondo potrà applicarne i risultati nel modo più incisivo possibile in quanto è costituito dai naturali primi attori delle azioni di difesa/conservazione e valorizzazione delle proprie risorse genetiche.

Scopo

Sulla base delle premesse poste nell'identificazione del "fabbisogno di azioni relative alla conservazione/valorizzazione delle risorse genetiche" di razze a rischio d'estinzione, il progetto ha sviluppato specifiche azioni che, partendo dal grande patrimonio di informazioni già in possesso di ASSONAPA, si sono concretizzate nella creazione di una criobanca di germoplasma a salvaguardia della genetica delle cinque razze autoctone identificate quali: Orobica o di Val Gerola, Bionda dell'Adamello, Frisa Valtellinese, Verzaschese o Nera di Verzasca e Lariana o di Livo.

Obiettivi

Partendo dalla considerazione che la valorizzazione e la tutela delle razze autoctone debba partire dalla valutazione zoognostica per arrivare all'applicazione delle più innovative soluzioni nell'ambito della conservazione del loro patrimonio genetico, gli obiettivi del progetto sono di seguito sintetizzati:

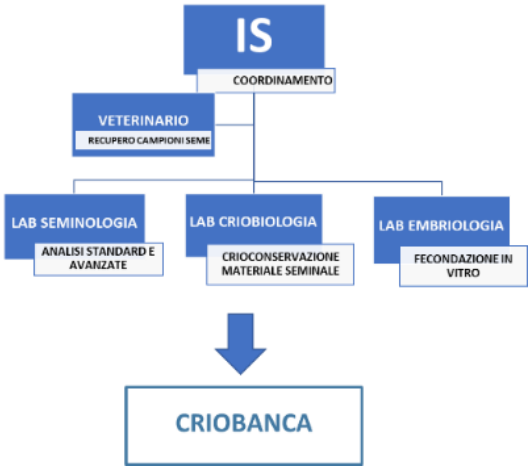
- valorizzare le preziose informazioni e i dati già in possesso di ASSONAPA specificatamente finalizzati alla valutazione del rischio dovuto alla consanguineità e depressione da inbreeding, attraverso azioni con ricadute pratiche sulle razze e territori identificati;
- implementare una serie di azioni finalizzate alla raccolta, stoccaggio e conservazione di materiale seminale attraverso un approccio che integri le competenze dell'Istituto Spallanzani, in materia di crioconservazione del materiale seminale negli animali d'interesse zootecnico, con i risultati delle proprie ricerche finalizzate all'ottimizzazione dei protocolli anche per soggetti problematici ma di grande interesse genetico ai fini della conservazione della razza;
- gestire in modalità integrata i dati fenotipici, genotipici e fisiologici dei riproduttori.

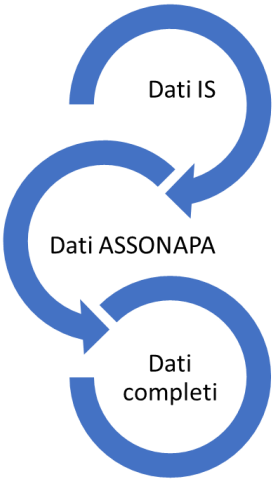
Descrizione del progetto

L'approccio metodologico ha previsto la realizzazione di tre azioni strettamente collegate tra loro.

Azione 1 Attraverso i dati in possesso di ASSONAPA sono stati identificati i maschi riproduttori su cui effettuare i campionamenti del materiale seminale, gli allevamenti disponibili ove presenti tali riproduttori e il supporto tecnico finalizzato alla realizzazione delle attività di campionamento in campo.

Azione 2. L'azione ha previsto la raccolta, la criconservazione e la caratterizzazione qualitativa del materiale seminale tramite strumentazioni automatiche avanzate e tramite tecniche di fecondazione in vitro finalizzate alla verifica/monitoraggio della funzionalità e fertilità degli spermatozoi crioconservati.





Azione 3 L'azione ha previsto la raccolta dei dati emersi nelle precedenti azioni e la loro organizzazione in un apposito database al fine di rendere i risultati ottenuti nell'ottica di una efficiente gestione delle risorse genetiche.

L'operatività

Azione 1

Scelta dei riproduttori

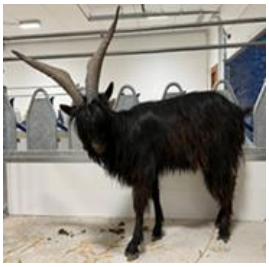
Nell'ambito della scelta dei riproduttori, effettuata da ASSONAPA, è stato dato massimo rilievo ai soggetti geneticamente idonei alla salvaguardia della razza (livello di inbreeding) ma sono stati valutati e stoccati anche tutti i soggetti che potranno in futuro servire in caso di estinzione della razza stessa. Il materiale è stato caratterizzato da un punto di vista della qualità seminale e per ogni becco identificato sono stati crioconservati tutti gli eiaculati raccolti idonei alla crioconservazione.

Valutazione dei maschi riproduttori

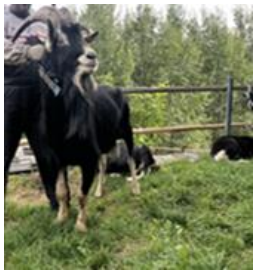
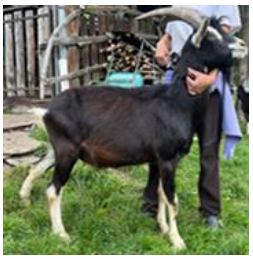
La base di una buona fertilità è di possedere maschi fertili, efficienti e privi di patologie a carico dell'apparato riproduttore. La scelta dei becchi è stata effettuata anche prendendo in considerazione il buono stato di salute, l'accrescimento adeguato, il possesso di caratteri sessuali primari e secondari ben sviluppati: testicoli mobili e scesi nello scroto, prepuzio integro; inoltre, l'erezione deve avvenire senza difficoltà. Tali caratteristiche che fanno riferimento allo stato di salute e riproduttivo sono state valutate dal veterinario incaricato al fine di verificare la reale potenzialità riproduttiva dei capi, ed in particolare dei soggetti identificati da ASSONAPA come più promettenti per gli obiettivi di salvaguardia della razza privilegiando i maschi meno consanguinei con patrimonio maggiore di biodiversità.

Riproduttori testati

Orobica o di Val Gerola

ID becco :1	ID becco :2	 ID becco :3	ID becco :4
ID becco :5	ID becco :6	ID becco :7	

Frisa Valtellinese

 ID becco :8	ID becco :9	ID becco :10	ID becco 11
ID becco :12	ID becco :13	ID becco :14	 ID becco :15

Bionda dell'Adamello

ID becco :16	ID becco :17	ID becco :18

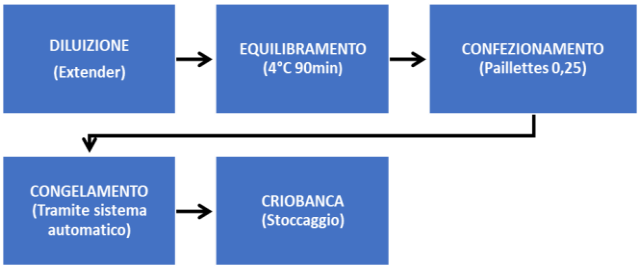
Verzaschese o Nera di Verzasca		*Lariana o di Livo*
ID becco :19	ID becco :20	ID becco :21

Azione 2

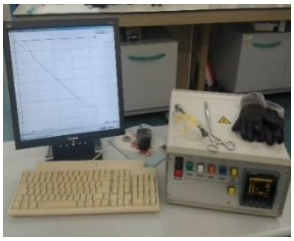
Prelievo del materiale seminale

I maschi sono stati sottoposti ad una prima sessione di prelievo in presenza di femmine in calore per abituarli sia alla vagina artificiale che alla presenza dell'operatore. Le femmine utilizzate per i successivi prelievi sono state preparate con un protocollo standard per l'induzione dell'estro. Il prelievo è stato effettuato tramite vagina artificiale preparata con acqua calda a una temperatura di circa 40°C. Alla porzione terminale della vagina è stato inserito un cono di gomma sul quale veniva posizionata una provetta di vetro graduata per la raccolta dell'eiaculato. La porzione terminale, per evitare shock termici all'eiaculato, è stata protetta con una camicia isolante. L'eiaculato ottenuto, valutato per volume colore e aspetto, e stato tamponato con extender da conservazione Ovixcell (IMV Technologies) alla stessa temperatura e trasportato presso il laboratorio ad una temperatura di 4°C tramite l'utilizzo di un frigo-termostato da trasporto.

Costituzione della criobanca



- ✓ *Diluizione* – All'eiaculato precedentemente diluito e raffreddato a 4°C viene aggiunto extender con crioprotettivo OVIXCELL (IMV) nella quantità necessaria per raggiungere una concentrazione ottimale di spermatozoi nelle paillettes.
- ✓ *Equilibramento* - L'eiaculato precedentemente diluito e raffreddato a 4°C viene equilibrato a questa temperatura per ulteriori 2-4 ore. Durante l'equilibramento, gli spermatozoi si adattano ad un metabolismo ridotto e i crioprotettori (principalmente glicerolo) entrano nelle cellule, raggiungendo di conseguenza uno stato di equilibrio tra le concentrazioni intracellulari ed extracellulari.
- ✓ *Confezionamento* - Il confezionamento è stato effettuato in paillettes da 0,25 mL .



- ✓ *Congelamento* - Tramite sistema automatico le paillettes di materiale seminale, dopo la loro immissione nella camera di congelamento, sono state congelate seguendo la curva di discesa specifica per il seme caprino.

- ✓ *Tracciabilità* - Per la criobanca è stato allestito un contenitore ad hoc dotato di mappa di tracciabilità dedicata al progetto. Le paillettes prodotte sono state divise per razza e riproduttore. Di seguito viene riportata la mappa di tracciabilità associata al tank utilizzato

- ✓ *Scongelamento* – Le paillettes prodotte sono state scongelate per immersione in acqua a 37°C per 1 minuto.

Le analisi

- ✓ *Motilità* - Per ogni campione di materiale seminale scongelato ed incubato in bagno termostatato a 37° per 14 minuti, due aliquote da 10µL si seme vengono adagiate su 2 diverse camere di Makler poste sul tavolino riscaldato del sistema CASA. Per ciascuna camera di Makler, tramite microscopio dotato di obiettivo 10x a contrasto di fase negativo, venivano analizzati un minimo di 2 campi microscopici ed un minimo di 100 spermatozoi. Il sistema CASA IVOS II ha permesso di determinate: la motilità totale (**MT**), la motilità Progressiva (**MP**) e la velocità media di spostamento (**VM**).

- ✓ *Concentrazione e Integrità di membrana* - Il parametro concentrazione (**CONC***)* è stato determinato tramite l'utilizzo del NucleoCounter SP100. In particolare, due aliquote di seme vengono diluite in soluzione lisante S100 Da ogni provetta con materiale seminale diluito, il campione viene aspirato tramite apposita cassetta SP1 ed effettuata la lettura. Per la determinazione dell'integrità di membrana (**IM**), due aliquote di seme vengono diluite in provette con Reagent Buffer. Da ogni provetta con materiale seminale diluito, il campione viene aspirato nell'apposita cassetta SP1. Al contrario del protocollo utilizzato per la determinazione della concentrazione, il Reagent Buffer utilizzato per la diluizione non altera le membrane degli spermatozoi. Pertanto, al passaggio del campione all'interno della cassetta, solo gli spermatozoi colorati con lo ioduro di propidio quindi con membrana plasmatica non integra, verranno contati. Lo strumento riporta il numero di spermatozoi non integri presenti nel campione iniziale espresso come milioni per mL. Sottraendo il numero di spermatozoi con membrana non integra al numero totale di spermatozoi si calcola l'integrità di membrana che è espressa come percentuale di spermatozoi con membrana integra sul totale di cellule nel campione.

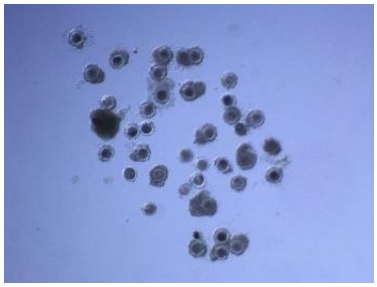
- ✓ *Danno mitocondriale* – È stata effettuata utilizzando il Kit Mitochondrial Activity EasyKit 2 (IMV Technologies) aggiungendo ad ogni pozzetto 10µL di etanolo e 190 µL di PBS per risospendere il colorante liofilizzato già presente nel pozzetto d'analisi. Per ogni pozzetto, così preparato, e stata aggiunta un'aliquota di seme ad una concentrazione di circa 50.000 cellule per mL. La lettura è stata effettuata dopo un'incubazione a 37°C per 30 minuti su due diversi pozzetti per campione tramite citofluorimetro EasyCite appositamente settato.

✓ *Disordini fosfolipidici associati alla membrana* - È stata preparata la soluzione madre (10X) di Merocianina 540 (Invitrogen, M24571, MW 569.67g/M soluzione finale 2.7µM) sciogliendo 25mg di colorante in 8.0 ml di DMSO, aliquotata e stoccata a -20°C. Al momento dell'uso, viene diluita in un rapporto 1:10 in DMSO. Sono state allestite aliquote di SYBR-14 (Live Dead Sperm Viability KIT L7011 Invitrogen) a -20°C. Al momento dell'uso, il colorante viene diluito in rapporto 1:50 in Easy Buffer Bovine (EBB). 100µl di seme alla concentrazione di 50 Mil/ml vengono lavati (1700 rpm per 5 min) e risospesi in EBB quindi viene allestita una piastra 96 pozzetti contenente, per ciascun pozzetto, 196 µl EBB, 2 µl di SYBR-14 e 1 µl di seme lavato. Dopo incubazione a 37°C per 10 minuti, viene aggiunto 1 µl di Merocianina 540 e si esegue immediatamente la lettura acquisendo un totale di 5000 eventi.

✓ *Stato della cromatina spermatica* - Le aliquote dedicate all'analisi sono state poste in provette da 2mL scure per evitare il contatto con la luce e mantenute ad una temperatura di 4°C. Ogni aliquota venina inoltre diluita ad una concentrazione di 5 x10 ^{6} spermatozoi / ml con TNE tampone per un volume totale di 200 µL. Immediatamente venivano aggiunti 400 µL di soluzione detergente e 1,2 mL di soluzione colorante arancio di acridina Dopo l'aggiunta della soluzione colorante, e un incubazione di 2 minuti a temperatura ambiente, il campione è stato fatto passare attraverso il citofluorimetro a flusso Easycyte (Guava) con una capacità di analisi di 5000 eventi misurati.

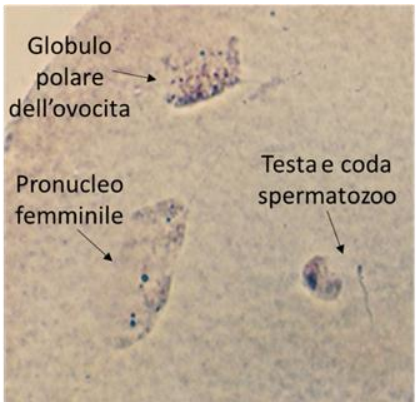
✓ *Integrità delle membrane e degli acrosomi* - L'analisi è stata effettuata utilizzando il Kit Viability and Acrosome Integrity EasyKit 5 (IMV Technologies) aggiungendo ad ogni pozzetto 200µL di EHS per risospendere i coloranti liofilizzato già presente nel pozzetto d'analisi. Per ogni pozzetto, così preparato, e stata aggiunta un'aliquota di seme ad una concentrazione di circa 40.000 cellule per mL. La lettura è stata effettuata dopo un'incubazione a 37°C per 45 minuti su due diversi pozzetti per campione tramite citofluorimetro EasyCite appositamente settato

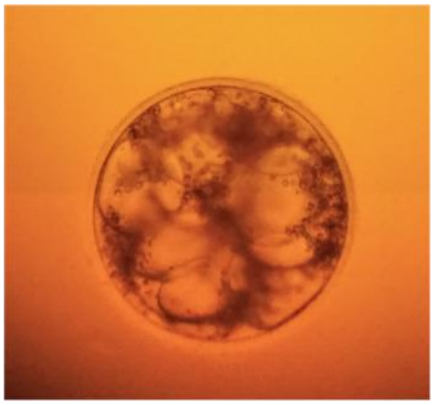
✓ *Raccolta e maturazione degli ovociti* - Le ovaie di capre prevalentemente di razza Saanen sono state raccolte alternativamente presso due macelli situati nei comuni di Mozzanica (BG) e Arzago (BG) e trasportate presso l'Istituto entro tre ore a temperatura ambiente in soluzione salina addizionata con antibiotici (100 IU/ml penicillina-0.1 mg/ml streptomicina). All'arrivo, per ridurre la carica batterica le ovaie venivano lavate per tre volte in successive piastre Petri contenenti la stessa soluzione e da questo momento, tutte le procedure venivano condotte in ambiente sterile utilizzando una cappa a flusso laminare.



Dato il numero ridotto di ovaie disponibili presso i macelli, di piccole dimensioni, gli ovociti venivano recuperati utilizzando il metodo dello "slicing" in capsule Petri contenenti medium per flushing embrionale, praticando incisioni sulla superficie delle ovaie tramite bisturi e selezionando allo stereomicroscopio gli ovociti fuoriusciti dai follicoli. Tale metodo, infatti, consente di raccogliere un numero maggiore di ovociti rispetto al metodo dell'aspirazione di singoli follicoli. I complessi ovocita-cumulo ooforo (vedi Figura) venivano, quindi, maturati per 24 ore in gruppi all'interno dei pozzetti di un 4-wells contenenti 500 µl di medium di maturazione (bicarbonate-buffered TCM199, 10% FCS, FSH/LH 0.05 U.I./ml, "Insulin, Transferrin, Sodium-selenite supplement" e antibiotici) in incubatore a 38,5 °C in 5% CO_2 e atmosfera satura di H_2O.

Fecondazione in vitro e colture degli embrioni - al momento dell'uso, al fine di ridurre al minimo l'utilizzo delle dosi stoccate nella criobanca, una singola paillette di seme veniva scongelato in bagnetto termostatico a 37°C per 5 minuti. Una aliquota da 100µl veniva immediatamente utilizzata per le prove di fecondazione, mentre il volume restante era utilizzato per effettuare ulteriori prove in citoflorimetria. Per la verifica del potere fecondante che fosse il più possibile rappresentativo di una dose utilizzabile in futuro in FA, il materiale seminale veniva risospeso in 1 ml di medium TALP (hepes buffered) privo di ioni calcio e magnesio e lavato tramite blanda centrifugazione per 5 minuti a 500 g per rimuovere il crioprotettore. Gli ovociti maturi, parzialmente decumulati tramite pipettaggio, venivano posti in fecondazione in 450 µl di IVF TALP medium contenente 10 µg/ml heparin come agente capacitante, additivato con D-penicillamine, hypotaurine ed epinephrine. La sospensione di spermatozoi veniva, quindi, aggiunta agli ovociti (tre gruppi per becco) per raggiungere un rapporto di circa 6000 spermatozoi/ovocita e co-incubati in 5% CO2 in atmosfera umidificata a 38.5 °C (giorno 0). Dopo circa 18 ore di incubazione con gli spermatozoi, gli ovociti venivano meccanicamente denudati tramite vortex per rimuovere le cellule della granulosa e gli spermatozoi adesi alla zona pellucida e trasferiti in gocce da 20µl di medium di coltura (SOF) ricoperte da olio minerale in incubatore al 5% CO2 e 5% O2 a 38,5 °C, in gruppi di circa 20 ovociti per goccia. Il giorno 4 di coltura 50% di medium SOF veniva rinnovato, il giorno 6 metà del medium SOF veniva sostituito con medium M199 contenente BSA (fatty acid free) e nei giorni seguenti (7 e 8) venivano valutate le blastocisti per quanto riguarda i parametri morfologici. Durante la fase di messa a punto delle condizioni generali di lavoro, un numero variabile di questi ovociti veniva prelevato per la verifica dell'avvenuta penetrazione degli spermatozoi (fecondazione) all'interno dell'ovocita tramite fissazione e colorazione degli stessi. In breve, in questa fase gli ovociti venivano trasferiti su un vetrino, premuti leggermente tramite un copri oggetto sui cui bordi erano predisposte due strisce longitudinali di paraffina per creare l'idoneo spessore. I vetrini erano, quindi, immersi in una soluzione di acido-acetico/etanolo 3:1 e fissati per una notte. Il giorno seguente i vetrini venivano colorati per capillarità tramite una soluzione di lacmoide per evidenziare al microscopio la presenza del pronucleo femminile e del globulo polare (corretta maturazione dell'ovocita) ed avvenuta penetrazione dello spermatozoo evidenziabile dalla presenza di un pronucleo maschile (decondensazione del DNA) e della coda.





Diversamente dalla verifica dell'avvenuta fecondazione tramite fissazione e colorazione degli ovociti, per le prove effettuate utilizzando il materiale seminale presente nella criobanca il giorno di coltura successivo alla fecondazione gli ovociti non divisi venivano separati da quelli divisi (cleavage, prima segmentazione-stadio a due cellule) e gli embrioni monitorati e valutati fino al raggiungimento dello stadio di blastociste.

Azione 3

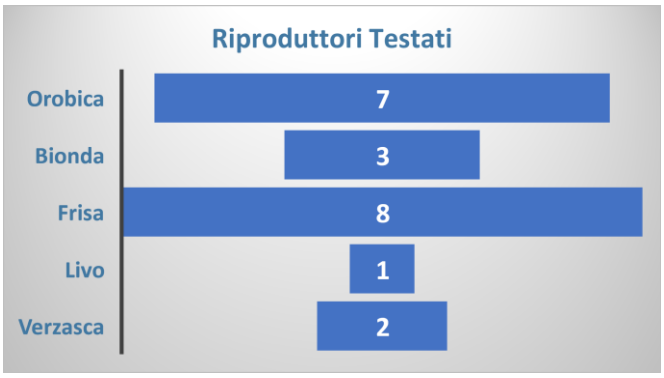
L'approccio proposto per la realizzazione di questa azione parte dal presupposto che una corretta politica di conservazione delle risorse genetiche, necessiti di un utilizzo strutturato delle relative informazioni.
Dal punto di vista operativo, i dati ricavati dal progetto sono stati condivisi con ASSONAPA, affinché possano essere implementati i dati in loro possesso.

Risultati ottenuti

Azione 1

Tramite la verifica dei dati in possesso di ASSONAPA, ha permesso di individuare gli allevamenti con i relativi riproduttori da sottoporre alla fase di valutazione, prelievo e crioconservazione del materiale seminale.

Dieci allevamenti delle diverse razze individuate, sono stati visitati almeno due volte al fine di verificare i riproduttori e di instaurare un contatto con gli allevatori spiegando le finalità dell'attività progettuale.



Ventuno riproduttori valutati come idonei (di seguito riportati) sono stati testati da un punto di vista dell'accettazione del veterinario e alla facilità al salto. Complessivamente non sono stati evidenziati problemi di tipo riproduttivo maschile associabili con un eccessivo aumento della consanguineità.

Azione 2

Costituzione della criobanca

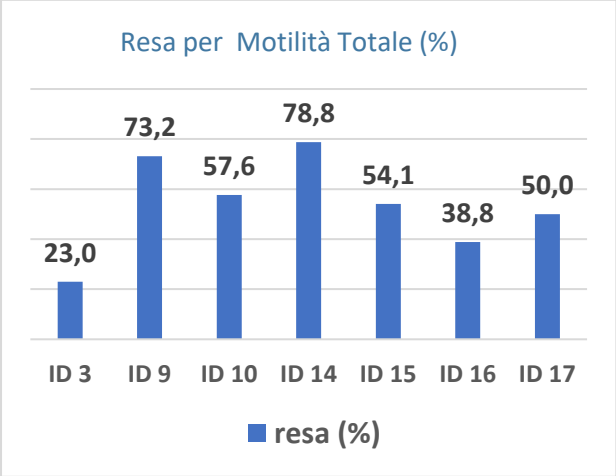
Il protocollo utilizzato per la crioconservazione del seme caprino è risultato adeguato, la curva di congelamento impostata a garanzia di una corretta della temperatura di raffreddamento/congelamento si è rivelata ottimale massimizzando così la vitalità degli spermatozoi dopo la crioconservazione.

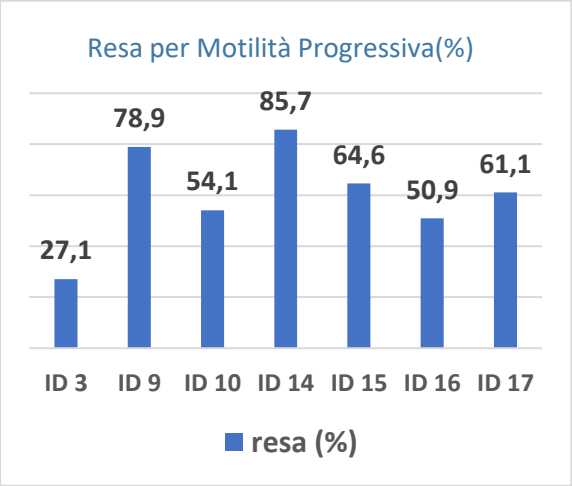
Di seguito vengono riportati i dati ottenuti sul materiale seminale crioconservato espressi come percentuale di resa al congelamento. La percentuale di resa è stata determinata dal confronto dei parametri standard prima e dopo congelamento.

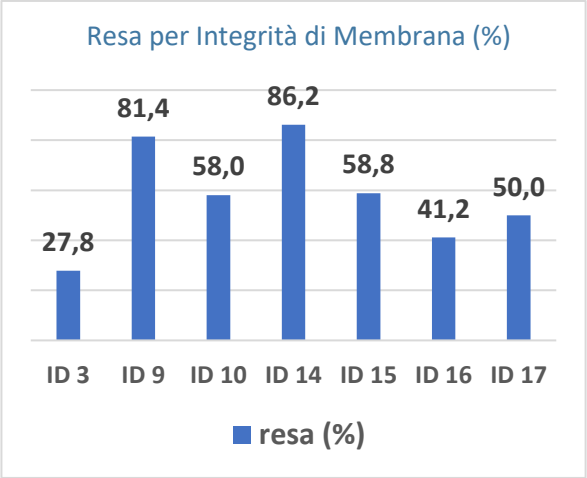
Nella tabella sottostante sono riportate le percentuali di resa allo scongelamento divise per riproduttore.

BECCO	RESA (%)		
	MT	MP	IM
ID 3	23,0	27,1	27,8
ID 9	73,2	78,9	81,4
ID 10	57,6	54,1	58,0
ID 14	78,8	85,7	86,2
ID 15	54,1	64,6	58,8
ID 16	38,8	50,9	41,2
ID 17	50,0	61,1	50,0

Nei grafici sottostanti vengono riportate le rese allo scongelamento divise per parametro e riproduttore.



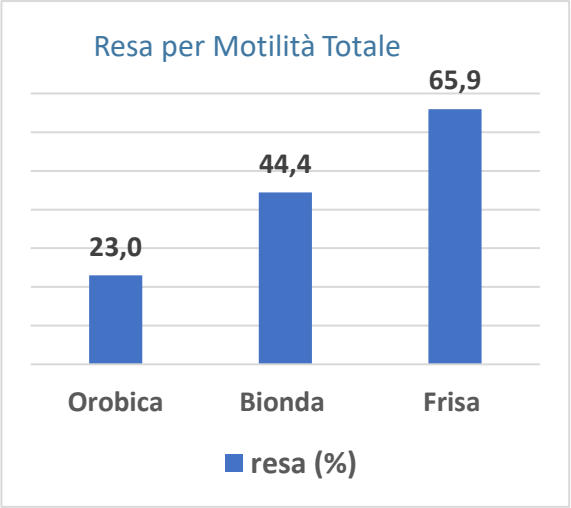


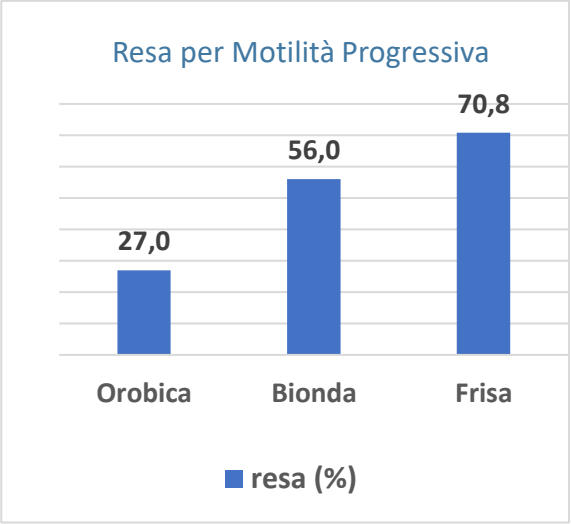


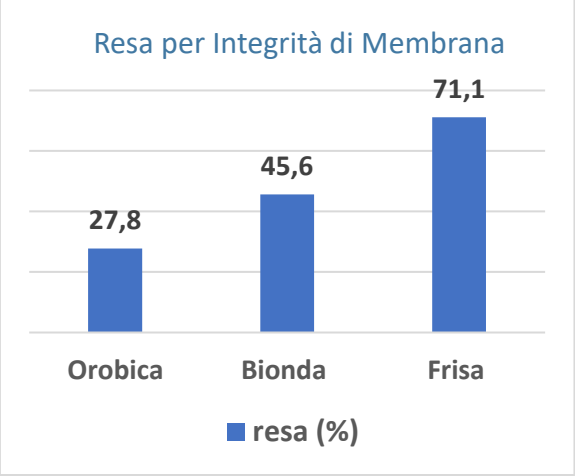
Resa allo scongelamento divisa per razza determinata dal confronto dei parametri medi standard prima e dopo congelamento espressa in percentuale.

Razza	RESA (%)		
	MT	MP	IM
Orobica	23,0	27,0	27,8
Bionda dell'Adamello	44,4	56,0	45,6
Frisa	65,9	70,8	71,1

Nei grafici sottostanti vengono riportate le rese medie allo scongelamento divise per parametro e razza.

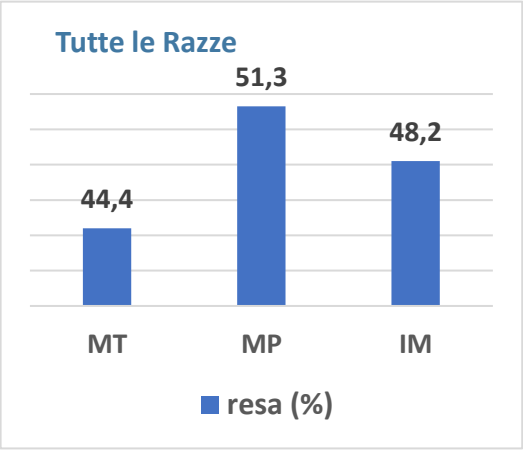




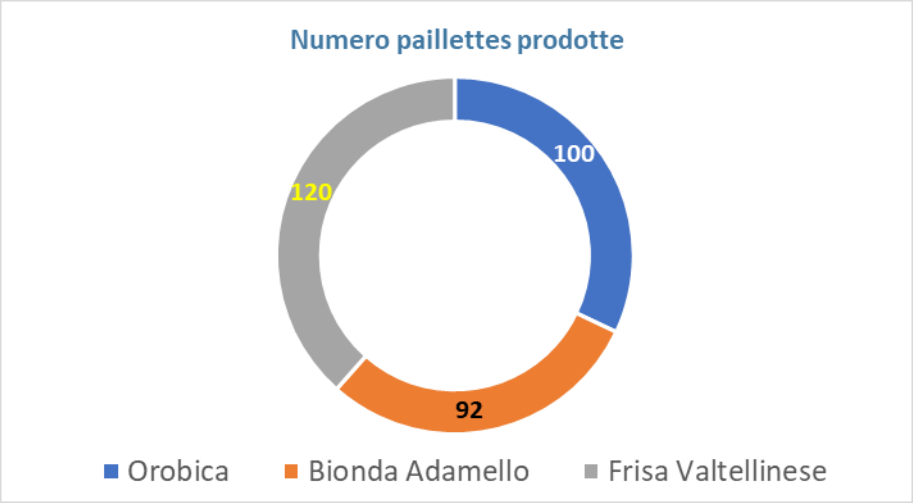


Nella tabella sottostante viene riportata la resa media al congelamento dei parametri standard prima e dopo crio-conservazione espressa in percentuale.

Tutte le razze	RESA (%)		
	MT	MP	IM
	44,4	51,3	48,2



Le paillettes prodotte dagli eiaculati raccolti sono state 312 così suddivise: 100 per la razza orobica appartenenti ad un unico riproduttore, 92 di razza Bionda dell'Adamello appartenenti a due riproduttori e 120 di razza Frisa Valtellinese appartenenti a 4 riproduttori. Per le razze Nera di Verzasca (2 riproduttori) e Lariana o di Livo (1 riproduttore) non si è ottenuto alcun eiaculato.

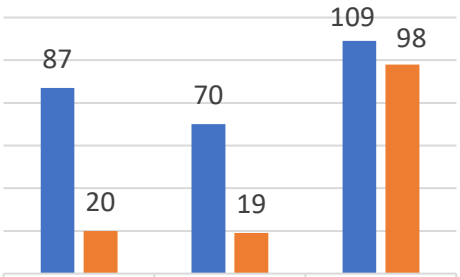


Le analisi

I risultati ottenuti, seppur su un numero limitato di soggetti, consentono una valutazione positiva della tecnica di raccolta e crioconservazione del materiale seminale di becco.

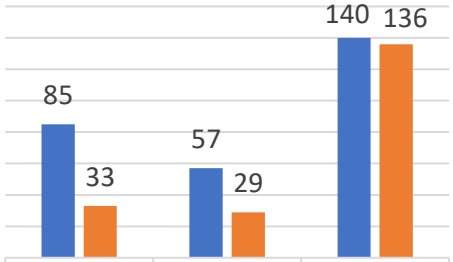
✓ *Motilità* - Complessivamente il materiale seminale raccolto relativo ai prelievi destinati alla creazione della criobanca è risultato di buona qualità con una motilità totale media pari all'78%, una motilità progressiva al 61% per il seme fresco e una motilità totale pari al 42% e una motilità progressiva 37% per il seme post congelamento.

ID 3 Orobica



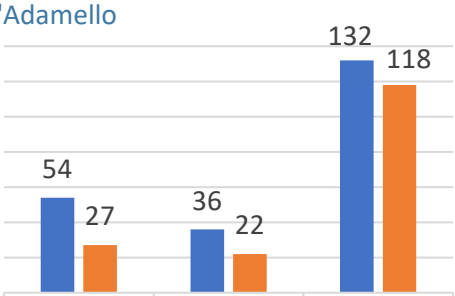
	MT %	MP %	VM um/sec
PRE-CONGELAMENTO	87	70	109
POST-CONGELAMENTO	20	19	98

ID 16 Bionda dell'Adamello



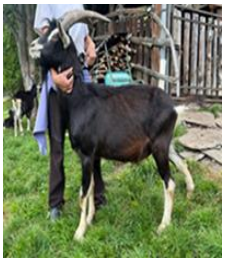
	MT %	MP %	VM um/sec
PRE-CONGELAMENTO	85	57	140
POST-CONGELAMENTO	33	29	136

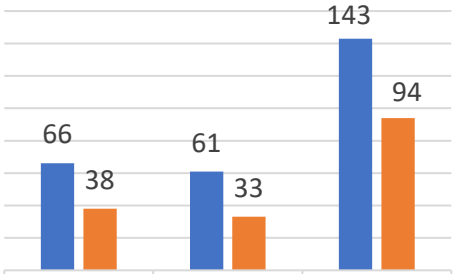
ID 17 Bionda dell'Adamello



	MT %	MP %	VM um/sec
PRE-CONGELAMENTO	54	36	132
POST-CONGELAMENTO	27	22	118

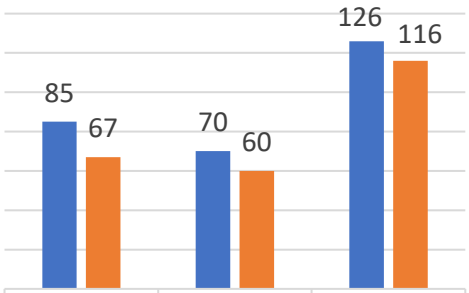
ID 10 Frisa Valtellinese





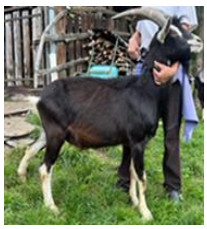
	MT %	MP %	VM um/sec
PRE-CONGELAMENTO	66	61	143
POST-CONGELAMENTO	38	33	94

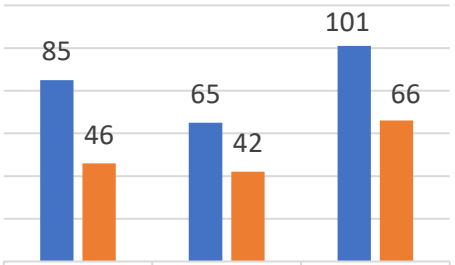
ID 14 Frisa Valtellinese



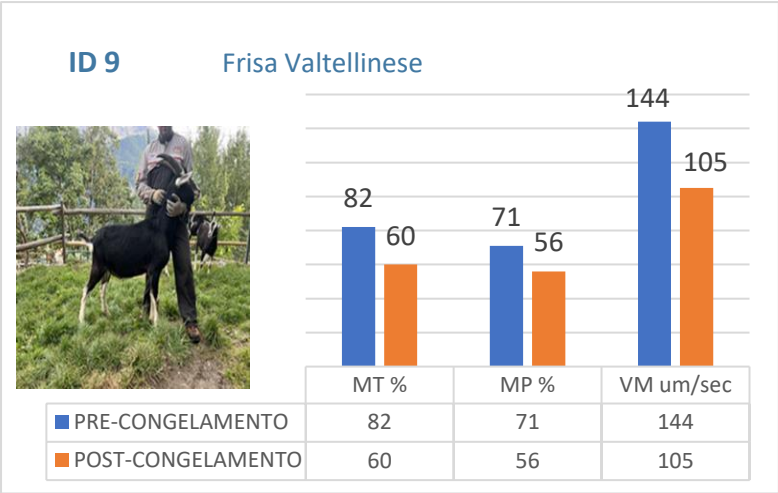
	MT %	MP %	VM um/sec
PRE-CONGELAMENTO	85	70	126
POST-CONGELAMENTO	67	60	116

ID 15 Frisa Valtellinese

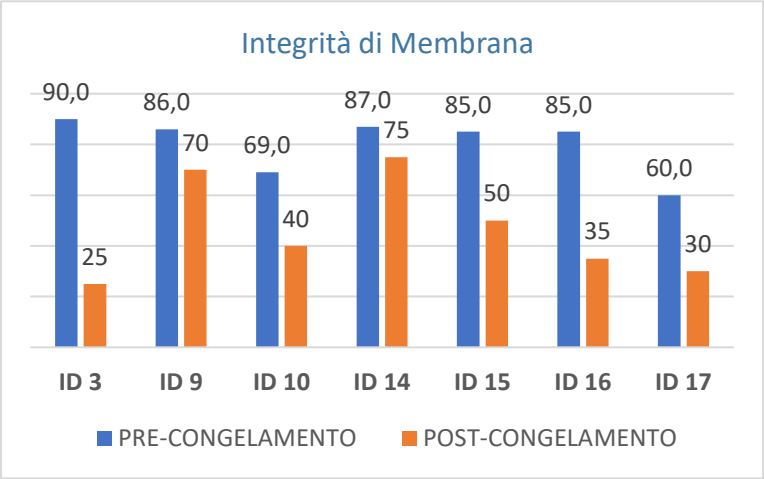




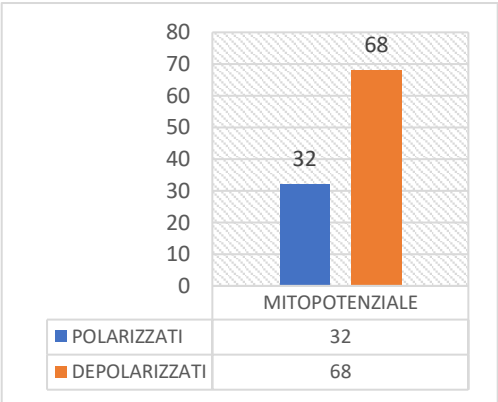
	MT %	MP %	VM um/sec
PRE-CONGELAMENTO	85	65	101
POST-CONGELAMENTO	46	42	66

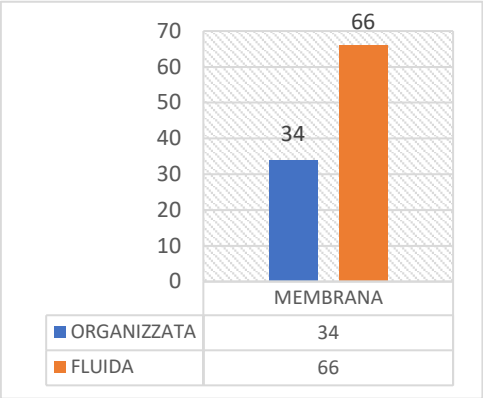


✓ *Concentrazione e integrità di membrana* - I dati medi di volume e concentrazione degli eiaculati testati era rispettivamente di 1,86 mL e di 616,8 milioni di spermi per mL. Mentre per quanto riguarda l'Integrità di membrana il materiale seminale raccolto relativo ai prelievi destinati alla creazione della criobanca è risultato di buona qualità con una integrità di membrana per il seme fresco pari al 80% e per il seme post congelamento del 46%.



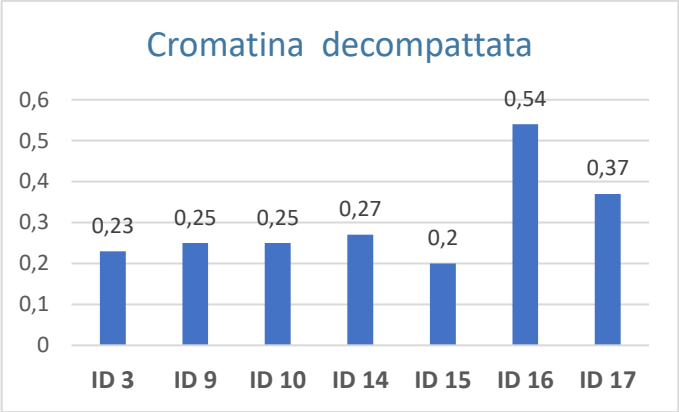
✓ *Danno mitocondriale* - I risultati ottenuti calcolati come media di tutti i lotti di seme congelati/scongelati vengono riassunti nel grafico sottostante.

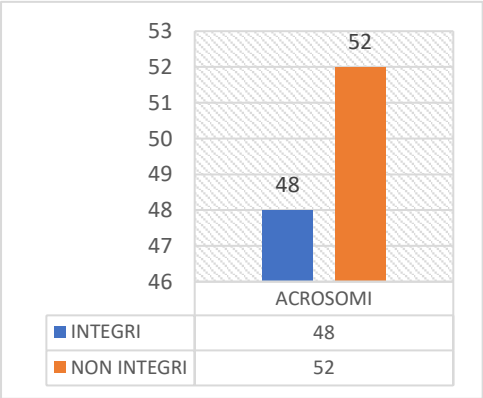




✓ *Disordini fosfolipidici associati alla membrana* - I risultati ottenuti calcolati come media di tutti i lotti di seme congelati/scongelati vengono riassunti nel grafico sottostante.

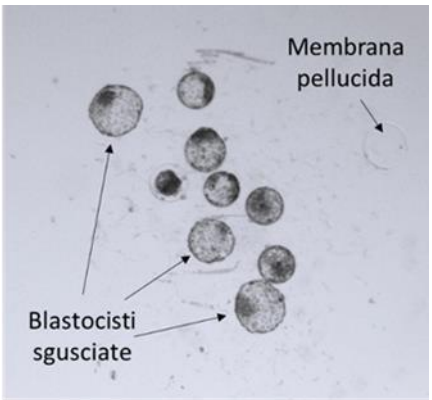
✓ *Stato della cromatina spermatica* - I risultati ottenuti sui singoli riproduttori vengono riassunti nel grafico sottostante.





✓ *Integrità delle membrane e degli acrosomi* – I risultati ottenuti calcolati come media di tutti i lotti di seme congelati/scongelati vengono riassunti nel grafico sottostante.

✓ *Fecondazione in vitro e coltura degli embrioni* - Il materiale seminale presente nella criobanca è stato analizzato anche tramite tecniche di fecondazione in vitro per verificarne il potere fecondante. Le prove sono state condotte utilizzando un totale di 463 ovociti con il risultato, espresso come dato medio per razza, in termini di percentuale di fecondazione e di sviluppo embrionale allo stadio di blastocisti, rispettivamente del 55% e 17% per la razza Frisa, del 37% e 14% per la Bionda e del 34% e 8% per l'Orobica.

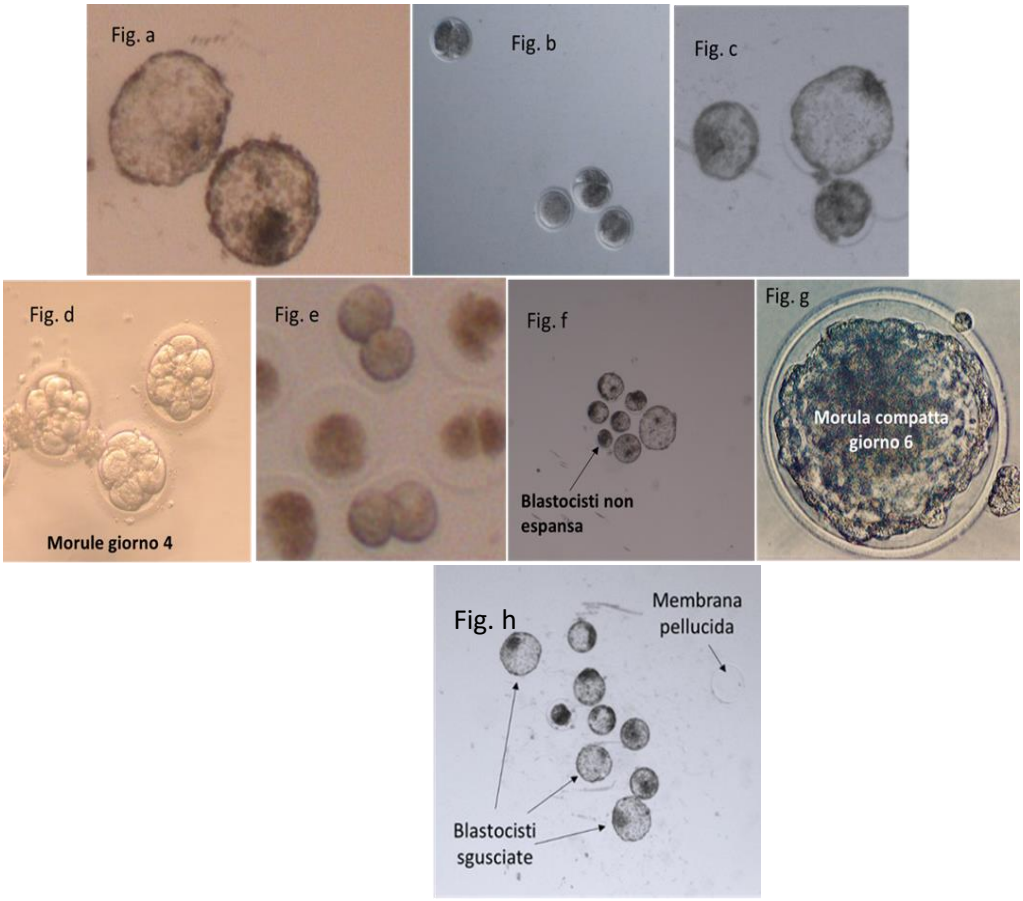


I risultati relativi alle prove di fecondazione in vitro e coltura embrionale (espressi come numero, percentuale e deviazione standard) effettuate utilizzando il materiale seminale appartenente alle tre razze di becchi stoccato nella criobanca sono presentati di seguito. Per ogni campione di seme, la prova è stata effettuata utilizzando tre gruppi di ovociti prelevati al macello ed un rapporto di circa 6000 spermatozoi vitali per ovocita calcolati sulla base dell'analisi della motilità effettuata dopo scongelamento. A titolo descrittivo, nel pannello a seguire (Pannello 1) si riportano alcune immagini riprese allo stereomicroscopio/microscopio ottico (400X) che mostrano per ogni becco testato una fase del ciclo di sviluppo embrionale monitorato (Fig. a-h).

Becco	Ovociti N°	Fertilizzazione Cleavage-morule N°(%±SD)	Blastocisti espanse/cleaved N°(%±SD)
ID 3	61	21 (34,3 ± 1,7)	2 (8,3 ± 14,4) (Fig. a)
ID 9	72	33 (45,9 ± 11,4)	6 (17,9 ± 6,8) (Fig. f)
ID 10	58	32 (56,9 ± 16,1) (Fig. e)	4 (13,2 ± 7,8)
ID 14	78	39 (49,8 ± 9,6) (Fig. d)	5 (12,6 ± 2,7)
ID 15	66	40 (60,8 ± 5,3) (Fig. g)	9 (22,7 ± 8,2) (Fig. h)
ID 16	66	25 (37,9 ± 9,2) (Fig. b)	3 (10,4 ± 10,0)
ID 17	62	22 (35,7 ± 8,1)	3 (14,8 ± 17,0) (Fig. c)

.

PANNELLO 1



Nel complesso, il materiale seminale congelato presente nella criobanca è stato testato dimostrando la capacità di fecondare ovociti e di sostenerne lo sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti.

Azione 3

È stato strutturato un database contenente le anagrafiche e la valutazione riproduttiva e seminale dei riproduttori testati e gestiti nell'ambito del progetto. Il database è stato quindi inviato ad ASSONAPA per la sua gestione integrata con i dati in loro possesso.

Il Progetto in sintesi

Il progetto della durata di due anni e concluso nel 2023 ha affrontato la rilevante tematica della biodiversità rivolta alle specie caprine autoctone Lombarde. In particolare, gli allevatori delle razze Bionda dell'Adamello, Orobica (o di Valgerola), Frisa Valtellinese, Verzaschese (o Nera di Verzasca) e Lariana (o di Livo) sono stati parte attiva del progetto mettendo a disposizione i loro riproduttori per permettere la creazione di una criobanca di materiale seminale con caratteristiche qualitative accertate e documentate.

Il progetto è stato condotto dall'Istituto Sperimentale Italiano "L. Spallanzani" (IS), con sede a Rivolta d'Adda in provincia di Cremona, quale capofila, in collaborazione con l'Associazione Nazionale della Pastorizia (ASSONAPA) con sede a Roma, in qualità di partner di progetto.

I becchi utilizzati per il prelievo del materiale seminale sono stati ventuno, presso nove allevamenti lombardi: 7 soggetti di razza Orobica, 8 di Frisa Valtellinese, 3 di Bionda dell'Adamello, 1 di Lariana e 2 di Nera di Verzasca.

Prima di procedere al prelievo del seme (eseguito tramite vagina artificiale e presenza di femmine con estro indotto) i becchi sono stati valutati a livello fenotipico ed andrologico.

Per le razze Lariana e Nera di Verzasca non si sono ottenuti eiaculati in quanto i becchi hanno rifiutato il salto in più occasioni. Per le restanti razze, gli eiaculati idonei al congelamento hanno consentito lo stoccaggio di: 100 paillettes di un riproduttore per la razza orobica, 120 paillettes di quattro riproduttori per la Frisa Valtellinese e 90 paillettes di due diversi riproduttori per la Bionda dell'Adamello.

Le analisi del materiale seminale sia fresco che dopo congelamento/scongelamento sono state effettuate tramite strumentazioni automatiche avanzate quali: analizzatore di immagini (sistema CASA IVOSII Hamilton Thorne), contatori automatici di cellule (NucloCounter SP100 Chemometec) camere di congelamento automatiche (MiniDigitCool IMV) dotate di centralina e software dedicato e citofluorimetro a flusso (Guava EasyCyte Luminex).

La qualità del materiale seminale fresco, utilizzato per la creazione della criobanca, presentava le seguenti caratteristiche: motilità totale media pari al 78%, motilità progressiva media pari al 61% e integrità di membrana media pari al 80%.

La qualità del materiale post scongelamento presentava complessivamente una buona percentuale di resa al congelamento, calcolata come rapporto tra i dati del seme congelato rispetto al fresco, con i seguenti valori: per la motilità totale del 44%, per la progressiva del 51% e per l'integrità di membrana del 48%. I risultati di resa calcolati per razza hanno mostrato differenze: per la razza Frisa Valtellinese la resa al congelamento era del 66% per la motilità totale, del 71% per la motilità progressiva e del 71% per l'integrità di membrana; per la Bionda dell'Adamello la resa al congelamento era del 44% per la motilità totale, del 56% per la motilità progressiva e del 46% per l'integrità di membrana; per l'Orobica la resa al congelamento era del 23% per la motilità totale, del 27% per la motilità progressiva e del 28% per l'integrità di membrana.

Il materiale seminale presente nella criobanca è stato analizzato anche tramite tecniche di fecondazione in vitro per verificarne il potere fecondante. Le prove sono state condotte utilizzando un totale di 463 ovociti con il risultato,

espresso come dato medio per razza, in termini di percentuale di fecondazione e di sviluppo embrionale allo stadio di blastocisti, rispettivamente del 55% e 17% per la razza Frisa, del 37% e 14% per la Bionda e del 34% e 8% per l'Orobica. Nel complesso, quindi, tutto il materiale seminale ha dimostrato la capacità di fecondare ovociti e di sostenerne lo sviluppo embrionale.

I risultati ottenuti in termini di valutazione andrologica dei maschi, di seme congelato prodotto e di qualità dello stesso sono stati organizzati in un database condiviso con ASSONAPA. Sono state inoltre sviluppate delle linee guida per l'utilizzo del seme congelato della criobanca.

In sintesi, il progetto ha dato un contributo concreto alla salvaguardia delle piccole popolazioni caprine a rischio di estinzione, pur nella consapevolezza che la salvaguardia della biodiversità e il contrasto all'estinzione di piccole popolazioni di animali domestici di grande interesse per la conservazione della tipicità dei prodotti e la salvaguardia culturale e naturalistica dell'ambiente non possono che essere un processo continuativo nel tempo, andando ad individuare e preservare il germoplasma degli animali allevati di possibile futuro interesse.

Bibliografia consultata

- Alcay S, Ustuner B, Aktar A, Mulkpinar E, Duman M, Akkasoglu M, Cetinkaya M. (2020). Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders. (2020) Andrologia 52:e13555. https://doi.org/10.1111/and.13555
- Basrur PK and Yadav BR. (1990) Genetic diseases of sheep and goats. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 6(3): 779-802.
- Basrur PK. (1993) Congenital abnormalities of the goat. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 9(1): 183-202.
- Boe-Hansen GB, Christensen P, Vibjerg D, Nielsen MB, Hedeboe AM. (2008) Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. Theriogenology 69(6): 728-736. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.12.004
- Burren A, Neuditschko M, Signer-Hasler H, Frischknecht M, Reber I, Menzi F, Drögemüller C, Flury C. (2016) Genetic diversity analyses reveal first insights into breed-specific selection signatures within Swiss goat breeds. Anim Genet. 47. doi: 10.1111/age.12476
- Charlesworth D and Willis JH. (2009) Fundamental concepts in genetics the genetics of inbreeding depression. Nat Rev Gen. 10(11): 783-796. https://doi.org/10.1038/nrg2664
- Chunrong Lv, Guoquan Wu, Qionghua Hong, Guobo Quan. (2019) Spermatozoa cryopreservation: State of art and future in small ruminants. Biopreser Biobank. 17(2). https://doi.org/10.1089/bio.2018.0113
- de Souza JM, Duffard N, Bertoldo MJ, Locatelli Y, Corbin E, Fatet A, Freitas VJ, Mermillod P. (2013) Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization on the in vitro production of goat embryos. Anim Reprod Sci. 138(1-2): 82-89. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.012.
- Eiman M-E Aboagla, Terada T. (2003) Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. Biol Reprod. 69(4): 1245-1250. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017889
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. J Androl. 23(1): 25-43. doi: 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x

- Evenson DP. (2022) Sperm chromatin structure assay (SCSA®) for fertility assessment. Current Protocols, 2, e508. doi: 10.1002/cpz1.508
- Gadella BM, Harrison RA. (2000) The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. Development 127(11): 2407-2420. doi: 10.1242/dev.127.11.2407
- Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. (2006) Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. Theriogenology 65(6): 1122-1136. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.07.009
- IMV Technologies: Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) protocol (10/31/2008 version)
- Islam MR, Khandoker MA, Afroz S, Rahman MG, Khan RI. (2007) Qualitative and quantitative analysis of goat ovaries, follicles and oocytes in view of in vitro production of embryos. J Zhejiang Univ Sci B. 8(7): 465-469. doi: 10.1631/jzus.2007.B0465
- Leibo SP and Songsasen N. (2002) Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. Theriogenology 57: 303-326.
- Luo J, Wang W, Sun S. (2019) Research advances in reproduction for dairy goats. Asian-Australas J Anim Sci. 32(8):1284-1295. doi: 10.5713/ajas.19.0486
- Lv C, Larbi A, Wu G, Hong Q, Quan G. (2019) Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. Anim Reprod Sci. 208:106127. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106127
- Matassino D, Incoronato C, Occidente M. (2005) Biodiversità e filiere produttive zootecniche. VII Convegno Nazionale Biodiversità. Catania, 31 marzo 2005.
- Morrel JM, Johannisson A, Dalin AM, Hamma L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H. (2008) Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. Acta Vet Scand. 50(1):2. doi 10.1186/175-0147-50-2)
- Negro A. Biodiversità, le risorse delle razze caprine autoctone; Le razze caprine autoctone lombarde, caratteristiche, prospettive di crescita e potenzialità future. Fonte Asso.Na.Pa 2022.(www.assonapa.it)
- Nicoloso L, Bomba L, Colli L, Negrini R, Milanesi M, Mazza R, Sechi T, Frattini S, Talenti A, Coizet B, Chessa S, Marletta D, D'Andrea M, Bordonaro S, Ptak G, Carta A, Pagnacco G, Valentini A, Pilla F, Ajmone-Marsan P, Crepaldi P, the Italian Goat Consortium. (2015) Genetic diversity of Italian goat breeds assessed with a medium-density SNP chip. Genet Sel Evol. 47(62). https://doi.org/10.1186/s12711-015-0140-6
- Paramio MT. (2010) In vivo and in vitro embryo production in goats. Small Rumin Res. 89: 144-148. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.037
- Purvis K, Rui H, Schølberg A, Hesla S, Clausen OP. (1990) Application of flow cytometry to studies on the human acrosome. J Androl. 11(4): 361-366.
- Souza-Fabjan JM, Locatelli Y, Duffard N, Corbin E, Touzé JL, Perreau C, Beckers JF, Freitas VJ, Mermillod P. (2014) In vitro embryo production in goats: Slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up-derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. Theriogenology 81(8): 1021-1031. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.023.
- Tabellini R. (2005) La rinascita della Reggiana: una razza autoctona da tutelare. Eurocarni 9, 163. Edizioni Pubblicità Italia S.r.l. Piazza Roma, 3 - 41121 Modena
- Tao J, Critser ES, Critser JK. (1993) Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. Mol Reprod Dev. 36(2): 183-194. doi: 10.1002/mrd.1080360209
- Yánez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yesteıvan M. (2022) Advances in sperm cryopreservation in farm animals: cattle, horse, pig and sheep. Anim Reprod Sci. 246, 106904. doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106904

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano quanti hanno contribuito alla realizzazione delle attività e al conseguimento e dei risultati ottenuti dal progetto CRIOGERM. In particolare, per le attività di campo si ringraziano Giovanni Bailo di ASSONAPA, Fabio Bencetti (Veterinario - Libero Professionista), gli allevatori e loro coadiuvanti aziendali. Per le attività di laboratorio si ringraziano Anna Fiorona, Filippo Moretti, Laura Paoli e Roberta Vanni del laboratorio di seminologia, citometria e criobiologia dell'Istituto Spallanzani.