istituto SPALLANZANI
WWW.ISTITUTOSPALLANZANI.IT

CRIOGERM

Asso.Na.Pa.
Associazione Nazionale della Pastorizia

L'importanza della biodiversità nel patrimonio zootecnico lombardo: l'esempio del progetto «CRIOGERM" per la salvaguardia delle razze caprine

Roberto Puglisi

Istituto Sperimentale Italiano "L. Spallanzani "
Loc. La Quercia
26027 - Rivolta d'ADDA (CR)

Rivolta d'Adda, 17 febbraio 2023

Biodiversità: dal greco bios = vita e dal latino diversitas = diversità

In ecologia (disciplina che include sia le scienze della vita, sia le scienze della terra) è la diversità biologica di un ambiente, cioè la varietà di organismi che lo compongono

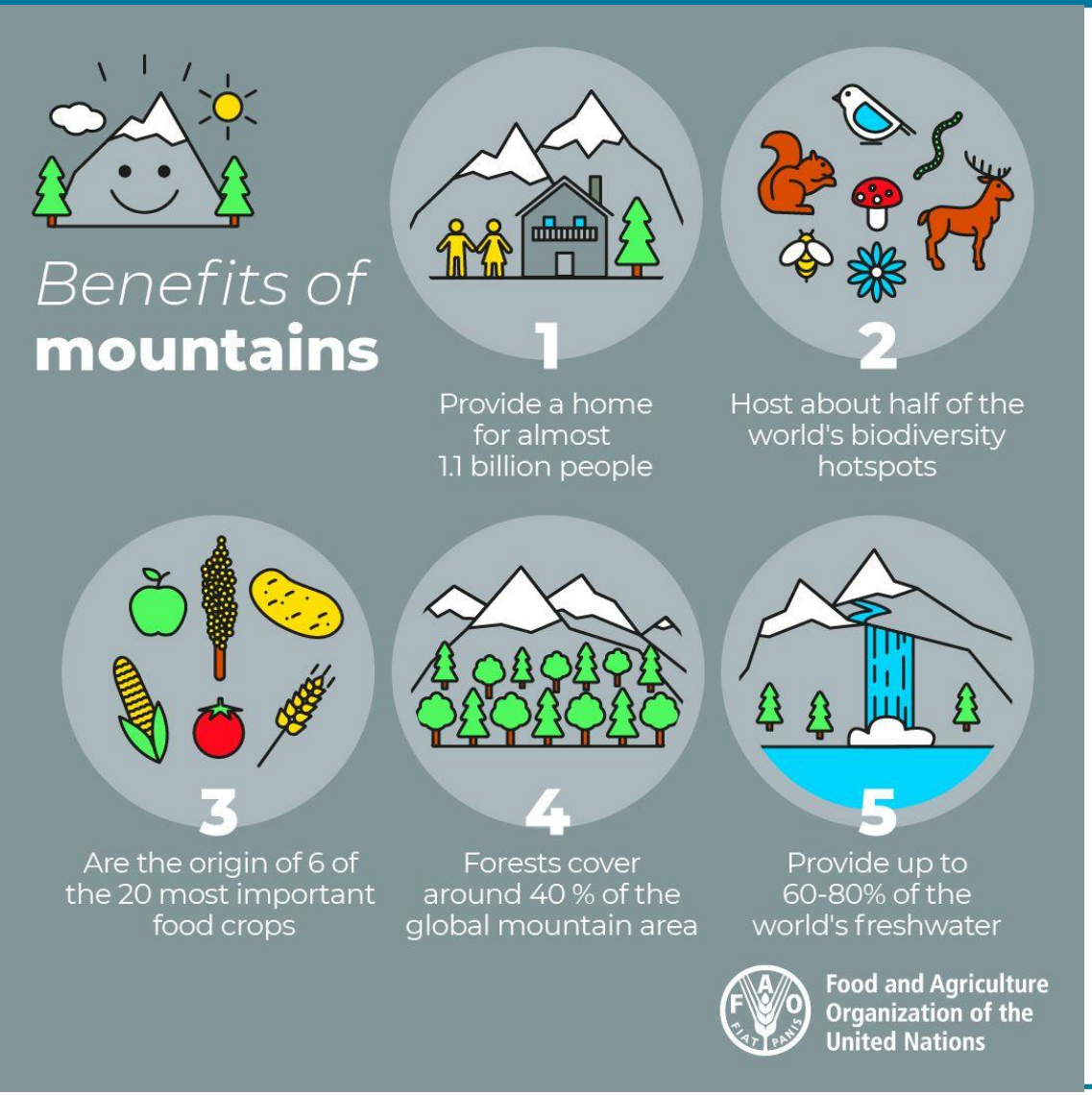
Si differenzia in tre principali livelli:

Diversità di specie: i milioni di piante, animali e microrganismi, ovvero l'abbondanza e la differenza di specie in un territorio

Diversità genetica: i geni che essi contengono

Diversità di ecosistemi: ovvero la varietà di ambienti naturali presenti sul pianeta Terra

Le barriere coralline e la foresta amazzonica insieme esprimono quasi la metà della biodiversità della Terra



L'Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) è un'agenzia delle Nazioni Unite che guida gli sforzi internazionali per sconfiggere la fame

e garantire la sicurezza alimentare per tutti attraverso l'accesso regolare a cibo di qualità sufficiente per condurre una vita sana

Con 194 Stai membri e l'Unione Europea, opera in oltre 130 paesi nel mondo

la biodiversità produce anche i cosiddetti “servizi eco-sistemici”, ovvero le risorse per sviluppare l’economia, l’agricoltura, o più semplicemente per il fabbisogno nutritivo

Servizi di supporto (es. formazione del suolo, fotosintesi, ciclo nutritivo alla base della crescita e della produzione)

Servizi di fornitura (es. cibo, acqua, legname, combustibili)

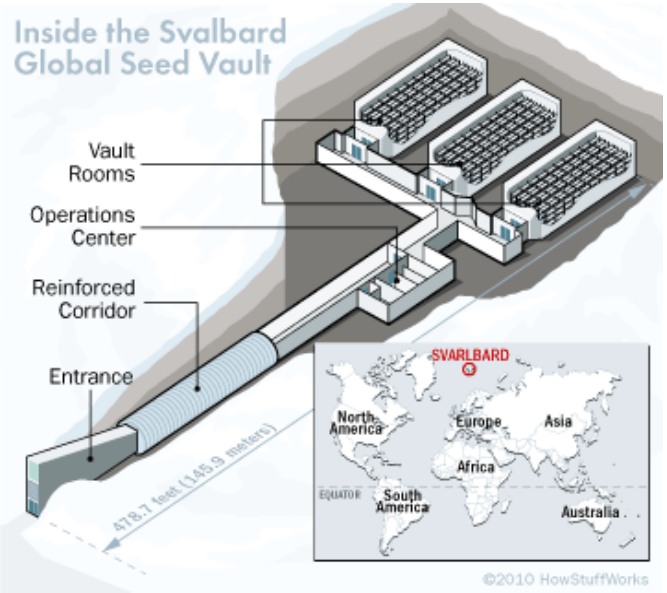
Servizi di regolazione (es. clima, precipitazioni, diffusione/resistenza alle malattie)

Servizi culturali (es. bellezza della natura, svago, benessere anche spirituale)

la perdita di biodiversità comporta conseguenze negative

Immaginate se una delle coltivazioni più diffuse al mondo, come il grano, non riuscisse ad adattarsi al cambiamento climatico

SVALBARD GLOBAL SEED VAULT



Protegge i duplicati di 1.194.244 campioni di semi provenienti da quasi tutti i paesi del mondo che alimentano la banca genetica a garanzia del nostro futuro approvvigionamento alimentare

Il concetto di BIOBANCA

Biodiversità nella zootecnia è anche progresso genetico

1950
Produzione: 4000 Kg di latte per lattazione

2010
Produzione: 9000 Kg di latte per lattazione

Dopo aver rischiato l’estinzione sono oggi i più grandi al mondo

Da dove arriva questa biodiversità? ad inizio dell'ottocento…

Valle D'Aosta: meticci fra razze come la **Tarentaise** (Tarina, Savoiarda), **Bruna Alpina** e transalpine quali **Hérens**, **Chuches** e **Loeschen**.

Lombardia: Br**una Alpina** da latte (importata fin dal 1450) a mantello assai vario. **Bovini del Tirolo** (grigi), **Luganesi** (manto scuro), **Piemontesi, Emiliani** e **Pontremolesi** a triplice attitudine. Razze **Bresciana** e **Cremonese** dal manto grigio chiaro, derivate da bovini **Tirolesi** a manto grigio-biancastro e da capi **Bruno Alpini**. Razza **Tortonese**, comune a Piemonte, Lombardia (**Varzese**), Emilia (**Ottonese**) e Liguria (**Montana**).

Piemonte: razza **Piemontese da lavoro** a mantello rossiccio, le sottorazze **scelta di pianura, ordinaria di pianura, di Demonte, delle Langhe, Canavese**. Razze da carne come la **grande di Pinerolo** e la **Lucerna**. Razze simili all'odierna **Tarentaise** (**Tarina, Savoiarda**), la **Montagnola** o **di Susa**. Le razze di montagna **Camandona** e **di Varallo**. Bovini **d'Oropa** dal manto rosso e raramente pezzati e **Podolici**.

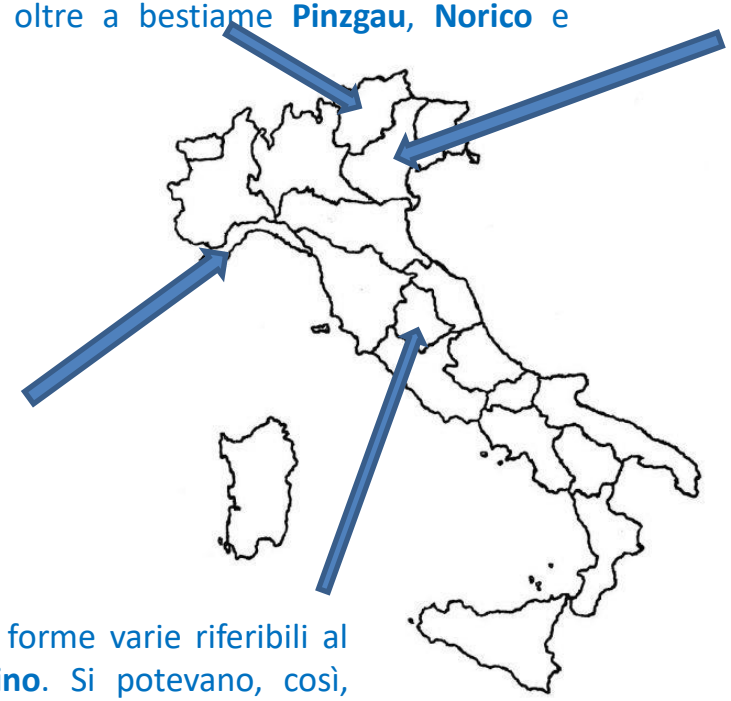
Da: Atlante delle razze autoctone
Bovini, Equini, Ovicaprini, Suini allevati in Italia
Daniele Bigi e Alessio Zanon

1a edizione: novembre 2008
2a edizione: gennaio 2020
"Edagricole – Edizioni Agricole di New Business Media S.r.l."

Ad inizio dell'ottocento

Trentino: Grigia della Val di Fiemme simile alla razza **Tirolese grigia** e la **Bruna Rendena** (attuale Rendena) oltre a bestiame **Pinzgau**, **Norico** e **Pusterthaler**.

Veneto: nelle pianure razza **Grigia del Tirolo** suddivisa nelle tipologie **Grigia Val d'Adige**, **Bigia alpina**, **Bellunese**, **Feltrina**, **Ulten** per lavoro e carne, mentre sui monti la **Burlina** e la **Toppata**. Oltre il Piave la **Friulana a manto rosso** (tipo iberico) e la **Carnica** (Carniella) a manto rossiccio. Nel basso Veneto, la **Pugliese** del Veneto di origine podolica.

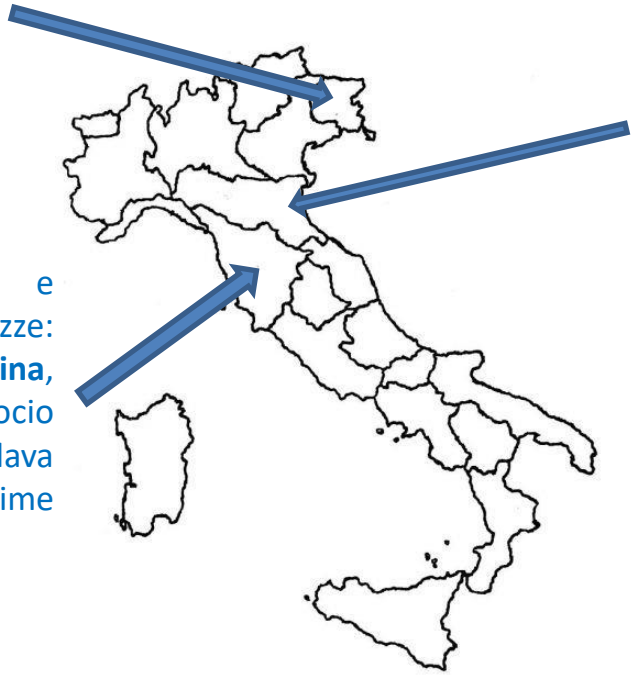


Liguria: bovini a manto rosso (razza **Cabelle** ecc.), somiglianti all'attuale **Tortonese**, adatta al lavoro, poi sostituita, dalla **Piemontese**, **Valdostana** e **Bruna Alpina** in modo invasivo.

Umbria, Lazio e Marche: bovini dalle forme varie riferibili al tipo **Maremmano Podolico** o **Chianino**. Si potevano, così, incontrare **Maremmani podolici laziali** (razza Romana grigia), razza **Perugina**, **Todina**, **Marchigiana bianca di pianura**, **M. marina di collina** e **M. montanara grigia** sulle cime più impervie.

Ad inizio dell'ottocento

Friuli Venezia Giulia: bestiame friulano rosso, **Möllthal**, **Norico**, **Pusterthaler**, **Pinzgau Möllthal**, **Slavo** ed **Illirico croato, r**azza **di Tolmino** e di **Plezzo** poi sostituite dalla razza **Caporetto** dalle tinte slavate e dalla sua varietà **Zickete**.



Toscana: oltre alle **Pontremolese** e **Garfagnina**, bovini **Chianini** nelle sottorazze: **Valdarno**, **Valdichiana**, **Calvana** e **Pasturina**, bovini **Maremmani** e derivanti da incrocio fra **Maremmani** e **Chianini**. Si andava affermando un bovino più adatto al regime stallino detto **Mucco Pisano**.

Emilia: nelle pianure, bovini dal manto rosso: **Parmigiana**, **Calestanese**, **Reggiana**, **Modenese**, **Carpigiana** e **Fromentina bazzana** di Ferrara, sfruttati per lavoro, latte e carne. In montagna bovini di tipo **Iberico-Italico**: **Bardigiana**, **Valtarese**, **Cornigliese**, **Boscarina**, che si ricongiungevano con la popolazione Toscana detta **Pontremolese**. Bovini **podolici** come la **Langhiranese grigia** (**Grigia Reggiana**, **Modenese** di monte, **Maremmana-Romagnola** di monte) con la razza **Garfagnina Toscana**. Nelle pianure, **Podolica** ancora suddivisa in **Ferrarese**, **Bolognese** e **Romagnola**.

Le restanti **regioni peninsulari** possedevano razze **podoliche** riferibili ad un unico tipo diffuso in Puglia con le varietà: **Podolica abruzzese**, **P. lucana**, **P. campana**, **P. capitanata**, **P. murgese** e **P. calabrese**. Nelle **Isole,** la razza **Siciliana Modicana** con le varianti **Mezzalina** e **Montanina**, la razza di **Pantelleria** e **Sarda**, con i gruppi in fase di formazione **Sardo Bruna** e **Sardo Modicana**.

E dopo ?

A partire dagli anni Cinquanta, si abbandonano gli indirizzi poli-produttivi a favore di quelli più specializzati con l'esclusione delle razze a più attitudini.

Secondo l'Istituto Nazionale di Statistica, nel 1949 erano presenti ben 42 razze bovine. Attualmente molte sono estinte o a rischio di sopravvivenza.

Cosa comporta la selezione spinta?

Sicuramente alcune minacce: inbreeding o inincrocio

Identifica l'accoppiamento tra individui consanguinei

La progenie ha probabilità di ereditare due copie 'identiche' dello stesso allele di un gene presente in un antenato comune

Il coefficiente di inbreeding stima questa probabilità in una popolazione. E' inversamente proporzionale alla dimensione della popolazione

Già nel 1900, era chiaro che allevare soggetti imparentati produceva tratti più prevedibili e si sospettava fosse la causa di importanti conseguenze sulla salute della prole

Sono le conseguenze dell' OMOZIGOSI

Fissazione casuale di alleli recessivi deleteri, in genere associati a caratteri fenotipici svantaggiosi, per es., la manifestazione di malattie ereditarie mantenute silenti nella popolazione in condizione eterozigote (es. anemia mediterranea)

Molti alleli recessivi hanno effetti addirittura letali se ereditati in doppia copia

Oggi, è **COMPROVATO** che la cosiddetta depressione da inbreeding ha ricadute negative sulla sopravvivenza, capacità riproduttive (mortalità, fecondità, natalità) ed evolutive quali l'adattamento alle variazioni ambientali e la resistenza alle malattie

Le misure di contrasto alla perdita di biodiversità nel mondo

Nel 1972, a Stoccolma, la Conferenza delle Nazioni Unite sull'ambiente **riconosce ufficialmente** il problema della perdita di biodiversità, anche in ambito zootecnico

Nel 1975 la FAO pubblica lo studio "Conservation of Animal Genetic Resources" e sollecita studi e approfondimenti. Nel 1980, a Roma, promuove il primo incontro tecnico sulle risorse genetiche e nel 1985 propone una **strategia globale per la gestione delle risorse genetiche animali**

Nel 1992, a Rio de Janeiro, si raccolgono le firme dei paesi che aderiscono alla **"Convenzione sulla diversità biologica"**

Nel 1998 la FAO **coordina un'indagine** sullo stato delle risorse genetiche animali nel mondo e nel 2007 pubblica "The state of the world's animal genetic resources for food and agricolture" e **in Svizzera si stabilisce un piano mondiale di conservazione**

Le misure adottate in Italia

L'Italia ratifica la Convenzione sulla Biodiversità di Rio de Janeiro del 1992 con la legge 124/1994

Nel 1995 accredita ConSDABI presso la FAO, come **National Focal Point (NFP) italiano** e nel 2002 viene fondata l'Associazione Razze Autoctone a Rischio di Estinzione (RARE) per promuovere iniziative di conservazione delle razze autoctone italiane

Negli anni '90 avvia programmi di conservazione **"in situ"** tramite incentivi agli allevatori per allevare in purezza soggetti di razze autoctone in pericolo

Promuove successivi **Piani di Sviluppo Rurale regionali (PSR)** (2000-2006, 2007-2013 e 2014-2020, 2021-27).

Nei piani si indicano strategie e percorsi indirizzati, ad esempio, alla crioconservazione di germoplasma e applicazione di approcci "ex situ"

Germoplasma

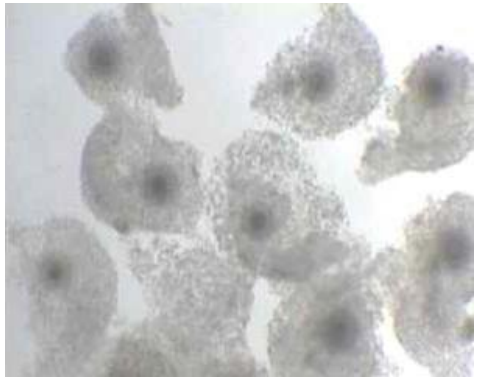
Tipo di germoplasma	Facilità di accesso	Esperienza nella crioconservazione	Costi relativi	Esperienza nell'utilizzo per ricreare la linea	Costi relativi	% linea desiderata alla prima progenie
Seme	2	3	1	1 - 3 [a]	1 - 5 [a]	50 - 100
Ovocita	5	5	5	4	3	50 - 100
Embrione	5	5	5	4	2	100

a) Se il seme verrà usato per IA, IVF or ICSI.

Seme

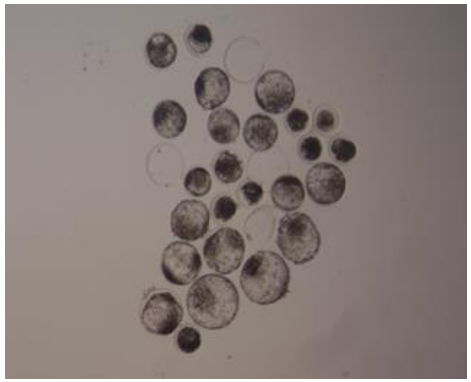
+

Ovocita



=

Embrione

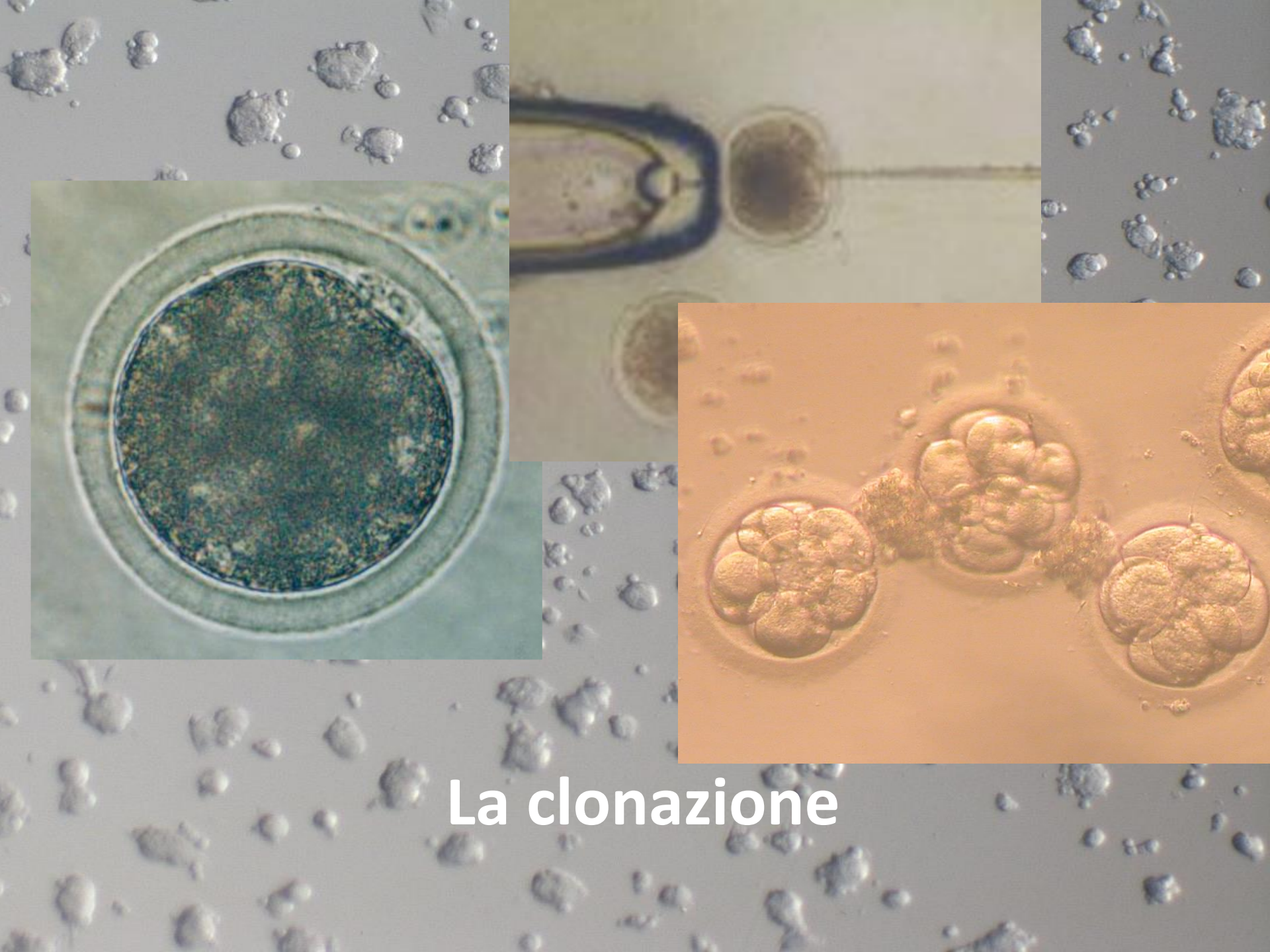


Scegliere il germoplasma da crioconservare implica che:

Seme: il ripristino di una linea potrebbe richiedere l'accoppiamento iniziale con femmine di altra popolazione, seguito da diverse generazioni di reincroci per ottenere popolazioni quasi geneticamente pure.

Ovociti: come per il seme, ma il reincrocio porterebbe alla perdita del patrimonio genetico del cromosoma Y. Il congelamento lento o la vitrificazione sono possibili a seconda della specie, proprietà fisiche della cellula (superficie/volume) o permeabilità ai crioprotettori.

Embrioni: il congelamento lento è spesso utilizzato per i ruminanti. Per gli equini vari approcci: flushing, OPU e ICSI, congelamento lento/vetrificazione di blastocisti piccole (<300 µm). Nel suino, soprattutto vitrificazione sia su morule che blastocisti e addirittura zigoti.



La clonazione

Per riassumere... e concludere

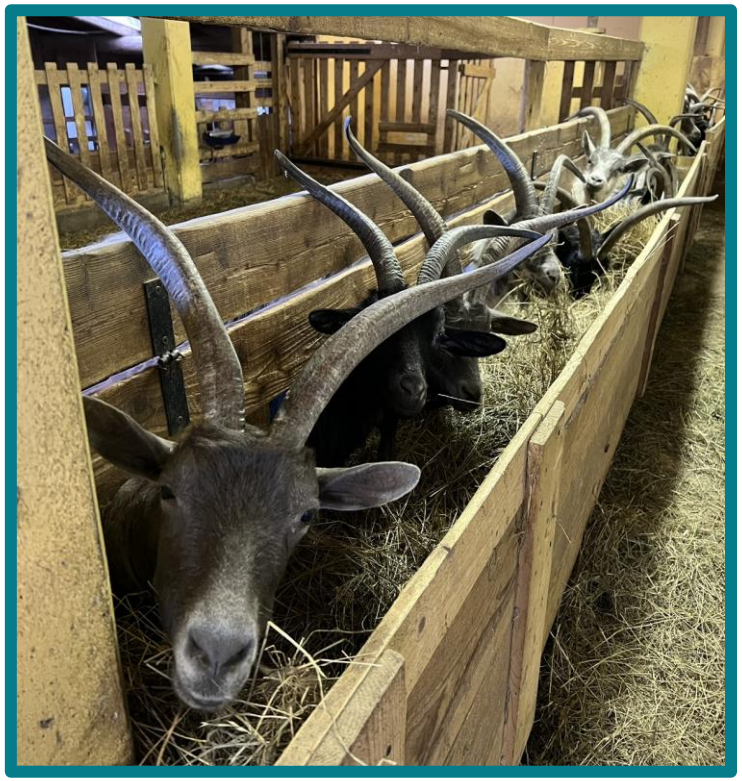
La biodiversità: le razze autoctone a rischio di estinzione

I pericoli dell'inbreeding

Le misure adottate in Italia: il PSR 2014 – 2020

Il germoplasma

La strategia ex situ

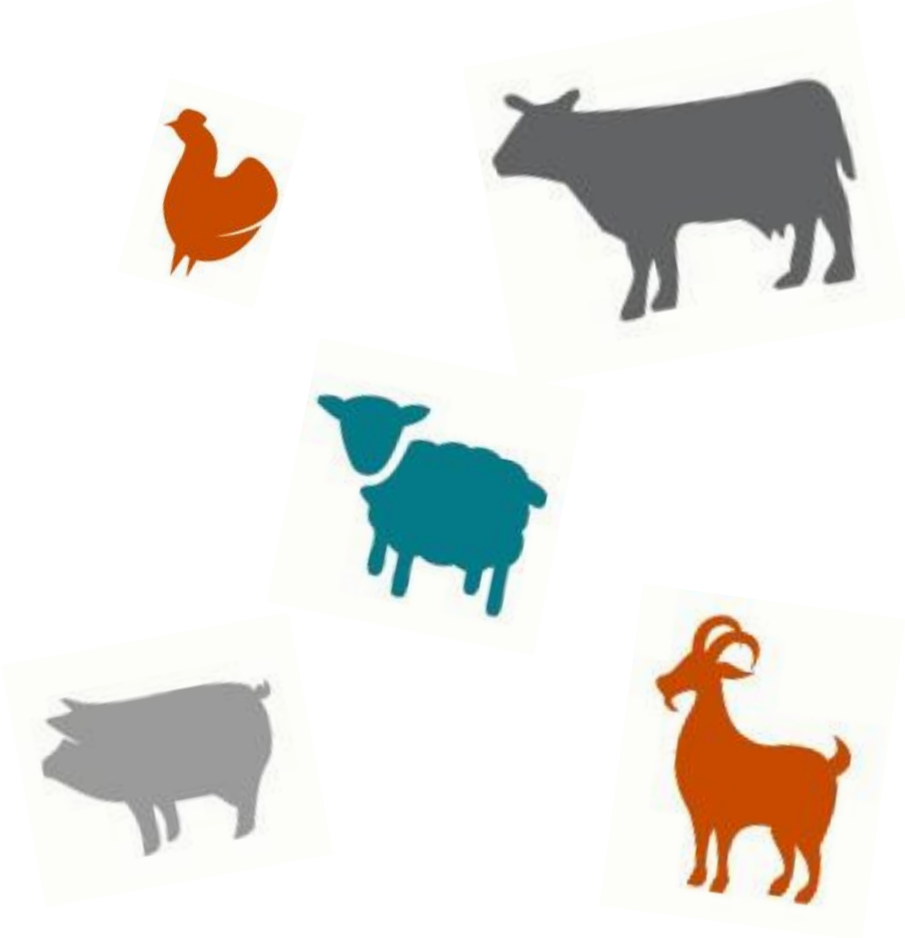


LA CONSERVAZIONE DELLE RAZZE CAPRINE LOMBARDE

FILIPPO MORETTI

Rivolta d'Adda, 17 febbraio 2023

In ambito zootecnico, parlando di "biodiversità", si fa riferimento alla "diversità genetica" che possiamo riscontrare tra le specie domestiche allevate.
Un'elevata biodiversità significa perciò allevare una gran varietà di razze differenti.



LE RAZZE CAPRINE IN ITALIA

Oggi, in Italia, vengono allevate 56 razze caprine. 3 sono le razze cosmopolite, 5 quelle estere, e ben 48 sono quelle autoctone del nostro paese!

L'IMPORTANZA DELLA CONSERVAZIONE

SELEZIONE SPINTA DELLE RAZZE SPECIALIZZATE → PROGRESSIVA SOSTITUZIONE DELLE RAZZE AUTOCTONE (MENO PRODUTTIVE) → PERDITA DI BIODIVERSITÀ

I PUNTI DI FORZA:

- SONO UNA PREZIOSA FONTE DI VARIABILITÀ GENETICA;
- POPOLANO AREE MARGINALI DEL NOSTRO PAESE;
- SVOLGONO, INSIEME ALL'ALLEVATORE, UNA FUNZIONE DI MANTENIMENTO DEL TERRITORIO;
- SONO ADATTE AD ALLEVAMENTI ESTENSIVI, CARATTERIZZATI DA BASSI INPUT;
- FANNO PARTE DELLE TRADIZIONI AGROALIMENTARI LOCALI.

LE SFIDE DA AFFRONTARE:

- COMPETIZIONE CON LE RAZZE COSMOPOLITE;
- ALTO TASSO DI CONSANGUINEITÀ;
- CAMBIAMENTO CLIMATICO.

OROBICA

La capra Orobica, detta anche Valgerola, è presente sul versante orobico e sul fondovalle della bassa Valtellina, in provincia di Lecco, Como e Bergamo.

È di taglia media ed è ben proporzionata. Le corna sono lunghe in entrambi i sessi. Il vello presenta un pelo di notevole lunghezza con colorazione che va dal grigio cenere al beige violaceo.

L'indirizzo di produzione principale è il latte e i prodotti tipici sono il Formagin, il Matuscin, la Roviola e il latte viene utilizzato in quota del 10% per la produzione del Bitto.

CONSISTENZE: 3.135

FRISA VALTELLINESE

La Frisa Valtellinese o Frontalasca, è diffusa in tutta l'alta Valtellina, sul versante retico ed in Valchiavenna.

Sono capre di taglia grande, molto robuste. Le corna sono a scimitarra e portate all'indietro, si ritrovano però anche soggetti acorni. Il vello è di media lunghezza, si presenta nero con le caratteristiche striature bianche ai lati della testa, del ventre, del sottocoda e delle estremità degli arti.

Non ha un indirizzo produttivo prevalente, si producono sia latte che carne. Il prodotto tipico di questa razza

è il Violino.

CONSISTENZE: 1.721

BIONDA DELL'ADAMELLO

La Bionda dell'Adamello è diffusa sul massiccio dell'Adamello, in Valcamonica, in parte sulla montagna bresciana e in alcune zone bergamasche di confine (Val di Scalve e Sebino).

Si tratta di capre di taglia medio-grande. La presenza di corna è legata alla scelta degli allevatori e delle tradizioni locali, sono lunghe e a forma di sciabola con le estremità divergenti. Il vello presenta tonalità che vanno dal marrone al biondo chiaro, la zona ventrale è bianca e sono presenti due striature bianche lungo il muso. Il pelo è molto lungo.

L'indirizzo produttivo è principalmente il latte e i prodotti tipici sono il Fatulì, il capretto e la Berna (carne essiccata).

CONSISTENZE: 2.118

LARIANA

La Lariana o capra di Livo, è diffusa lungo tutta l'area lariana (lago di Como) occidentale.

È di taglia medio – grande, robusta. Le corna sono a scimitarra o rivolte all'indietro e divaricate. Il vello si presenta con un pelo di varie lunghezze e di colore eterogeneo, con mantelli che vanno dal nero al giallo oppure con pezzature varie.

L'indirizzo produttivo principale è quello della carne, con il capretto, il latte viene utilizzato per alcuni formaggi d'alpeggio.

CONSISTENZE: 1.665

VERZASCHESE

La Verzaschese o Nera di Verzasca, è diffusa sulle Prealpi Svizzere, a monte di Locarno.

È una capra di taglia medio – grande. Le corna sono molto lunghe in entrambi i sessi e arcuate all'indietro. Il vello è nero e lucido ed il pelo è corto.

L'indirizzo produttivo è quello del latte, in particolare utilizzato per la Formaggella del Luinese.

CONSISTENZE: 682

IL PROGETTO CRIOGERM

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

Operazione 10.2.01 "Conservazione della Biodiversità Animale e Vegetale"

Programma di Sviluppo Rurale 2014 – 2020 della Regione Lombardia

Responsabile del progetto è l'Istituto Spallanzani, realizzato con la collaborazione di ASSONAPA

Rivolta d'Adda, 17 febbraio 2023

L'istituto Spallanzani, data l'urgenza di tutelare le razze autoctone presentate, si inserisce in questo contesto attraverso Criogerm: il progetto prevede una serie di misure mirate a contrastare l'indebolimento delle razze caprine descritte.

Gli obiettivi specifici prevedono:

- la valorizzazione dei dati in possesso di Assonapa al fine di valutare il rischio legato alla consanguineità;
- la raccolta, l'analisi e la conservazione del materiale seminale (costituzione criobanca);
- la gestione integrata dei dati legati ai riproduttori.

istituto SPALLANZANI
WWW.ISTITUTOSPALLANZANI.IT

CRIOCONSERVAZIONE

LAURA PAOLI

Rivolta d'Adda, 17 febbraio 2023

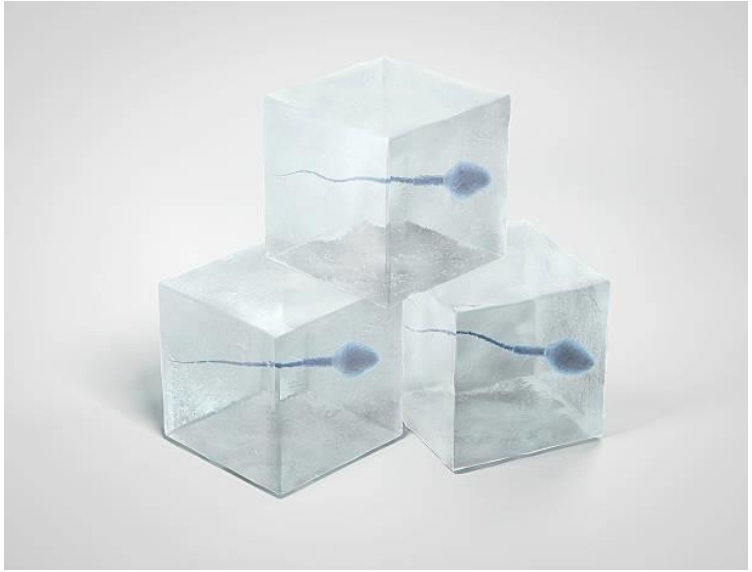
CRIOBIOLOGIA

Branca della biologia che analizza il funzionamento a basse temperature di cellule, tessuti, organi ed esseri viventi.

Con la ***crioconservazione***, si sfrutta l'azione del freddo per determinare il rallentamento o l'arresto metabolico della cellula.

QUAL E' LA **SFIDA** ?

Conservare le cellule in uno stato di animazione sospesa per lunghi periodi di tempo in azoto liquido, preservando al contempo la loro *capacità di riprendere vita* al momento del ripristino della temperatura e di *svolgere tutte le normali funzioni* biologiche.



Laboratorio di SEMINOLOGIA

PRE
CONGELAMENTO

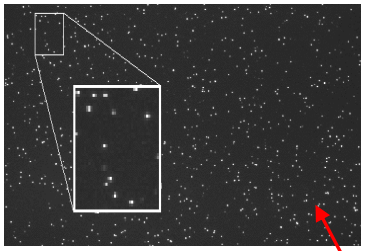
CONGELAMENTO

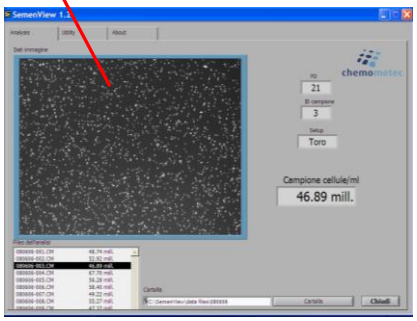
POST
CONGELAMENTO

ANALISI SEMINALE

Numero di spermi TOTALI per unità di volume **CONCENTRAZIONE**
Percentuale di spermi con membrane integre **INTEGRITA' DI MEMBRANA**
Percentuale di spermi motili **MOTILITA' TOTALE**
Percentuale di spermi con moto progressivo **MOTILITA' PROGRESSIVA**

CONCENTRAZIONE e INTEGRITA' DI MEMBRANA





NucleoCounter SP100:

Analizzatore d'immagine di tipo statico composto da microscopio a fluorescenza e campionatore.

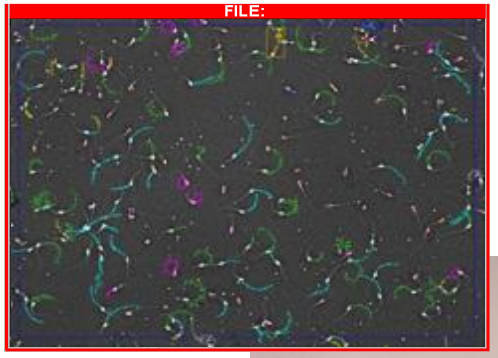
Viene utilizzato un dispositivo specifico (*cassetta*) contenente Ioduro di Propidio, colorante fluorescente che si lega al DNA delle cellule.

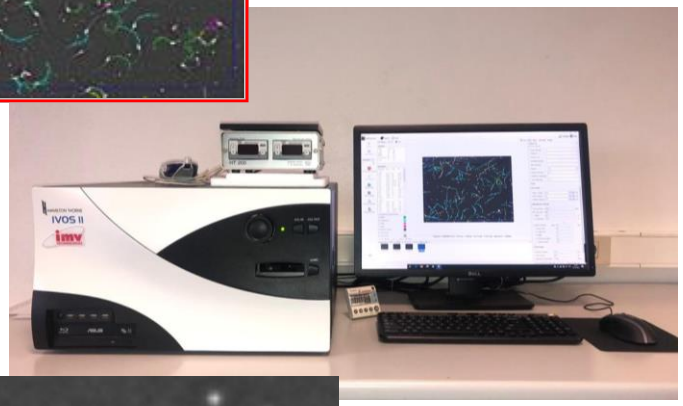
MOTILITA’

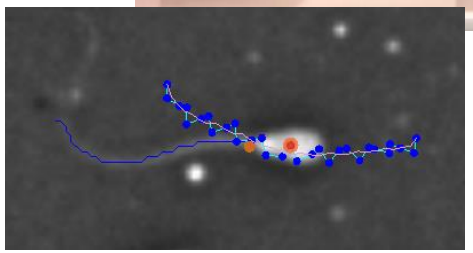
HTM-IVOS CASA System
(Computer Assisted Sperm Analysis)

Analizzatore d’immagine di tipo dinamico con microscopio a fluorescenza, telecamera e campionatore.

Riconosce le cellule grazie a settaggi specie-specifici che permettono di individuare l’area della testa dello spermatozoo e seguire il suo movimento per 30 trace. Le informazioni registrate durante la sua osservazione permettono la classificazione dello spermatozoo in: statico, motile o progressivamente motile.





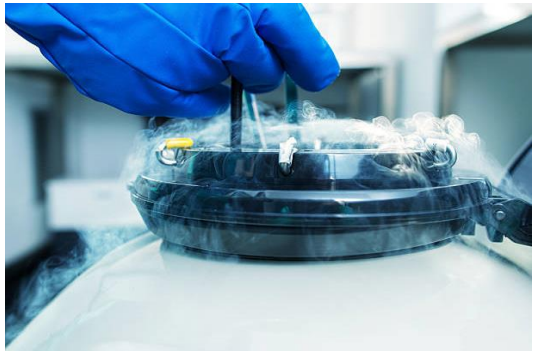


CONGELAMENTO

SEME

DILUIZIONE

EQUILIBRAMENTO



CONGELAMENTO

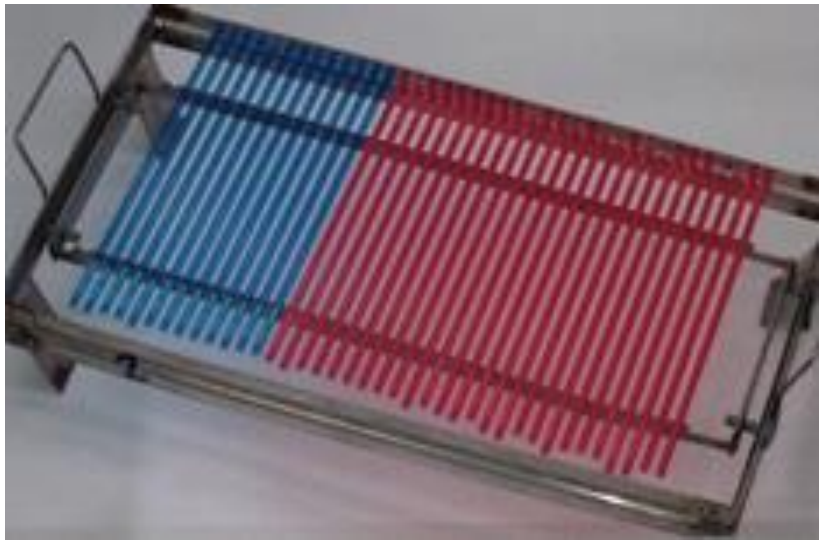
DILUIZIONE

EXTENDER

MANTIENE LE CARATTERISTICHE DEL MATERIALE SEMINALE

CONTIENE CRIOPROTETTIVI

CONFEZIONAMENTO

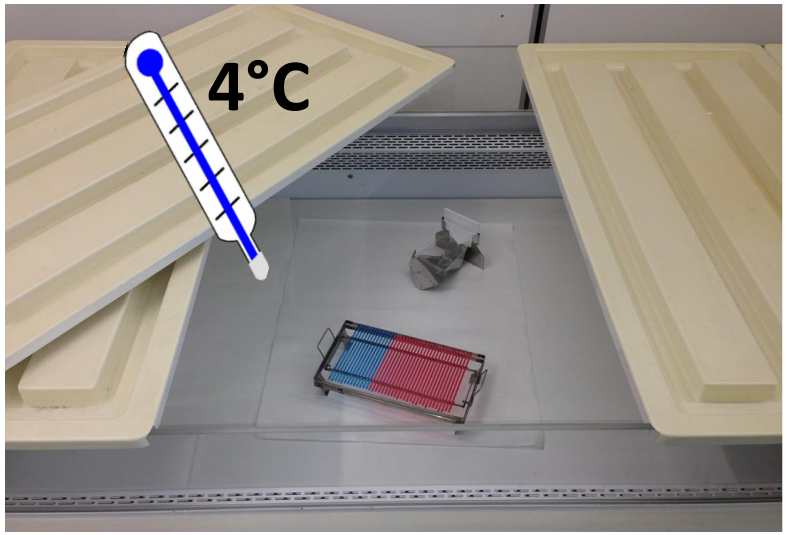


Riempimento di paillettes tramite macchina confezionatrice

Disposizione paillettes su rack apposito

EQUILIBRAMENTO

Dopo l'aggiunta del crioprotettore, il seme viene lasciato a riposo per permettere all'extender di iniziare la sua funzione protettiva.



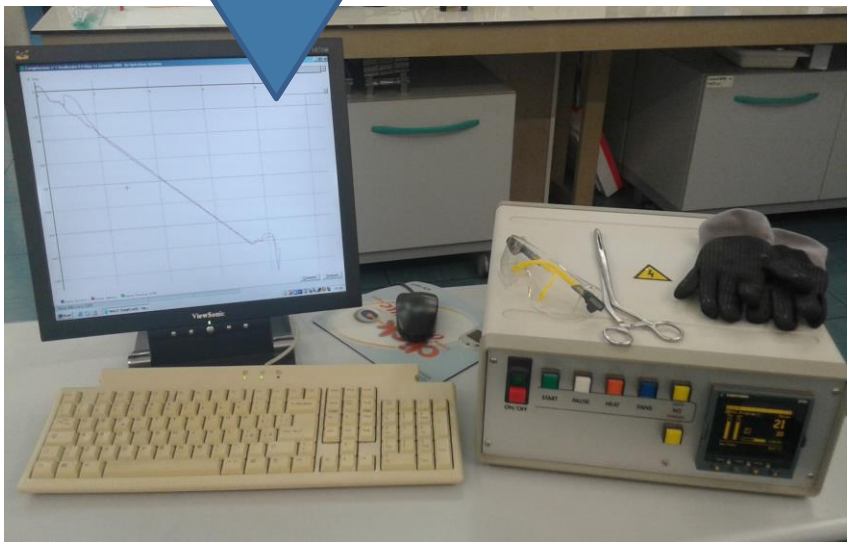
CONGELAMENTO

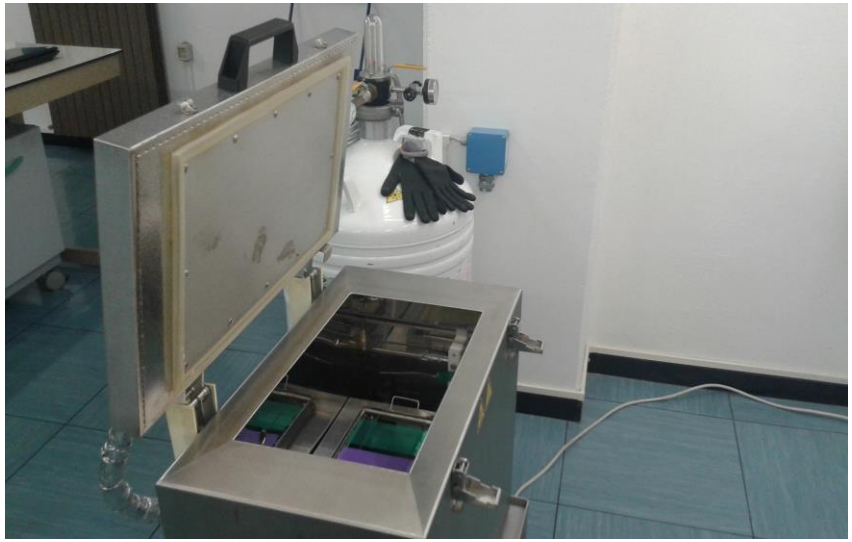
CURVA TEORICA

CURVA CAMERA

CURVA PRODOTTO

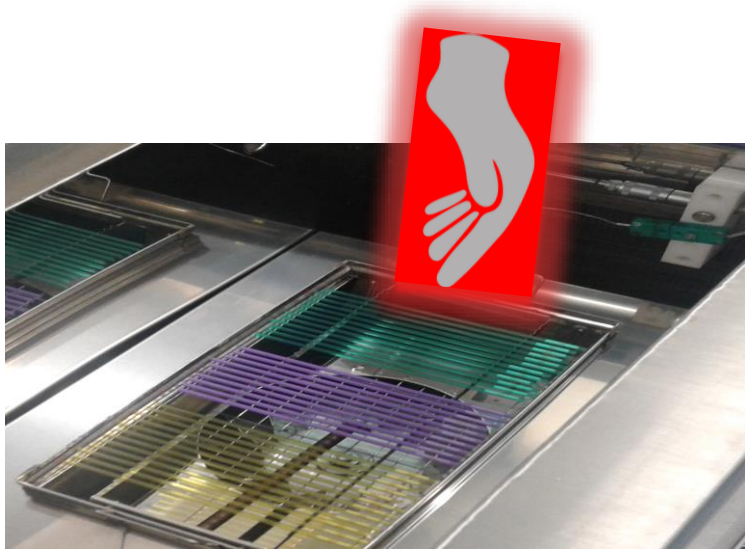
Congelamento tramite congelatori computerizzati.

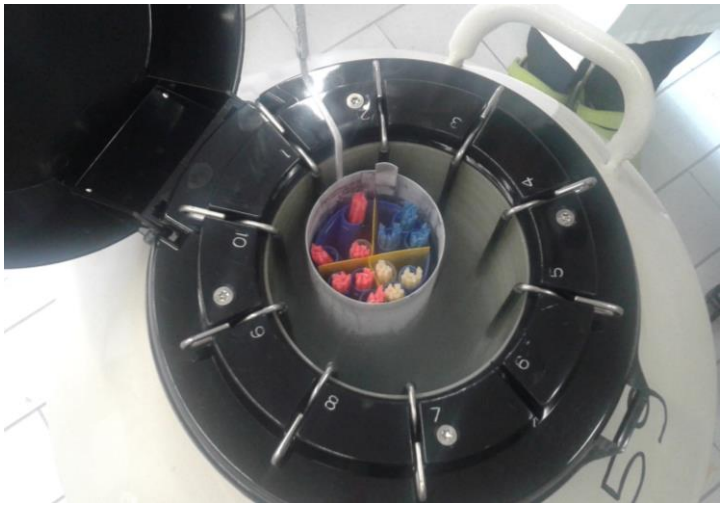




STOCCAGGIO

- Rimozione rapida delle paillettes dalla camera di congelamento
- Trasferimento delle paillettes in contenitori criogenici contenenti N2 liquido

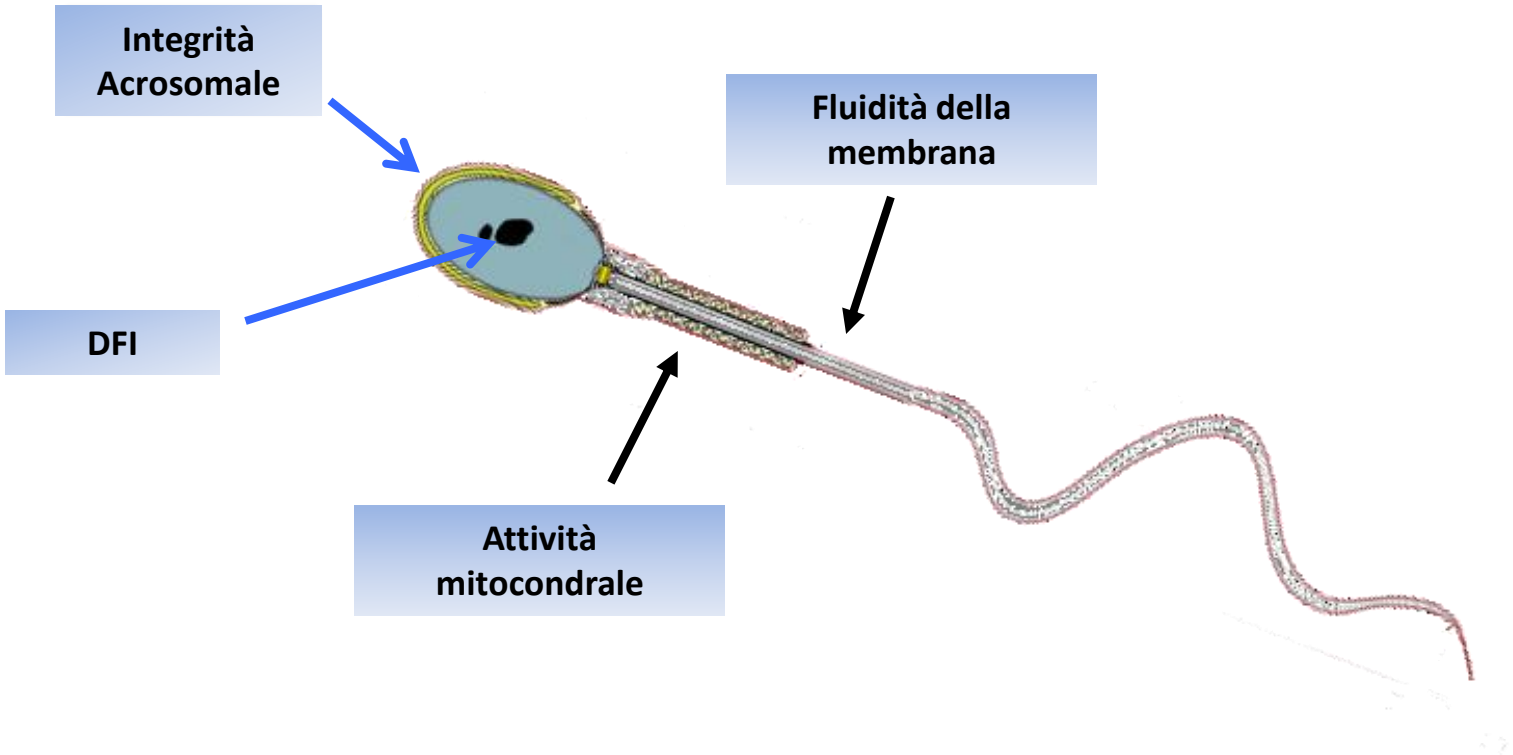




ANALISI SEMINALE

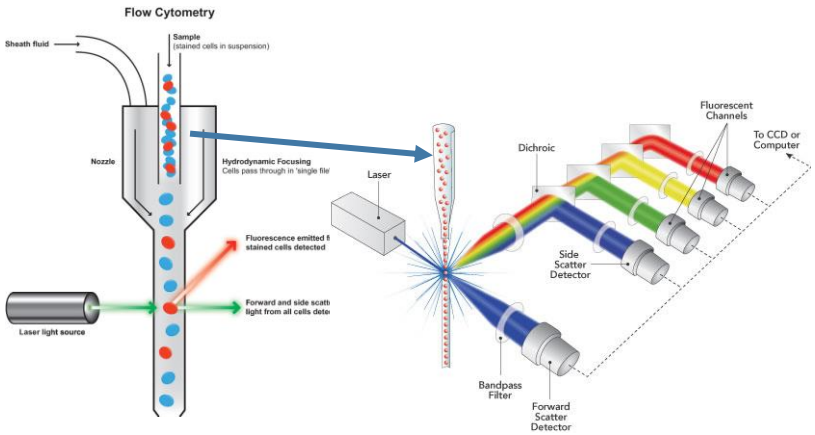
Numero di spermi TOTALI per unità di volume **CONCENTRAZIONE**
Percentuale di spermi con membrane integre **INTEGRITA' DI MEMBRANA**
Percentuale di spermi motili **MOTILITA' TOTALE**
Percentuale di spermi con moto progressivo **MOTILITA' PROGRESSIVA**

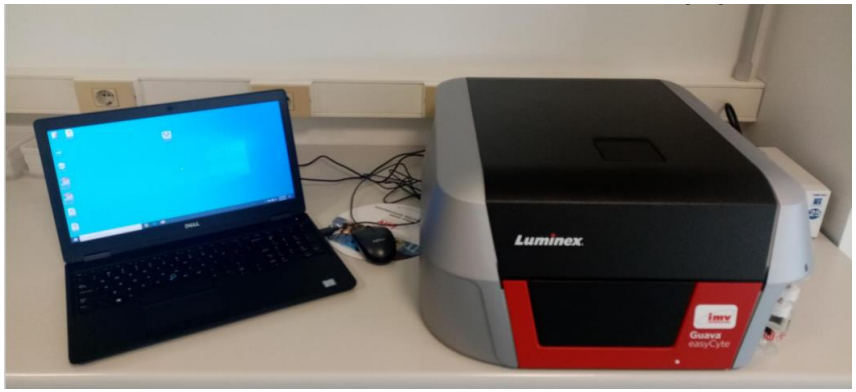
ANALISI AVANZATE



ANALISI AVANZATE

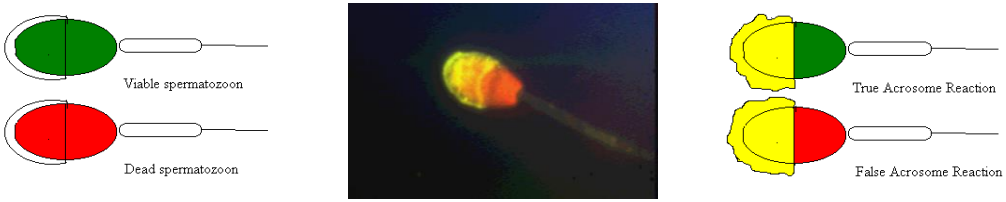
Citofluorimetro EasyCyte

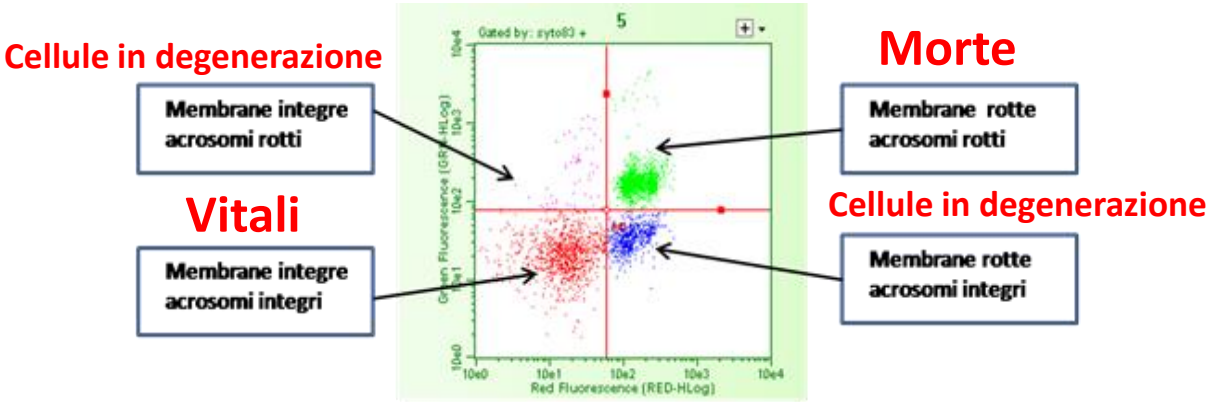




INTEGRITA' MEMBRANA e ACROSOMA

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

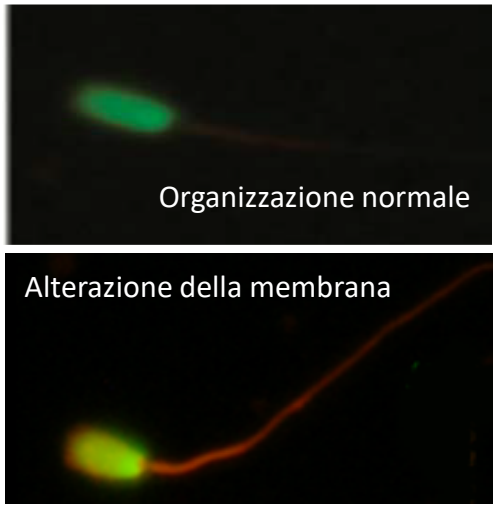


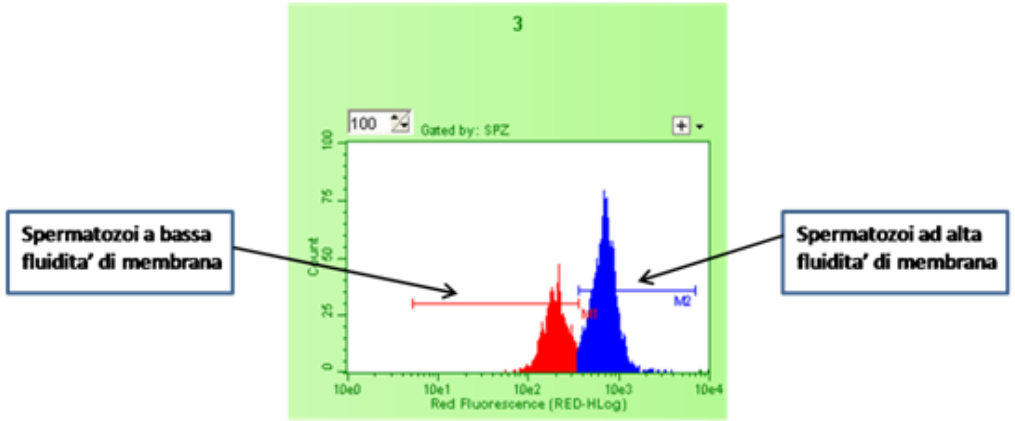


FLUIDITA' di MEMBRANA

Valutazione dell'organizzazione strutturale della membrana dello spermatozoo.

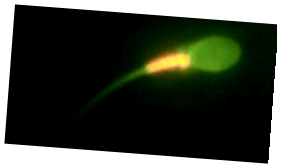
Gli spermatozoi eiaculati vanno incontro a cambiamenti nell'architettura delle membrane conosciuti con il termine di capacitazione. Questo processo deve avvenire nel tratto genitale femminile affinché il gamete maschile possa penetrare l'oocita.





ATTIVITA' MITOCONDRIALE

I mitocondri, situati nel segmento intermedio della cellula, producono energia che viene utilizzata dallo spermatozoo per il mantenimento della motilità.
Danneggiamenti a livello mitocondriale portano pertanto ad una immobilizzazione della cellula.
La valutazione della funzionalità mitocondriale fornisce dati relativi allo stato metabolico della cellula.

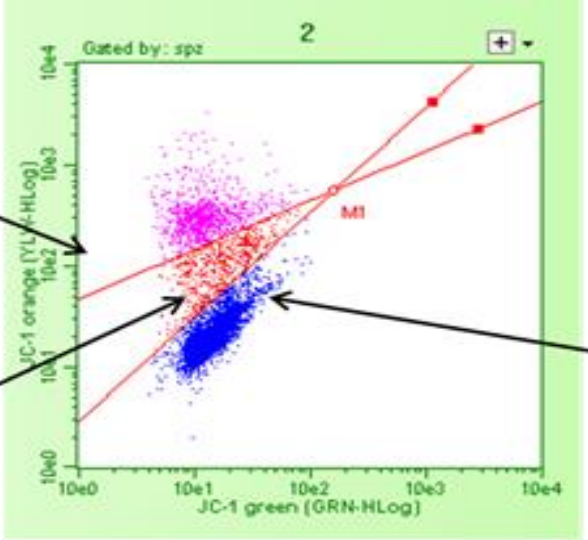


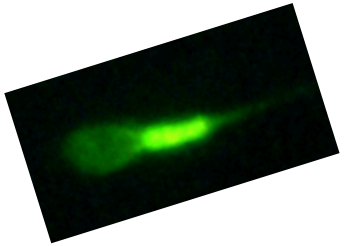
Vitali

Spermi con mitocondri polarizzati

Cellule in degenerazione

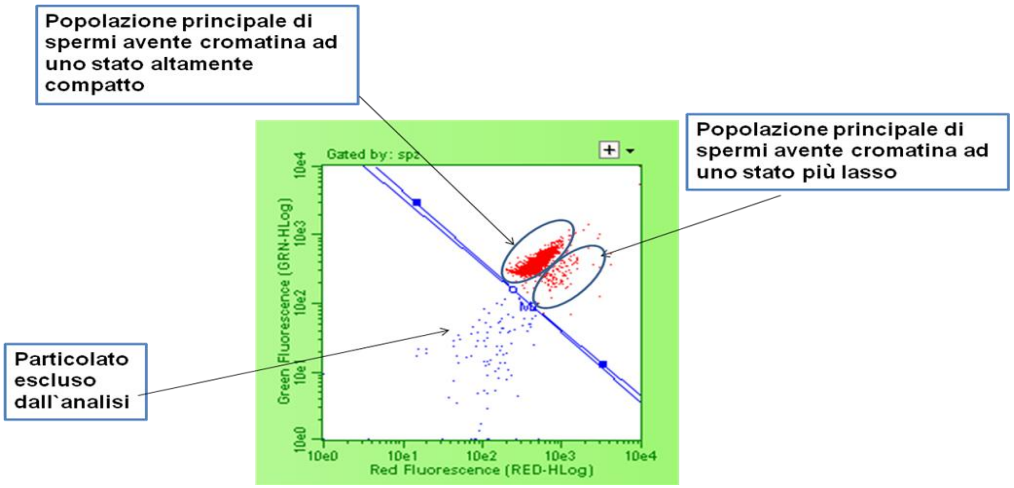
Spermi con mitocondri in depolarizzazione





Spermi con mitocondri depolarizzati

Cellule Morte

STATO DELLA CROMATINA

La cellula germinale maschile può essere considerata un "*corriere*" particolarmente efficiente del DNA salvaguardato dalla cromatina strutturalmente molto compatta protettiva dello stesso.