



**Attività scientifica svolta dall'IBBA CNR nell'ambito del Progetto: CHEESR -
Conservation, Health and Efficiency Empowerment of Small Ruminant
Giugno 2021**

L'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria ha svolto le attività principalmente nell'ambito dell'Azione 8: Gestione della variabilità genetica delle razze ovi caprine attraverso la scelta dei donatori da conservare nella Criobanca e lo sviluppo di protocolli per la raccolta e conservazione di materiale genetico rappresentativo delle razze.

L'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, nell'ambito del presente progetto, ha attivato n. 1 Assegno di Ricerca Professionalizzante – Dr. Christian Persichilli. A partire dal 26 settembre 2018, il Dr. Christian Persichilli ha iniziato la sua collaborazione all'interno del progetto con assegno di ricerca, per un importo lordo annuale di € 23.786.

Oltre ai costi per il personale sono state sostenute spese di missione e spese per materiale di consumo d'ufficio e di laboratorio per le attività descritte nell'Azione 8.

Nell'ambito dell'Azione 8, i cui obiettivi generali sono la corretta gestione della variabilità genetica delle razze di Libro Genealogico (LG) e Registro Anagrafico (RA) e la raccolta di materiale seminale dai 6 tipi genetici coinvolti: Pecora Istriana, Pecora Massese, Ovino delle Langhe, Pecora Gentile di Puglia, capra Garganica e capra Nicastrrese sono state svolte le seguenti attività:

Attività 8.1 Sviluppo attività presso la “Criobanca del Germoplasma Animale - Giuseppe Rognoni” a Lodi

In previsione dello stoccaggio di dosi raccolte dalle razze ovi-caprine italiane e della conseguente creazione della Criobanca delle razze ovicaprine italiane sono stati predisposti materiali ed attrezzature adeguati all'accoglimento di questa nuova Sezione all'interno della “Criobanca del Germoplasma Animale - Giuseppe Rognoni” già presente presso i laboratori dell'IBBA CNR di

Sede: Via Edoardo Bassini 15 - 20133 Milano (MI)

Tel. +39 02 23699 /402 Segreteria /430 Direzione /413 Amministrazione - Fax +39 0223699411

- U.O.S. di Lodi: c/o Parco Tecnologico Padano – Via Einstein, Località Cascina Codazza – 26900 Lodi (LO)*
- U.O.S. di Pisa: c/o Area della Ricerca di Pisa, Via Moruzzi, 1 – 56124 Pisa (PI)*
- U.O.S. di Roma: c/o Area della Ricerca di Roma 1, Via Salaria Km 29,300 – 00015 Monterotondo S. (RM)*

Lodi. In particolare sono stati predisposti 2 bidoni di azoto liquido per lo stoccaggio delle dosi raccolte nell'ambito del progetto CHEESR. Per mettere in sicurezza il materiale genetico, le dosi di ciascun riproduttore sono state suddivise in 2 bidoni differenti in modo che, in caso di rottura di uno dei due bidoni, sia sempre presente una duplicazione del materiale del riproduttore nell'altro bidone. In entrambi i bidoni sono state collocate delle sonde per il rilevamento della temperatura collegate ad un sistema di sicurezza che in caso di innalzamento della temperatura invia un messaggio di allarme via web e sui cellulari del personale IBBA affinché si possa intervenire prontamente per trasferire il materiale in un altro bidone così da mantenere il materiale in azoto liquido alla temperatura di -196° .

Attività 8.2 Sviluppo protocollo raccolta seme e formazione del Personale

Per l'assegnista in formazione è stato organizzato un training in laboratorio per l'acquisizione delle competenze tecniche e manuali necessarie all'estrazione degli spermatozoi epididimali. Nello specifico è stato effettuato l'addestramento per le seguenti attività: a) reperimento e preparazione dei testicoli; b) recupero degli spermatozoi dal dotto deferente e dalla coda dell'epididimo tramite la tecnica di "retrograde flushing"; c) valutazione della qualità del seme estratto in termini di concentrazione tramite camera di conta di Neubauer, motilità e parametri vitali (motilità totale e relativi parametri cinetici quali velocità media di spostamento degli spermatozoi, velocità curvilinea, velocità sulla linea retta, deviazione laterale della testa, frequenza delle oscillazioni della coda degli spermatozoi) tramite CASA (Computer Assisted Semen Analysis), vitalità tramite SYBR 14, un marcatore fluorescente di acidi nucleici, rilevata utilizzando un microscopio a fluorescenza. Inoltre è stata effettuata la formazione anche per il prelievo del materiale seminale in vivo, per il confezionamento del seme in paillettes e il congelamento su vapori di azoto. Quest'attività di formazione del personale è andata a buon fine e ha permesso di formare l'assegnista del Progetto per svolgere in autonomia tutte le operazioni di raccolta e congelamento del seme.

Attività 8.3 individuazione di un set di riproduttori maschi

Ai fini della scelta degli allevamenti e dei soggetti donatori della criobanca sono state utilizzate sia le informazioni anagrafiche messe a disposizione da Asso.Na.Pa (Associazione Nazionale della Pastorizia) che le informazioni recuperate dal Sistema Informativo Veterinario Nazionale (Anagrafe BDN). Queste informazioni sono state quindi incrociate tra loro creando una serie di statistiche relative sia alla numerosità degli animali in allevamento oltre che ad altri parametri oggettivi

utilizzati nella scelta (e.g., parentela tra i soggetti selezionati, numero di generazioni note in anagrafica per ciascun soggetto)

Sulla base dei risultati ottenuti, sono state scelte, fra le aziende proposte, quelle che effettivamente hanno conferito i riproduttori per la raccolta del materiale da conservare nella Criobanca. Ne sono risultate tabelle descrittive degli allevamenti contenenti le seguenti informazioni:

- Proprietario_AUA = codice proprietario
- MequiGen = numero medio di generazioni conosciute
- MPCl = Index of pedigree completeness (MacCluer et al, 1983)
- Minbreeding = inbreeding medio
- AZIE_DESCRIZIONE = nome completo azienda
- AZIE_PROPRIETARIO = proprietario
- AZIE_INDIRIZZO = indirizzo
- AZIE_LOCALITA = località
- AZIE_CAP = CAP
- AZIE_SIGLAPROV = provincia
- m = numero maschi vivi
- f = numero femmine vive
- tot = numero animali vivi totali

Sempre tramite R, attraverso l'uso delle *libraries* “ggmap” e “maps” sono stati ottenuti grafici su mappa che individuano geograficamente gli allevamenti e li classificano in base alle consistenze (Figure 1, 2, 3). Le aziende in cui è presente il maggior numero di capi sono rappresentate nei grafici dai cerchi che appaiono più grandi e sono da considerare le migliori candidate ai fini del progetto in quanto permettono di scegliere al loro interno un maggior numero di donatori: questi allevamenti hanno una maggiore possibilità di produrre più soggetti maschi con una più alta variabilità genetica.

Il procedimento sopra descritto è stato ripetuto per tutte le razze del progetto.

Successivamente si è proceduto all'elaborazione dei dati relativi gli animali di razza Massese presenti nel Centro Genetico di Ovinicoltura Asso.Na.Pa. di Asciano, il centro è stato scelto per il reperimento dei donatori in quanto al suo interno oltre a una buona consistenza di animali sono presenti linee di sangue ben distinte e di particolare valore genetico.

Analizzando i dati attraverso il software statistico R sono stati scelti i donatori presenti nel Centro Genetico di Ovinicoltura Asso.Na.Pa. di Asciano (SI) delle razze Massese e Comisana (sebbene

quest'ultima razza non sia fra quelle interessate dal progetto è stata utilizzata comunque per un rodaggio del protocollo precedentemente descritto).

Per ottimizzare la scelta dei donatori si è ricorso, oltre all'analisi dei dati, anche alla valutazione morfologica dei soggetti. Il fine di un doppio metodo di scelta degli animali è quello di assicurarsi che i donatori siano rispondenti ai seguenti criteri:

- donatori che siano rispondenti morfologicamente agli standard di razza;
- donatori che non siano parenti fra loro;

Per quanto riguarda la razza Massese per gli agnelli candidati al ruolo di futuri donatori è stato predisposto un protocollo per l'addestramento alla monta artificiale.

Nel mese di febbraio 2019 sono stati organizzati incontri con gli allevatori delle razze oggetto del progetto ed i tecnici delle ARA competenti in Puglia, Calabria e in Piemonte al fine di informare gli stessi riguardo agli obiettivi del progetto e chiedere la loro collaborazione nel reperimento di donatori utili alla costituzione della Criobanca.

Attività 8.4 Raccolta e stoccaggio dosi

Relativamente alla raccolta e stoccaggio di dosi di materiale seminale le attività sono state svolte in differenti step, di seguito sono riportate le attività nei vari step:

Step 1

Come prova preliminare da 4 arieti di razza Comisana provenienti dal Centro Genetico di Asciano (SI) e destinati al macello sono stati raccolti i testicoli presso il macello dell'Azienda Speciale Multiservizi del Comune di Val D'Elsa, Località Belvedere, 46, Colle di Val D'Elsa. I testicoli sono stati trasferiti quindi ai laboratori IBBA di Lodi. Da essi è stato estratto e valutato il materiale seminale tramite il metodo del "retrograde flushing". Si è quindi proceduto al controllo di qualità in termini di:

- concentrazione tramite camere di conta di Neubauer ;
- motilità determinata attraverso il sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis).

In base alla qualità del seme ottenuto, lo stesso è stato diluito con un extender commerciale (OVIXCell®), refrigerato 2 ore a + 5° e poi congelato su vapori di azoto. In questo modo sono state prodotte e conservate nella Criobanca n.179 paillettes corrispondenti ad una media di 44,75 dosi di seme per donatore, con un range che va da 5 a 100 dosi.

È stato inoltre prelevato e conservato un campione di sangue e un tampone nasale per ogni animale di cui si è conservato il seme come deposito del DNA dei donatori.

Ad ogni animale è stato assegnato un codice di 8 caratteri composto dalle prime due lettere del nome della razza (es. CO per la Comisana) e le ultime sei cifre della matricola. Questo codice è stato utilizzato per catalogare le paillettes, i campioni di DNA e le fotografie degli animali.

Tutte le informazioni riguardanti i donatori, il materiale genetico stoccato e la localizzazione dei campioni nei contenitori di azoto liquido sono state gestite tramite il software CryoWeb. Per ogni soggetto donatore è stata predisposta una scheda contenente i seguenti dati:

- Codice identificativo del donatore (descritto sopra)
- Numero di dosi raccolte
- Fotografia dell'animale
- Specie
- Razza
- Padre (se conosciuto)
- Madre (se conosciuta)
- Coordinate di geolocalizzazione dei campioni (esprese in longitudine e latitudine dell'allevamento di origine del donatore)
- Struttura (sito) dove sono conservate le dosi
- Indicazioni su altro materiale genetico conservato presso la Criobanca (es. Peli, sangue, tamponi nasali)

Le medesime procedure di valutazione del seme e di catalogazione dei dati relativi ad ogni donatore sono state ripetute per tutti i soggetti prelevati nel Progetto.

Massese. Presso il Centro Genetico di Asciano (SI), nel maggio 2019, il Medico Veterinario Aziendale, ha castrato 10 arieti di razza Massese, i testicoli sono stati trasportati al laboratorio IBBA di Lodi nelle 24 ore successive. Da questi testicoli è stato estratto il materiale seminale tramite il metodo del “retrograde flushing”. Si è quindi proceduto al controllo di qualità in termini di:

- concentrazione tramite camere di conta di Neubauer;
- motilità determinata attraverso il sistema Computer-Assisted Semen Analysis (CASA);
- vitalità tramite SYBR-14 e Ioduro di propidio;

Sono state prodotte n. 205 dosi di buona qualità con valori di motilità e vitalità mediamente al di sopra dell'80%. Le dosi sono state prodotte tramite diluizione con extender commerciale OVIXCell® al fine di ottenere paillettes da 0,5ml contenenti 300×10^6 spermatozoi.

È stato inoltre prelevato e conservato un campione di sangue e un tampone nasale per ogni animale

come deposito del DNA dei donatori.

Step 2

Nicastrese. Nel giugno 2019 è stata effettuata una missione in Calabria in cui sono stati raccolti diversi eiaculati da 2 riproduttori. Il materiale è stato trasportato ai laboratori IBBA di Lodi dove dopo una verifica della qualità sono state congelate e stoccate un totale di n. 70 dosi.

Nel settembre 2019 è stata effettuata una seconda missione nel Lametino in occasione della quale è stato prelevato materiale seminale in vivo da 10 becchi, il materiale prelevato è stato analizzato in campo per una prima verifica della qualità e quindi trasportato presso i Laboratori IBBA di Lodi dove il giorno seguente il materiale seminale è stato confezionato in paillettes, congelato e stoccato in criobanca. Dai prelievi in vivo sono state ottenute in totale 77 dosi di buona qualità.

Durante la medesima missione sono stati prelevati i testicoli da 6 becchi avviati al macello a fine carriera. I testicoli sono stati trasportati presso i laboratori IBBA di Lodi e il giorno successivo alla macellazione sono stati estratti gli spermatozoi epididimali tramite la tecnica del retrograde flushing precedentemente descritta. Il materiale così ottenuto è stato analizzato come descritto per gli altri prelievi e stoccato in criobanca sotto forma di paillettes. Dai prelievi di spermatozoi epididimali sono state ottenute 147 dosi di buona qualità, pertanto al termine del progetto sono state prodotte e stoccate in criobanca 294 dosi di materiale seminale da 16 becchi per la razza caprina Nicastrese.

Garganica. Nel giugno 2019 è stato prelevato materiale seminale da un becco di razza Garganica, il materiale è stato trasportato e valutato presso i laboratori IBBA e ha permesso di confezionare e stoccare n. 7 dosi di seme. Tra luglio e settembre dello stesso anno, sono state prodotte 77 dosi di razza Garganica, le dosi sono state prodotte sia da spermatozoi epididimali estratti da testicoli di un becco avviato al macello a fine carriera che da materiale seminale prelevato in vivo da 5 becchi di razza Garganica. Complessivamente per la razza Garganica sono state prodotte e stoccate 84 dosi da 6 becchi.

Step 3

Gentile di Puglia. Per la Gentile di Puglia le dosi sono state prodotte sia con materiale estratto da testicoli raccolti la macello e che con materiale raccolto in vivo. In dettaglio sono stati recuperati i testicoli di 11 arieti. Dopo l'estrazione, valutazione degli spermatozoi epididimali e confezionamento sono state congelate 162 dosi con una media di 14,7 dosi congelate per ariete. In questo gruppo di

animali si è osservata una grande variabilità nel numero di dosi prodotte per ariete con un massimo di 51 dosi per ariete ed un minimo di 1 dose per ariete, questa grande variabilità può essere dovuta all'età dei soggetti. Per quanto riguarda il materiale raccolto in vivo sono state prodotte 9 dosi da 5 arieti. In totale sono state congelate n. 171 dosi da 16 riproduttori.

Ovino delle Langhe. Per questa razza tutte le dosi sono state prodotte con spermatozoi epididimali raccolti da testicoli di arieti al macello. In totale tra il 2019 e il 2020 sono stati recuperati testicoli di 4 arieti che hanno consentito di produrre 92 dosi di seme.

Nella tabella seguente sono elencati i soggetti donatori stoccati nella “Criobanca delle razze ovi caprine italiane” raccolti nell'ambito del progetto CHEESR. Per ciascun soggetto oltre ai dati identificativi (specie, razza, matricola, sigla CNR) è anche indicata la tipologia di prelievo del materiale crioconservato (spermatozoi estratti da epididimo o da eiaculato raccolto in vivo), la data del prelievo, lo step (Step 1, 2 o 3) in cui è avvenuto il prelievo/stoccaggio e il numero di dosi prodotte.

Sigla CNR	Specie	Razza	Matricola	Tipologia prelievo	Data Prelievo	STEP	N. Dosi
CO1	Ovina	Comisana	IT052000987541	Epididimo	18/10/2018	1	69
CO2	Ovina	Comisana	IT052000987554	Epididimo	18/10/2018	1	5
CO3	Ovina	Comisana	IT052000987569	Epididimo	18/10/2018	1	100
CO4	Ovina	Comisana	IT052000987421	Epididimo	18/10/2018	1	5
MS1	Ovina	Massese	IT052000987710	Epididimo	15/05/2019	2	21
MS2	Ovina	Massese	IT052000987825	Epididimo	15/05/2019	2	7
MS3	Ovina	Massese	IT052000937645	Epididimo	15/05/2019	2	12
MS4	Ovina	Massese	IT052000937726	Epididimo	15/05/2019	2	14
MS5	Ovina	Massese	IT052000967356	Epididimo	15/05/2019	2	20
MS6	Ovina	Massese	IT052001007012	Epididimo	15/05/2019	2	21
MS7	Ovina	Massese	IT052000987821	Epididimo	15/05/2019	2	28
MS8	Ovina	Massese	IT052000967371	Epididimo	15/05/2019	2	11
MS9	Ovina	Massese	IT052000987809	Epididimo	15/05/2019	2	46
MS10	Ovina	Massese	IT052000987662	Epididimo	15/05/2019	2	25
GP1	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000217811	Epididimo	12/07/2019	3	2
GP2	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000217802	Epididimo	12/07/2019	3	3
GP3	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000218101	Epididimo	12/07/2019	3	1
GP4	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000218104	Epididimo	12/07/2019	3	2
GP5	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000217803	Epididimo	12/07/2019	3	2
GP6	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000219088	Epididimo	12/07/2019	3	2
GP7	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000219074	Epididimo	18/07/2019	3	47
GP8	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000219071	Epididimo	18/07/2019	3	4
GP9	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000219072	Epididimo	18/07/2019	3	5
GP10	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000484247	Epididimo	18/07/2019	3	51
GP11	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000219073	Epididimo	18/07/2019	3	43
GP12	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000486711	Eiaculato	12/09/2019	3	2
GP13	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000219075	Eiaculato	17/09/2020	3	1
GP14	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000219076	Eiaculato	17/09/2020	3	1
GP15	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000518386	Eiaculato	17/09/2020	3	3
GP16	Ovina	Gentile di Puglia	IT071000484241	Eiaculato	17/09/2020	3	2
GA1	Caprina	Garganica	IT071000361842	Eiaculato	09/06/2019	2	7
GA1	Caprina	Garganica	IT071000361842	Epididimo	18/07/2019	3	2
GA2	Caprina	Garganica	IT071000422197	Eiaculato	12/09/2019	3	13
GA3	Caprina	Garganica	IT071000469641	Eiaculato	12/09/2019	3	26
GA4	Caprina	Garganica	IT071000469643	Eiaculato	12/09/2019	3	4
GA5	Caprina	Garganica	IT071000422245	Eiaculato	12/09/2019	3	12
GA6	Caprina	Garganica	IT071000357522	Eiaculato	12/09/2019	3	20
OL1	Ovina	Delle Langhe	IT004000068376	Epididimo	10/09/2019	3	12
OL2	Ovina	Delle Langhe	IT004000074811	Epididimo	09/10/2019	3	11
OL3	Ovina	Delle Langhe	IT004000116755	Epididimo	24/10/2020	3	64
OL4	Ovina	Delle Langhe	IT004000103626	Epididimo	23/09/2020	3	5
NC01	Caprina	Nicastrese	IT079000155570	Eiaculato	20/06/2019	2	55
NC02	Caprina	Nicastrese	IT079000177469	Eiaculato	20/06/2019	2	15
NC01	Caprina	Nicastrese	IT079000155570	Epididimo	18/09/2019	3	14
NC03	Caprina	Nicastrese	IT079000087103	Epididimo	18/09/2019	3	27
NC04	Caprina	Nicastrese	IT079000153357	Epididimo	18/09/2019	3	12
NC06	Caprina	Nicastrese	IT079000155388	Epididimo	18/09/2019	3	5
NC07	Caprina	Nicastrese	IT079000087101	Epididimo	18/09/2019	3	66
NC08	Caprina	Nicastrese	IT079000135232	Epididimo	18/09/2019	3	23
NC09	Caprina	Nicastrese	IT079000146046	Eiaculato	18/09/2019	3	13
NC10	Caprina	Nicastrese	IT079000146039	Eiaculato	18/09/2019	3	5
NC11	Caprina	Nicastrese	IT079000153327	Eiaculato	18/09/2019	3	5
NC12	Caprina	Nicastrese	IT079000082086	Eiaculato	18/09/2019	3	4
NC13	Caprina	Nicastrese	IT079000172577	Eiaculato	18/09/2019	3	10
NC15	Caprina	Nicastrese	IT079000177470	Eiaculato	18/09/2019	3	10
NC16	Caprina	Nicastrese	IT079000177547	Eiaculato	18/09/2019	3	8
NC17	Caprina	Nicastrese	IT079000177469	Eiaculato	18/09/2019	3	8
NC18	Caprina	Nicastrese	IT079000177548	Eiaculato	18/09/2019	3	12
NC19	Caprina	Nicastrese	IT079000177549	Eiaculato	18/09/2019	3	2

Figura 1: Localizzazione e consistenze Allevamenti Gentile di Puglia

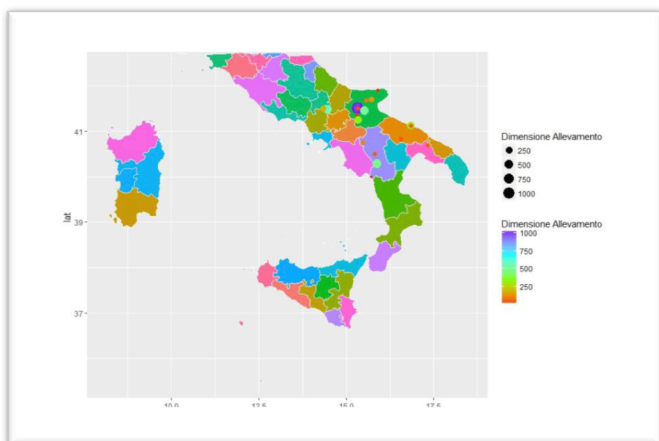


Figura 2: localizzazione e consistenze Allevamenti Garganica

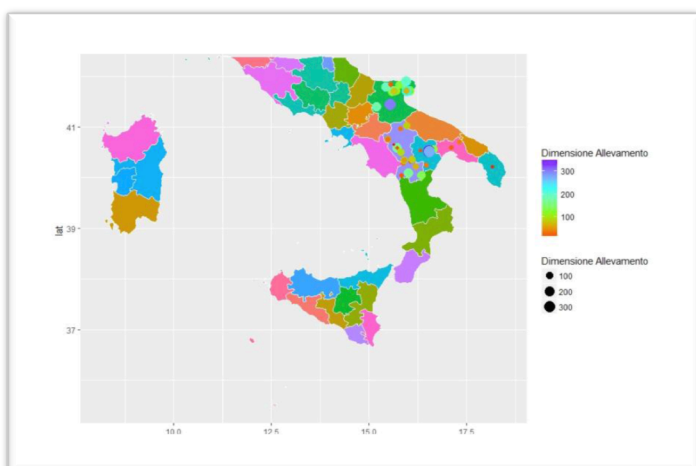


Figura 3: localizzazione e consistenze razza Nicastrese

