

Allegato n. 2 al Decreto Direttore Gestioni Agricole n. 110 del 11/12/2018

Terre Regionali Toscane

LR 64/04 “Tutela e valorizzazione del patrimonio di razze e varietà locali di interesse agrario, zootecnico e forestale”

***Linee guida per la corretta conservazione “ex situ” del
germoplasma animale autoctono della Toscana***

Indice

Introduzione

1. Tecniche di conservazione

2. La crioconservazione

2.1 Cosa conservare 2.2 Come e quanto conservare

3. Operatività di una sezione della banca regionale del germoplasma animale (BRG)

3.1 Attivazione di una sezione

3.2 Attrezzature

3.3 Requisiti degli animali

3.4 Trattamenti post-raccolta

3.5 Ricevimento delle dosi di seme e degli embrioni e stoccaggio

3.6 Accesso al/i locale/i di stoccaggio ed al materiale genetico

*3.7 Controllo della funzionalità dei contenitori criogenici e
del livello di azoto liquido*

*3.8 Tenuta di un registro di carico e scarico del materiale genetico
e gestione di database informatizzato*

3.9 Uscita del materiale dalla sezione della BRG animale

3.10 Deperimento del materiale genetico conservato

Bibliografia

Introduzione

Le popolazioni animali si sono differenziate nel tempo attraverso processi di isolamento genetico, deriva genetica, selezione o mutazione. Per ogni singola popolazione è possibile individuare obiettivi di conservazione specifici e differenziati, per il cui conseguimento ci si può avvalere delle tecniche di conservazione di volta in volta più idonee (in situ, ex situ o una combinazione di esse). La valutazione della variabilità genetica può fornire un utile strumento di indagine per l'individuazione di adeguate strategie nella corretta gestione di popolazioni caratterizzate da ridotta variabilità genetica e limitato effettivo numerico. In tal senso, oltre all'approccio genealogico, gli strumenti forniti dalla biologia molecolare consentono di approfondire le conoscenze relative al livello di variabilità ed alla stratificazione genetica delle popolazioni. Gli studi più recenti, realizzati mediante tecniche di indagine genomica consentono di integrare le informazioni genealogiche relative alla struttura genetica presente in seno ad una popolazione; ciò permette di raggiungere elevati livelli di accuratezza nella stima dei principali parametri demografici/genetici che, soprattutto per popolazioni a contenuto effettivo numerico, quali quelle oggetto di queste "Linee Guida", costituiscono gli indicatori fondamentali per la verifica di una corretta gestione delle risorse disponibili. L'adozione di strategie ottimali di selezione rappresenta, infatti, un requisito fondamentale per il recupero, la salvaguardia e la valorizzazione delle popolazioni locali e, con esse, dell'insieme di valori socio-economici, storico-culturali ed ecologici associati alla loro attività di utilizzazione primaria.

L'esigenza di salvaguardia della variabilità genetica nasce:

- dalla necessità di conservare forme alleliche utili anche in sistemi di allevamento attenti al benessere animale;
- al fine di preservare variabilità utile nei confronti di una possibile diversa gestione degli obiettivi selettivi;
- per motivazioni di ordine storico e culturale e sociale.

Le azioni generali da intraprendere in un piano di conservazione genetica devono prevedere:

- (I) La caratterizzazione della variabilità genetica delle razze allo studio, evidenziandone peculiarità e potenzialità in termini di contributo al mantenimento della biodiversità.
- (II) Il monitoraggio dei parametri demografici e la valutazione dei rischi conseguenti da elevati livelli di inbreeding.
- (III) L'adozione di strategie di conservazione del materiale genetico (DNA Genomico, ovuli e sperma).
- (V) Lo sviluppo di azioni di sostegno per la sensibilizzazione e l'educazione alla conservazione della variabilità genetica, funzionale al benessere animale e l'adozione di politiche e strumenti

normativi appropriati, il coinvolgimento e la ricerca di sinergie tra tutte le parti in causa (privati, associazioni di razza, mondo accademico).

Per molte specie animali da reddito e da compagnia, nel primo decennio degli anni 2000 sono stati portati a termine progetti di sequenziamento con il risultato di individuare milioni di nuovi polimorfismi.

I marcatori Genomici Microsatelliti negli ultimi 20 anni sono stati ampiamente utilizzati per la caratterizzazione e lo studio della variabilità genetica delle popolazioni animali a rischio di estinzione. Il loro polimorfismo ha permesso la caratterizzazione della struttura genetica delle singole popolazioni, la stima della variabilità genetica residua ed il calcolo delle distanze genetiche tra le diverse popolazioni locali, nazionali e commerciali internazionali. Informazioni ancora più accurate possono essere fornite per gli stessi obiettivi sopra elencati dai marcatori genomici di ultima generazione i Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). La raccolta di milioni di SNPs all'interno di database pubblici ha, di pari passo, determinato un rapido miglioramento della tecnologia di genotipizzazione dei marcatori SNPs e ciò ha reso possibile lo sviluppo e la commercializzazione di un high - density genome-wide SNP microarray.

Tali marcatori hanno permesso di costruire un'estesa mappa della Variabilità Genetica delle popolazioni animali nazionali e database internazionali consultabili che offrono l'opportunità di poter ottenere informazioni sempre più dettagliate in relazione alla stima della variabilità genetica delle popolazioni a rischio di estinzione. Non solo, ma tali informazioni ci permettono anche a capire quale possa essere stata l'impronta della selezione naturale ed antropica sull'attuale genoma di popolazioni animali autoctone perfettamente adattate all'ambiente in cui si sono costituite ed in cui attualmente vivono. Queste informazioni ci forniscono un importante mezzo per salvaguardare e tutelare le popolazioni animali reliquia ma anche di valorizzarle per quelle caratteristiche peculiari che le rendono uniche e capaci di integrarsi nelle realtà locali della Regione Toscana e di poter diventare anche produttive.

1. Tecniche di conservazione

Le tecniche di conservazione delle risorse genetiche animali si dividono in due categorie: *in situ* ed *ex situ* (FAO, 2006).

Le presenti linee guida si riferiscono alle tecniche di conservazione *ex situ* delle risorse genetiche animali, in particolare mediante la crioconservazione che avviene attraverso la conservazione di materiale genetico congelato (cellule aploidi: materiale seminale, ovuli; cellule diploidi: embrioni; sequenze di DNA). Altri metodi di manipolazione genetica, come ad esempio l'uso di tecniche di

DNA ricombinante, rappresentano strumenti utili per lo studio o il miglioramento delle razze, ma non sono riconducibili a tecniche di conservazione *ex situ* propriamente dette.

Le tecniche *ex situ*, e, nello specifico, la crioconservazione sono in molti casi uno strumento potente e sicuro per la salvaguardia delle risorse genetiche animali di interesse zootecnico (RGA). E' quindi ragionevole far sì che ci sia un'integrazione delle due tecniche, *in-* ed *ex-situ*, a seconda dei casi, e che quelle *ex situ* siano sempre complementari a quelle *in situ*. Se con queste ultime, infatti, sarebbe teoricamente possibile conseguire tutti gli obiettivi di conservazione, molto spesso non esistono condizioni socio-economiche, culturali o ecologiche tali da permetterne l'impiego. In questi casi, la scelta ricadrà su quelle *ex situ*, nonostante i rischi ad esse connesse. Le tecniche *ex situ*, infatti, non offrono opportunità di sviluppo socio-economico degli allevatori locali, perché richiedono l'allontanamento degli animali dalle zone di origine; le popolazioni allevate *ex situ* sono generalmente meno numerose rispetto a quelle *in situ* e maggiormente esposte a deriva genetica; infine, la crioconservazione "congela" anche i naturali processi evolutivi di una razza.

2. La crioconservazione

Queste linee guida si basano sulle "Guidelines for cryoconservation of animal genetic resources" della FAO (2011).

Scopo delle presenti linee guida è fornire le indicazioni per conseguire gli obiettivi di una banca del germoplasma animale, che vengono così individuati:

1. "back up" delle popolazioni conservate in vivo, in caso di problemi genetici (ad esempio perdita di diversità allelica, inbreeding, comparsa di combinazioni geniche negative, etc.), aumento della popolazione effettiva e riduzione della deriva genetica,
2. ricostruzione di razze estinte o allo stato di reliquia,
3. sviluppo di nuove linee/razze per riorientare l'evoluzione o la selezione in caso di perdita di caratteristiche importanti,
4. ricerca e sperimentazione.

Questi obiettivi sono applicabili nel breve, medio e lungo periodo, sia a razze a bassa numerosità o a rischio di estinzione (obiettivi 1, 2, 3 e 4), sia a razze ad elevata numerosità e non minacciate (obiettivo 3 e 4).

In generale, il volume di materiale genetico stoccato dovrà essere il minore possibile, ma, al tempo stesso, contenere la massima diversità.

2.1 Cosa conservare

La conservazione del maggior numero di razze (ad ampia o limitata diffusione, ad elevato o ridotto rischio di estinzione) e della loro diversità genetica, sono, al tempo stesso, obiettivi e criteri da utilizzare nella scelta del materiale da stoccare.

Per ottimizzare la diversità genetica conservata in una banca del germoplasma, è possibile utilizzare le indicazioni fornite dalla “strategia della massima diversità” (le razze vengono scelte in base al loro contributo nel mantenimento della diversità genetica complessiva, senza però tenere conto della diversità all’interno di ogni razza) o, meglio, le indicazioni della “strategia della massima utilità”, descritte nelle “Linee guida per la conservazione e la caratterizzazione della biodiversità animale di interesse per l’agricoltura” di cui al decreto del Ministro delle politiche agricole alimentari e forestali 6 luglio 2012, *G.U.* n. 171 del 24 luglio 2012. Ciò è ancor più necessario qualora, come auspicabile, la crioconservazione funga da supporto a programmi di salvaguardia *in situ*, nei quali siano stati individuati gli obiettivi di conservazione delle diverse razze, in funzione delle loro caratteristiche.

È peraltro importante ricordare che molte delle razze a consistenza limitata (per diverse specie) presenti sul territorio toscano posseggono un registro anagrafico e la conservazione della diversità genetica delle stesse è demandata all’Associazione Italiana Allevatori per tramite dell’Associazione Regionale. L’applicazione della strategia della massima diversità per queste popolazioni dovrà quindi essere garantita solo all’interno di ogni singola razza registrata e non a livello di specie.

Tipo e quantità di materiale da stoccare dipendono, quindi, dagli obiettivi di conservazione, ma anche dai fondi disponibili, dai vincoli esistenti e dalla disponibilità di materiale biologico.

La scelta dei soggetti da includere nella banca del germoplasma dovrà essere fatta in modo da garantire il mantenimento della variabilità genetica esistente e minimizzare la consanguineità delle future generazioni. Potrà inoltre essere presa in considerazione l’opportunità di salvaguardare particolari linee di sangue non utilizzate al momento ma portatrici di diversità genetica.

Per gli scopi prima ricordati si potranno sfruttare le informazioni derivanti da studi di genetica molecolare (se presenti) o le informazioni derivabili dai registri anagrafici delle popolazioni.

In presenza delle sole informazioni di pedigree la scelta dei soggetti da includere si dovrà basare sulla strategia della minimizzazione della parentela media tra gruppi di prescelti, mentre in presenza di informazioni molecolari si potrà determinare la reale condivisione di alleli e la parentela potrà essere stimata condizionandola alle informazioni da marcatori (Ballou e Lacy, 1995; Caballero e Toro, 2000; Toro e Caballero, 2005).

In assenza di questo tipo di informazioni la scelta potrà essere basata sulle informazioni disponibili presso gli allevatori (i.e. fenotipo e storia della loro mandria/gregge, considerando i possibili incroci, passati o recenti, con altre razze) cercando ove possibile di rappresentare la diversità genetica presente (es. campionando soggetti nel maggior numero di aziende possibili).

2.2 Come e quanto conservare

Il germoplasma conservato (“*in situ*” e “*ex situ*”) deve essere tale da impedire un aumento eccessivo della consanguineità in generazioni successive. Per recuperare una razza in caso di calamità attraverso l’utilizzo di seme congelato occorrerebbe quindi stoccare il seme di un numero elevato di maschi, in modo di avere una buona probabilità di conservare gli alleli infrequenti. Questa probabilità è del 63% e dell’87% con il congelamento, rispettivamente, del seme di 50 e 100 maschi. Questo

numero implica però costi molto elevati, viene quindi suggerito, per ricostituire una razza, di stoccare il seme di 25 maschi che rispettino le condizioni prima ricordate di minimizzazione della parentela oppure embrioni da 25 coppie diverse. Il numero di dosi inseminanti o embrioni dipende dall'efficienza riproduttiva della specie e la migliore efficacia dei programmi di conservazione viene ottenuta con il contemporaneo stoccaggio di seme ed embrioni, che conservano anche il DNA mitocondriale materno, altrimenti perso (FAO, 2012).

Per ricostituire una razza, le linee guida della FAO prevedono, quindi, la conservazione di:

- Seme di 25 maschi non parenti
- Embrioni (o cellule somatiche, oggi poco utilizzabili) provenienti da 25 maschi e 25 femmine
- DNA proveniente da 40-50 soggetti (possibilmente 25 per sesso)

Anche l'European Regional Focal Point for Animal Genetic Resources (ERFP, <http://www.rfpeurope.org/>) ritiene che già la conservazione del seme di 25 maschi non parenti possa essere sufficiente. Benché quindi questi numeri siano ritenuti ciò a cui si deve tendere, viste le difficoltà economiche nel creare e gestire banche del germoplasma, è considerata una migliore strategia avere pochi maschi per ciascuna delle diverse razze piuttosto che molti maschi di 1-2 razze (FAO, 2012).

Il numero di dosi di seme da stoccare per soggetto dipende dall'efficienza riproduttiva della singola specie (percentuali di gravidanza e numero di nati con seme congelato). L'obiettivo che richiede la maggiore quantità di materiale seminale è quello della ricostruzione della razza (intesa come 25 maschi e 25 femmine, ottenuti dopo 4 o 5 generazioni) nel caso di una sua estinzione; gli altri obiettivi necessitano di un numero inferiore di dosi. La determinazione del numero delle dosi da stoccare è funzione della specie di riferimento, del numero di femmine fondatrici disponibili e della percentuale di successo delle inseminazioni e le Linee Guida della FAO (2012), a cui si dovrà fare riferimento, riportano la quantità di seme necessario in funzione di tali parametri.

A titolo indicativo, secondo il sito italiano del Network delle Criobanche delle Risorse Genetiche Animali (<http://www.genrescryonet.unimi.it/>) nel bovino o cavallo, nei piccoli ruminanti e nel suino, sarebbero necessarie rispettivamente 700, 400 e 130 dosi inseminanti per la ricostruzione della razza. Questo numero di dosi dovrebbe essere raddoppiato (e quindi saranno necessarie rispettivamente 1400, 800 e 260 dosi) per creare due siti/collezioni di stoccaggio al fine di controllare i rischi associati a eventi catastrofici (rottura dei bidoni di stoccaggio del seme, incendi, ecc).

I 25 animali donatori devono contribuire in modo omogeneo al totale delle dosi e quindi, a titolo indicativo, andrebbero stoccate per il bovino/cavallo, piccoli ruminanti e suino circa 55, 30 e 10 dosi per donatore (la FAO suggerisce di aumentare queste quantità del 50%, e quindi 85, 45, 15), da dividere in due siti. Per l'asino, non presente nelle tabelle FAO, in considerazione della più bassa percentuale di gravidanza rispetto a bovini ed equini, si suggerisce lo stoccaggio di 2000 dosi complessive (Rota et al. 2012).

Il raggiungimento delle 2000 dosi sarebbe comunque auspicabile in tutte le specie (FAO, 2012). Benché, come detto precedentemente, il numero di soggetti maschi da includere nella banca

dovrebbe essere di 25, per alcune razze (es. equini: Monterufolino e Appenninico, bovini: Pontremolese, Gafagnina, Calvana) il ridotto numero di maschi riproduttori viventi potrebbe non rendere possibile il raggiungimento di questi obiettivi.

Tabella 1: Riepilogo delle dosi di seme provenienti da almeno 25 maschi necessarie per ricostituire una razza nelle diverse specie.

Bovini ed Equini	1400 dosi (ottimale 2100, 85 per maschio; Bovini: 2100 paillettes, Equini: 16800 paillettes)
Ovini e Caprini	800 dosi (ottimale 1125, 45 per maschio)
Suini	260 dosi (ottimale 375, 15 per maschio)
Asini	2000 dosi (ottimale 3000, 120 per maschio; 24000 paillettes)

Come supporto agli allevatori, ovvero alla conservazione “in situ”, occorre scegliere e rendere disponibile materiale da soggetti poco in relazione con la popolazione esistente, mettendo a disposizione più variabilità possibile. L’uso del materiale e degli animali per ricerca è anch’esso auspicabile, in quanto questo aiuterà indirettamente gli allevatori (FAO, 2012).

Le procedure per un adeguato congelamento sono oggi ben definite. In particolare:

- per il seme, nonostante siano in corso di sperimentazione nuove tecnologie, è consigliabile utilizzare procedure consolidate, oggi disponibili per bovini, equini, suini, ovini, caprini, conigli e polli. Per animali allevati prevalentemente al pascolo, è possibile il prelievo post-mortem di spermatozoi dall’epididimo sia per IA (ovi-caprini) che per IVF (bovini, suini e ovi-caprini);
- per gli embrioni, il congelamento lento e la vitrificazione, così come il flushing e l’ET, sono ormai operazioni routinarie nei bovini; nei suini è possibile raccogliere embrioni alla macellazione. Metodi adeguati sono anche disponibili per ovini, equini e conigli;
- il congelamento di oociti non è consigliabile, in quanto le procedure non sono ancora del tutto consolidate;
- le cellule somatiche possono essere conservate se non esistono altre soluzioni, o in aggiunta alla conservazione del seme e degli embrioni. Il loro uso sarà probabilmente maggiore in futuro, attraverso il miglioramento dei metodi di clonazione.

La banca del germoplasma dovrebbe essere distinta in *una collezione (o sezione) centrale*, da usare solo in condizioni di emergenza ma non necessariamente statica (occorre rivitalizzare le collezioni man mano che la popolazione cambia), *una collezione (o sezione) storica*, che comprende le dosi che non sono più indispensabili in quanto sostituite da dosi successive (occorre decidere se conservare o distruggere queste dosi), *una collezione (o sezione) di lavoro*, dinamica, da utilizzare

per ricerca e selezione, ed *una collezione (o sezione) di valutazione*, rappresentata da 2-10 paillettes/soggetto prodotte per essere utilizzate per test di qualità.

Come ricordato precedentemente, la conservazione di embrioni in associazione a quella del seme (un esempio in Tabella 2), benché aumenti i costi, aumenta l'efficacia del recupero di una razza completamente estinta in quanto permette di avere anche delle femmine "pure" da cui avere in seguito dei prodotti da seme congelato già puri, senza che sia necessario l'utilizzo di 4-5 generazioni per ottenerli (FAO, 2012). Con la crioconservazione degli embrioni, inoltre, viene salvaguardato il DNA mitocondriale femminile e viene ridotto il numero dei maschi dai quali crioconservare il seme.

Tabella 2: identificazione delle dosi di seme delle razze autoctone toscane che sarebbe opportuno conservare per poter ricostituire una razza, con l'utilizzo di embrioni crioconservati (il 20% degli embrioni necessari perché, da soli, possano ricostruire una razza).

SPECIE	RAZZA	DOSI DI SEME DA CONSERVARE (n° maschi)	EMBRIONI DA CONSERVARE (n° femmine)
Bovini	Calvana	682 (20)	86 (5)
	Garfagnina	682 (20)	86 (5)
	Pisana	682 (20)	86 (5)
	Pontremolese	682 (20)	86 (5)
Ovini	Garfagnina Bianca	198 (20)	86 (5)
	Pomarancina	198 (20)	86 (5)
	Zerasca	198 (20)	86 (5)
Caprini	Capra della Garfagnana	198 (20)	86 (5)
Equini	Cavallo Appenninico,	682 (20)	86 (5)
	Cavallo Maremmano	682 (20)	86 (5)
	Monterufolino	682 (20)	86 (5)
Asini	Asino dell'Amiata	1000 (20)	86 (5)

Oltre a seme ed embrioni, vi sono strategie di recupero delle razze che prevedono la crioconservazione di oociti e quella di tessuti. Attualmente, però, la crioconservazione di seme ed embrioni garantisce la maggiore probabilità di successo in quanto le tecniche di fecondazione in vitro a partire da oociti e seme congelato e le tecniche per clonare a partire dai tessuti non sono sufficientemente efficienti (FAO, 2012; Gandini et al, 2007).

Considerato che i numeri descritti rappresentano l'ottimale a cui tendere, per l'attivazione di una sezione della Banca Regionale Germoplasma Animale potranno essere accettati anche numeri inferiori, ma non al di sotto delle 30 dosi di seme per ciascuna razza, anche in relazione al numero di riproduttori esistenti.

3. Operatività di una sezione della banca regionale del germoplasma animale (BRG)

3.1 Attivazione di una sezione

Una sezione della banca del germoplasma si configura essenzialmente come un Recapito, l'autorizzazione per gestire il quale va richiesta come descritto nelle "Disposizioni operative per l'attuazione della normativa unionale e nazionale in materia di riproduzione animale" (delibera di Giunta Regionale Toscana n. 385 del 30 marzo 2015). Una Banca del Germoplasma può essere fisicamente separata dal laboratorio dove viene preparato il materiale crioconservato, ma deve soddisfare i requisiti ed adempiere agli obblighi previsti per un recapito nel D.M. 19 luglio 2000, n° 403. La struttura deve disporre di appositi locali dotati d'aspiratori dei fumi d'azoto, pareti lavabili e servizi igienici nonché di contenitori idonei alla conservazione del materiale seminale e degli embrioni confezionati. Poiché il materiale genetico va protetto con cura, l'accesso ai locali dovrà essere controllato.

3.2 Attrezzature

Il materiale genetico viene conservato in contenitori che utilizzano, come liquido criogenico, azoto liquido. Le dimensioni ed il numero dei contenitori dipendono dalla quantità di materiale che si intende conservare. E' stato stimato che sono necessari, per conservare 50-100 dosi inseminanti di ciascuno di 25 riproduttori ed una quota di embrioni per ciascuna razza, 2 contenitori criogenici del volume di circa 40 litri di azoto per le specie bovina, ovi-caprina e suina e 4 contenitori criogenici per la specie equina (Repertorio giustificativi premi PSR 2014-2020). L'azoto liquido si trasforma in gassoso attraverso l'evaporazione e fuoriesce dai contenitori, determinando un lento ma continuo abbassamento del livello di azoto al loro interno che rende necessari periodici controlli e reintegrazioni di azoto. Si suggerisce l'installazione di allarmi del livello basso di azoto liquido. L'azoto liquido è un materiale pericoloso e devono quindi essere prese precauzioni particolari sia durante il lavoro che nella pianificazione dei locali di stoccaggio. I pericoli sono congelamenti od ustioni della pelle per contatto ed ipossia. È necessario quindi utilizzare guanti e camici di protezione, oltre a protezioni per gli occhi. I campioni presenti nella banca andranno manipolati con speciali pinze. Una fuoriuscita di liquido determina la riduzione dell'ossigeno nell'aria, specie in prossimità del pavimento, ed è quindi pericolosa per le persone coinvolte nel riempimento dei bidoni, nell'introduzione o nella rimozione di campioni dalla banca, o semplicemente al lavoro nell'area circostante in quanto queste potrebbero andare incontro a fenomeni di asfissia (FAO, 2012). Per questo motivo la creazione di un sistema di ventilazione deve essere una priorità nella progettazione di un locale per lo stoccaggio del materiale crioconservato. Devono essere presenti una o più ventole a livello del pavimento che portino all'esterno l'azoto gassoso (che si deposita verso il basso) e dei condotti o finestre possibilmente vicino al soffitto che permettano l'ingresso di aria dall'esterno (FAO, 2012). Si suggerisce anche l'installazione di sensori per l'ossigeno.

3.3 Requisiti degli animali

I requisiti degli animali il cui materiale seminale, oociti od embrioni possono essere introdotti in una banca del Germoplasma animale sono descritti nel D.M. 19 luglio 2000, n° 403 e successive modifiche ed integrazioni. In sintesi, i riproduttori maschi della specie bovina, bufalina, suina, ovina, caprina e equina, per essere adibiti alla riproduzione, devono risultare iscritti al Libro Genealogico o al Registro Anagrafico e devono essere identificati secondo la normativa vigente.

Oltre a ciò, i riproduttori devono soddisfare i requisiti sanitari descritti nel D.M. 19 luglio 2000, n° 403 e successive modifiche ed integrazioni.

La raccolta e le procedure di crioconservazione del materiale seminale si possono svolgere solo presso un centro di produzione di sperma ufficialmente autorizzato ai sensi della normativa vigente in materia. In caso si intenda ottenere materiale seminale da riproduttori di razze autoctone e tipi genetici a limitata diffusione, ai sensi della vigente normativa in materia, è consentita la raccolta del materiale seminale direttamente in allevamento, ma i procedimenti di valutazione e crioconservazione si debbono comunque svolgere presso il centro autorizzato. Una procedura simile deve essere messa in atto per i riproduttori equidi di interesse locale, come descritto dalle succitate disposizioni operative.

3.4 Trattamenti post-raccolta

Materiale seminale, oociti ed embrioni introdotti nella banca dovranno provenire da strutture autorizzate alla loro produzione ai sensi del D.M. 19 luglio 2000, n° 403. Le metodiche per la conservazione descritte in letteratura sono numerose, quindi saranno scelte di volta in volta quelle ritenute adeguate dal produttore, purché il prodotto finale abbia una qualità sufficiente per l'utilizzo. La descrizione di procedure consigliate per la crioconservazione e lo scongelamento di seme, embrioni, oociti ed altri tessuti per le diverse specie zootecniche è presente in FAO, 2012. Trattandosi però di metodiche in continua evoluzione potranno essere impiegati anche altri metodi purché positivamente testati in letteratura scientifica.

3.5 Ricevimento delle dosi di seme e degli embrioni e stoccaggio

Oggetto di conservazione della Sez. della BRG animale sono le razze inserite nel repertorio delle risorse genetiche animali della Regione Toscana. Il materiale inserito nella banca dovrà essere indicato sul registro di carico e scarico e aggiunto all'inventario. Il materiale acquisito dovrà rispettare le caratteristiche indicate dal DM 19 luglio 2000, n. 403 "Nuovo regolamento di esecuzione della legge 15 gennaio 1991, n. 30, concernente disciplina della riproduzione animale", ovvero essere stato prodotto da Centri di Produzione riconosciuti e da animali la cui identificazione ed il cui stato sanitario sono stati certificati. Per le razze autoctone e per i tipi etnici a limitata diffusione ci si può avvalere delle deroghe previste dall'art. 20 del DM 19 luglio 2000, n. 403 (produzione del seme in azienda).

Occorrerà innanzitutto controllare che i documenti a corredo del seme siano completi. Per il seme devono essere indicati specie, nome e matricola del riproduttore, data di congelamento, centro di produzione di provenienza, autocertificazione del produttore con valutazione di motilità progressiva e concentrazione spermatica nella paillette; per gli embrioni devono essere indicati specie, nome e matricola dei genitori, data di congelamento, centro di produzione di provenienza. Al ricevimento, le dosi di seme o embrioni dovranno essere trasferite in tempo reale nei bidoni di stoccaggio. Dopo aver posto il bidone di trasporto (es. dry shipper) nell'immediata vicinanza del bidone di stoccaggio, questo verrà aperto per controllare la presenza di azoto liquido e che il contenuto sia ancora congelato. Dopo aver riempito le gobelet contenenti il materiale con una piccola quantità di azoto liquido, queste verranno poste all'interno del bidone di stoccaggio e la loro posizione nel bidone sarà annotata.

3.6 Accesso al/i locale/i di stoccaggio ed al materiale genetico

Lo stoccaggio del materiale genetico deve avvenire in ambiente protetto e la custodia del materiale è una responsabilità della sezione della Banca, che ha l'impegno a detenere il materiale genetico depositato esclusivamente a scopo di conservazione, e a rispettare le procedure indicate nelle linee guida e atti nazionali e internazionali in materia..

3.7 Controllo della funzionalità dei contenitori criogenici e del livello di azoto liquido

I contenitori criogenici, del tipo adeguato alla conservazione del germoplasma animale, dovranno essere posti in locale asciutto e ventilato, dove possano essere ispezionati frequentemente. I bidoni vanno riempiti di azoto liquido con regolarità. Il livello dell'azoto dovrà essere controllato una volta alla settimana ed i valori dovranno essere annotati su apposito registro. È buona norma riempire i bidoni quando sono a metà capacità ed il livello non dovrà comunque mai scendere sotto i 10 cm. Nel registro dovrà essere annotata anche la data di ciascun riempimento dei bidoni.

3.8 Tenuta di un registro di carico e scarico del materiale genetico e gestione di database informatizzato

La banca dovrà tenere un registro di carico e scarico, come indicato dal DM 19 luglio 2000, n. 403 "Nuovo regolamento di esecuzione della legge 15 gennaio 1991, n. 30, concernente disciplina della riproduzione animale" per i Recapiti, assolvendo tutti gli obblighi previsti. Oltre a ciò la Banca dovrà tenere un inventario aggiornato, redatto sulla base del modello predisposto dall'Ente, dove, oltre a specie, razza, tipo di materiale conservato e quantità, dovranno essere registrati caratteristiche della confezione (es. colore delle paillettes) e le informazioni necessarie per localizzare il materiale nei contenitori criogenici (numero bidone e canister, colore gobelet).

3.9 Uscita del materiale dalla sezione della BRG animale

Per lo spostamento del materiale crioconservato dovranno essere utilizzati bidoni da trasporto. I dry shipper sono da preferire per la spedizione del materiale congelato. Prima di inserirvi il materiale, i dry shipper dovranno essere riempiti con azoto liquido, avendo cura di pesarli prima e dopo il riempimento in modo da conoscere la quantità di azoto presente al loro interno, che dovrà corrispondere alla quantità di azoto indicata dal produttore del dry shipper stesso.

Dopo aver riempito il dry shipper come indicato al punto precedente, il passaggio del materiale dal bidone di stoccaggio al dry shipper dovrà essere molto rapido, con le paillettes contenute in una gobelet contenente azoto liquido e non esponendole all'esterno del bidone per più di pochi secondi. Solo in casi eccezionali e per brevi spostamenti potranno essere utilizzati altri bidoni da trasporto di piccole dimensioni, contenenti una adeguata quantità di azoto liquido. Il materiale rimosso dalla banca dovrà essere scaricato dal registro di carico e scarico e rimosso dall'inventario.

3.10 Deperimento del materiale genetico conservato

In caso di incidenti occorsi al materiale crioconservato (per danno ai contenitori criogenici con esaurimento di azoto liquido, o per altre cause) vi è obbligo di immediata informativa a Terre Regionali Toscane.

Bibliografia

Ballou J.D, Lacy R.C. 1995. Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in captive populations. In: Ballou J.D, Gilpin M, Foose T.J, editors. Population management for survival and recovery. Columbia University Press; New York: pp. 76–111.

Caballero, A., & Toro, M. 2000. Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genetical Research*, 75(3), 331-343.

FAO, 2012. Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12. Rome

Gandini G, Pizzi F 2011. Crioconservazione delle risorse genetiche animali in Italia. In: Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, La salvaguardia della biodiversità animale—Iniziative generali ed azioni intraprese in Italia a tutela delle razze minacciate, Brescia, 67-74.

Gandini G, Pizzi F, Stella A, Boettcher PJ 2007. The costs of breed reconstruction from cryopreserved material in mammalian livestock species . *Genetic, Selection, Evolution* 39, 465-479.

MI.P.A.A.F. - Linee guida per la conservazione e la caratterizzazione della biodiversità animale di interesse per l'agricoltura - G.U. n. 171 del 24 luglio 2012.

Rota A, Panzani D, Sabatini C, Camillo F 2012. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies, *Theriogenology*, 78:1846-1854.

Toro, M., & Caballero, A. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1459), 1367–1378. <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1680>