



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO IN SANITÀ E PRODUZIONI ANIMALI:
SCIENZA, TECNOLOGIA E BIOTECNOLOGIE

DOTTORATO DI RICERCA IN PRODUZIONI ANIMALI
XXIII CICLO

TITOLO

LA CRIOCONSERVAZIONE DEL MATERIALE SEMINALE
NELLA SPECIE *Gallus gallus*

Tesi di: Dott.ssa Chiara Cassinelli
Docente guida: Prof. Silvia Cerolini



Anno Accademico 2010/2011



Università degli Studi di Milano
Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Scienze e tecnologie veterinarie per la Sicurezza Alimentare
Scuola di dottorato di ricerca in “Sanità e Produzioni Animali: Scienze, Tecnologia e Biotecnologia”

LA CRIOCONSERVAZIONE DEL MATERIALE SEMINALE

NELLA SPECIE *Gallus gallus*

Curriculum: Zoocolture

Docente guida: Prof. Silvia Cerolini

Dott.ssa Chiara Cassinelli
Matricola: R07753

INDICE

| | |
|---|----|
| Introduzione | 3 |
| 1. Anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttore dei volatili | 8 |
| 1.1 Apparato riproduttore | 8 |
| 1.2 Spermatogenesi | 9 |
| 1.3 Il seme | 10 |
| 2. Tecnologia riproduttiva | 14 |
| 2.1 Inseminazione artificiale | 14 |
| 2.2 Tecniche di conservazione degli spermatozoi | 17 |
| 2.3 Tecniche di congelamento in uso per la costituzione delle banche del seme avicolo in Europa. | 22 |
| Parte Sperimentale | 26 |
| 3. Metodiche di valutazione dei parametri qualitativi e quantitativi del materiale seminale utilizzate nelle sperimentazioni. | 27 |
| - Valutazione del volume | 27 |
| - Valutazione della concentrazione | 28 |
| - Valutazione della motilità | 28 |
| - Valutazione della vitalità | 31 |
| - Valutazione del pH | 31 |

| | |
|---|----|
| - Analisi lipidica del seme | |
| 4. Protocolli di ricerca | 33 |
| 4.1 Protocollo 1: Ottimizzazione della procedura di crioconservazione in pellets in seme di galli <i>Mericanel della Brianza</i> . Studio della concentrazione di lavoro, della concentrazione di DMA e relativa fase di equilibrio | 34 |
| 4.2 Protocollo 2: ottimizzazione della procedura di crioconservazione in pellets di seme di galli Hubbard. Studio delle fasi successive di lavorazione del seme dal prelievo allo scongelamento. | 45 |
| 4.3 Protocollo 3: Valutazione della fertilità <i>in vivo</i> utilizzando seme crioconservato di galli Hubbard | 53 |
| 4.4 Protocollo 4: Studio della sensibilità del seme alla crioconservazione in funzione della qualità iniziale. Valutazione della funzione mitocondriale e del danneggiamento al DNA nucleare. | 56 |
| Bibliografia | 72 |
| Ringraziamenti | 85 |

Introduzione

I primi studi sulla crioconservazione del materiale seminale vennero effettuati sul pollo negli anni 50 (Polge, 1951). Nonostante le ricerche sulla conservazione dei gameti in azoto liquido siano iniziate in questa specie, i metodi per congelare il seme vennero poi affinati principalmente sui mammiferi domestici, accantonando il seme degli Uccelli. I motivi per cui per decenni la ricerca sul seme avicolo si sia arenata furono legati agli scarsi risultati ottenuti, incompatibili con i progressi che si stavano compiendo nell'allevamento del pollo. La bassa fertilità e la variabilità che caratterizzavano il seme avicolo scongelato necessitavano di una concentrazione troppo elevata di spermatozoi nelle dosi (Cerolini et al. 2001), e facevano in modo che la crioconservazione non potesse essere inserita nelle tecniche riproduttive utilizzate in allevamento intensivo. Esistono grandi differenze tra il materiale seminale dei Mammiferi e quello degli Uccelli che giustificano il successo che la conservazione *in vitro* ha sugli spermatozoi dei primi e non su quelli degli avicoli. La struttura, la chimica e il metabolismo rendono gli spermatozoi degli Uccelli altamente sensibili agli stress osmotici e meccanici, per cui un numero elevatissimo di cellule subisce danni di notevole entità durante le procedure di congelamento/scongelamento, danni tali da ridurre drasticamente la fertilità dei gameti conservati. L'argomento ha ricominciato a suscitare interesse qualche decennio più tardi (Lake et al. 1981, Lake and Ravie 1984), quando negli anni 80 arrivarono i primi risultati soddisfacenti. Da allora le ricerche hanno prodotto procedure performanti, che han permesso, se non di rivoluzionare il comparto industriale, quantomeno di allestire criobanche delle risorse genetiche (AnGR) avicole.

La conservazione delle risorse genetiche è un argomento all'ordine del giorno sin dagli anni '80. Da allora la FAO gioca un ruolo fondamentale nell'accensione e nel mantenimento del dibattito sulla conservazione delle risorse genetiche negli animali domestici, dibattito che sta continuando ancora oggi a livello globale, nazionale e regionale. Le tappe evolutive sociali che han condotto l'intero globo a mettere in atto procedure mirate alla conservazione delle risorse genetiche nelle aree industrializzate rispecchiano, su scala mondiale, quelle che si sono succedute in Europa nel comparto avicolo.

In Europa meridionale i primi polli domestici arrivarono nel 700 a.C.. A quell'epoca il pollo era tenuto libero nelle fattorie. Il pollo era allevato per consumo personale di esigue quantità di uova che, se non consumate, schiudevano in nidiate di pulcini. Gli individui in eccedenza erano macellati. In Italia l'allevamento avicolo rimase per molto tempo di tipo familiare ed era sovente un'attività secondaria da affiancare ad altre realtà zootecniche. Gli incroci tra popolazioni di aree diverse erano rari; gli accoppiamenti all'interno degli stessi gruppi hanno dato vita alle numerose razze campagnole che caratterizzavano le aree rurali europee.

Le razze maggiormente predisposte per una determinata attitudine furono successivamente utilizzate per creare incroci con altre razze con caratteristiche fenotipiche particolari. Nacquero così numerose razze "utili", che furono l'incentivo per lo sviluppo dell'avicoltura. Queste razze sono ormai del tutto soppiantate dai moderni ibridi commerciali (Verhoef e Rijs, 2006).

Verso la fine degli anni '30, si gettarono le basi per lo sviluppo di un modello di avicoltura del tutto nuovo. In Italia si svilupparono i Centri e gli Osservatori Avicoli con lo scopo di costruire modelli razionali di allevamento, distribuire i riproduttori e le uova da cova, effettuare un'opera di selezione del pollame allevato e di conservare le razze più idonee alla creazione dei riproduttori (Cavani et al., 2008)

Solo negli anni '50 si ebbe la vera spinta evolutiva in campo avicolo. I motori di questa trasformazione furono da un canto i progressi scientifici in campo zootecnico, dall'altro l'aumento della domanda dei prodotti zootecnici che caratterizzava il secondo dopoguerra. Vi fu allora un'importante evoluzione non solo in campo avicolo ma nell'intero settore zootecnico. La produzione avicola si trasformò in questi anni da rurale ad intensiva industriale.

Con l'obiettivo di aumentare la produzione, si studiarono nuovi metodi di selezione, di riproduzione e di allevamento e si attuò una riorganizzazione dell'intero comparto produttivo. Queste scelte portarono l'Italia ai vertici europei per qualità e rispetto delle norme igienico-sanitarie, nonché per l'utilizzo di tecniche di allevamento all'avanguardia.

Uno dei punti cardine su cui si poggia l'avicoltura moderna, sviluppatosi appunto in questi anni, è il concetto di miglioramento genetico dei riproduttori attraverso la creazione di ibridi altamente specializzati e differenziati per le due linee produttive: ad accrescimento sempre più rapido per la linea da carne e aumento del numero di uova prodotte per la linea ovaiole.

L'utilizzo di questi soggetti comportò importanti cambiamenti sia della fase riproduttiva, che vide il totale utilizzo dell'incubazione artificiale, attuata su larga scala in pochi centri altamente specializzati, che della fase produttiva, che si trasformò in un sistema intensivo ad ambiente controllato, finalizzato a favorire la massima espressione del potenziale genetico degli ibridi.

Così come la gestione degli incubatoi, anche la selezione e la commercializzazione degli ibridi diventò col tempo monopolio di un numero sempre minore di aziende. I riproduttori creati in queste imprese si diffusero a livello globale. In Italia, come nel resto del mondo industrializzato, l'utilizzo di poche linee di riproduttori contribuì a creare le condizioni che portarono alla situazione attuale di impoverimento genetico.

Ritroviamo la situazione zootecnica generale descritta sul territorio Italiano anche nella maggior parte dei paesi industrializzati. In un ventennio le produzioni di latte, carne e uova aumentarono in maniera considerevole a causa dell'intensificarsi dei sistemi di produzione. Le aziende che applicano questi sistemi utilizzano risorse genetiche provenienti da linee molto produttive, create da un ristretto numero di compagnie multinazionali.

La conseguenza degli eventi descritti ha portato ad un continuo e progressivo impoverimento delle risorse genetiche animali nel corso degli anni, che ha indotto diverse Istituzioni internazionali ad allertarsi e a promuovere un dibattito e iniziative mirate alla salvaguardia della biodiversità.

Di seguito, le tappe degli eventi che hanno toccato questa tematica:

1980: Roma, incontro internazionale *Global technical consultation on genetic resources* ospitato dalla FAO.

1982: la FAO introduce l'azione *Global strategy for the management of farm animal resources* fra le responsabilità della Commission for genetic resources for food and agriculture.

1992: la FAO avvia il programma *Global Management of Farm Animal Genetic Resources*

1992. A Rio de Janeiro, la seconda Conferenza delle Nazioni Unite ribadisce l'importanza delle risorse genetiche animali nel documento *Agenda 21* e nella *Convention on Biological*

Diversity (CBD), la quale inoltre riconosce la sovranità e la responsabilità di ogni paese sulle proprie risorse genetiche.

1998: stesura, coordinata dalla FAO, del Report State of the World's Animal Genetic Resources for food and agriculture (SoW-AnGR) sulla base di informazioni nazionali.

Istituzione di un gruppo di lavoro sulla biodiversità animale da parte dell' European Association for Animal Production (EAAP) e creazione di un European Farm Animal Biodiversity Information System (EFABIS).

2007: Dal progetto EFABIS la FAO crea il Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS - <http://dad.fao.org/>), che fornisce l'accesso on-line ai dati che riguardano origine, caratteristiche numerosità e programmi di conservazione di 14000 popolazioni di animali divise per nazione.

(La biodiversità in avicoltura: Associazione scientifica di avicoltura, sezione Italiana della WPSA, sito)

Al 2009 le razze avicole italiane registrate al DAD-IS sono solo 6: *Ancona, Livorno, Padovana, Polverara-Schiatta, Siciliana e Valdarno*. Non si fa riferimento a programmi di conservazione in atto per queste razze.

Lavorando in territorio lombardo, l'attenzione si sposta immediatamente sulle razze locali ancora esistenti. Fortunatamente, nonostante il totale disinteresse da parte dell'industria avicola, qualche razza locale è sopravvissuta grazie all'allevamento amatoriale. Questo è il caso della razza Mericanel della Brianza (MdB), unica razza lombarda di pollo sopravvissuta di cui esiste uno standard della Federazione Italiana Associazioni Avicole (F.I.A.V.).

Il recente successo delle procedure di crioconservazione del seme avicolo sposano quindi l'emergenza di porre in essere strategie per la conservazione delle preziose risorse genetiche locali.

L'idea di contribuire alla conservazione della biodiversità avicola italiana va di pari passo con l'interesse nei confronti dello sviluppo di una procedura di congelamento molto vantaggiosa, sia dal punto di vista della fertilità (paragonabile al fresco) che dal punto di vista economico. Questa metodica, descritta dal russo Tselutin nel 1995, è rapida e non necessita di ingombranti e costose attrezzature e potrebbe essere applicata anche in campo con ridotto investimento.

Da qui parte la ricerca finalizzata al congelamento del seme delle razze legate al nostro territorio.

1. Anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttore dei volatili.

1.1 Apparato riproduttore dei volatili

Si compone dei testicoli, di una serie di condotti di cui i principali sono i dotti deferenti e dell'organo copulatore.

Il testicolo

È la gonade maschile, organo pari deputato alla produzione di spermatozoi e di ormoni sessuali maschili. Il volume e la forma dei testicoli differiscono in funzione della specie e della stagione riproduttiva. Il colore dei testicoli è chiaro, mentre la forma e le dimensioni (che generalmente sono asimmetriche) sono variabili da razza a razza. Lo sviluppo del testicolo è strettamente correlato al ciclo sessuale dell'animale. I due testicoli sono collocati sulla volta della cavità addominale, mantenuti in posizione grazie ad un legamento, il mesorchio, posteriormente ai polmoni e ventralmente ai reni. La gonade sinistra è generalmente più grande di quella destra. Medialmente, i testicoli entrano in contatto con l'aorta, la vena cava caudale, la ghiandola surrenale e, hanno rapporto di continuità con la *rete testis* (Zaniboni e Cerolini, 2008).

Il parenchima, costituito dallo stroma e dai tubuli seminiferi, è avvolto da una tunica connettivale, la tunica albuginea. Lo stroma è costituito da cellule interstiziali, dette cellule del Leydig, organizzate in ghiandole a funzione endocrina, da cellule connettivali, da una rete vascolare e una rete nervosa. I tubuli seminiferi, luogo dove si formano e maturano gli spermatozoi, sono composti da un epitelio pluristratificato (l'epitelio germinativo) costituito da cellule somatiche (cellule del Sertoli) e da cellule germinali. L'epitelio germinativo poggia su una membrana basale in tessuto connettivale.

I dotti deferenti

I dotti deferenti sono i condotti principali dell'apparato riproduttore maschile. Rappresentano le vie di emissione degli spermatozoi e sono in contatto col testicolo tramite l'epididimo. Decorrono parallelamente ai reni e si aprono nella cloaca (Giavarini, 1982). La loro funzione è molteplice: completano la maturazione dei gameti maschili, e li conservano nel tratto finale fino all'eiaculazione, inoltre partecipano alla formazione del plasma seminale.

L'organo copulatore

Nei galli l'organo copulatore è rudimentale, è definito *phallus nonprotrudens* ed è costituito da una doccia, delimitata dai corpi fallici, che si inturgidisce ed estroflette al momento dell'accoppiamento grazie all'afflusso di sangue e linfa che fa inturgidire i tessuti. In altri volatili, ad esempio i palmipedi, l'organo copulatore è maggiormente sviluppato. Negli Uccelli, l'organo copulatore non è visibile dall'esterno ma è contenuto all'interno della cloaca. Questo organo è costituito dalle papille dei dotti deferenti, dai corpi vascolari, dalle pliche linfatiche e dal fallo vero e proprio, unica struttura impari (Zaniboni e Cerolini, 2008).

1.2 Spermatogenesi

La spermatogenesi è il processo che porta alla formazione di spermatozoi, cellule specializzate, motili e aploidi (n) a partire da cellule germinali, indifferenziate, immobili e diploidi (2n). Negli Uccelli, la spermatogenesi avviene ad una temperatura di 40-41 °C. La comparsa dei primi spermatozoi maturi stabilisce l'ingresso del gallo nel periodo pubere ed avviene all'incirca a 10-12 settimane di vita, mentre la maturità sessuale viene raggiunta all'età di circa 20 settimane, quando i testicoli acquisiscono il loro sviluppo e peso definitivo.

La spermatogenesi avviene nei tubuli seminiferi del testicolo sotto la direzione degli ormoni ipofisari. L'ipotalamo rilascia il Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), ormone che stimola l'ipofisi anteriore a immettere nel torrente circolatorio gli ormoni Follicolo Stimolante (FSH) e Luteinizzante (LH). L'FSH promuove lo sviluppo della gonade e la spermatogenesi, mentre l'LH stimola il testicolo a produrre testosterone e androstenedione, ormoni androgeni. Gli androgeni stimolano a loro volta la gonade a completare la spermatogenesi e determinano la comparsa dei caratteri sessuali secondari e del comportamento sessuale (Lake, 1984).

Nel gallo questo processo dura 21 giorni e si può dividere in 3 fasi:

- durante la spermatocitogenesi le cellule germinali adese alla membrana basale dei tubuli seminiferi vanno incontro ad un numero definito di mitosi, l'ultima divisione dà origine agli spermatoцитi primari;
- gli spermatoцитi primari subiscono 2 fasi meiotiche consecutive, ovvero due divisioni cellulari non intervallate da una fase di sintesi; questa fase permette di ottenere da ogni spermatoцитa primario ($2n$) 4 spermatoцитi (n);
- grazie alla spermiogenesi ciascun spermatoцитe acquisisce la forma che caratterizza lo spermatoцитo di ciascuna specie.

La spermatogenesi è suscettibile ad ampie variazioni nel corso della giornata, della stagione e dell'età dell'animale. La produzione di spermatoцитi risente infatti dell'intervallo luce-buio e della temperatura ambientale, fattori che agiscono direttamente sulla ghiandola ipofisaria.

1.3 Il Seme

Il seme è composto da una componente cellulare, gli spermatoцитi, e da una componente acellulare, il plasma seminale. La concentrazione di spermatoцитi sospesi nel plasma varia da razza a razza, e da soggetto a soggetto, ma in generale il seme dei galli è molto concentrato e varia dai 3 agli 8 miliardi di spermatoцитi per millilitro di seme (Donoghue e Wishart, 2000).

Spermatoцитo

Lo spermatoцитo, cellula altamente specializzata al trasferimento dell'informazione genetica all'oocita, è composto da diverse parti: la testa, il collo, il segmento intermedio, il segmento principale e il segmento finale (Hafez, 1984). Nonostante la suddivisione in regioni sia la stessa, lo spermatoцитo degli Uccelli si differenzia notevolmente, per dimensione e composizione dei singoli tratti, dallo spermatoцитo di Mammifero, conferendo al primo caratteristiche peculiari che lo accomunano allo spermatoцитo dei Rettili e degli Anfibi più che a quello dei Mammiferi (Zaniboni e Cerolini, 2008).

La testa è cilindrica, lunga, filamentosa, il suo diametro è di circa 0,5 micron, contiene poco citoplasma, possiede un acrosoma ridotto. La testa è occupata dal nucleo, filiforme e leggermente elicoidale, che contiene l'acido desossiribonucleico (DNA). Il DNA nel nucleo dello spermatozoo di gallo si organizza a costituire 39 cromosomi (n). La membrana nucleare e la membrana cellulare della testa sono a stretto contatto.

Sul polo craniale della testa è presente l'acrosoma, struttura derivante dall'apparato del Golgi, adeso strettamente al nucleo. L'acrosoma è composto dal cappuccio e dalla spina acrosomale.

Il cappuccio acrosomale è un serbatoio di enzimi proteolitici. Questi enzimi sono indispensabili alla fusione delle membrane dello spermatozoo con quelle della cellula uovo (Mc Rorie e Williams, 1974; Morton, 1976; Hafez, 1984).

La spina acrosomale o aculeo acrosomale (struttura omologa al *perforatorium* dello spermatozoo dei Mammiferi) è un'invaginazione della membrana nucleare (Zaniboni e Cerolini, 2008) in cui si inserisce un prolungamento dell'acrosoma con la probabile funzione di favorire la fusione cellulare all'incontro con la cellula uovo.

Tra testa e segmento principale della coda è presente il segmento intermedio, che è formato da una porzione centrale data dall'assonema (costituito da 9+2 coppie di microtubuli), che si prolunga per tutta la lunghezza della coda, e da un manicotto più esterno rivestito da uno strato di mitocondri a salsiccia che avvolge l'assonema. Nello spermatozoo di gallo i mitocondri sono presenti in numero minore (circa 30) rispetto a quanto è presente negli spermatozoi di mammifero. I mitocondri nel tratto intermedio forniscono l'energia sotto forma di ATP necessaria al mantenimento delle funzioni vitali e al movimento dello spermatozoo. La coda è sottile, molto lunga, circa 90-100 micron, quasi il doppio di quella degli spermatozoi di mammifero, e presenta una struttura semplice costituita unicamente da assonema e membrana plasmatica.

Plasma seminale

La porzione acellulare del seme è il plasma seminale, prodotto, negli Uccelli, in parte dalle cellule del Sertoli dei tubuli seminiferi nei testicoli e in parte dall'epitelio secernente della mucosa dell'epididimo, del deferente e delle pliche linfatiche. (Nishiyama, 1955).

Il liquido spermatico degli Uccelli è bianco e opaco, il pH è neutro e la pressione osmotica è 325 mOsm/kg. Il volume dell'eiaculato è esiguo se paragonato a quello dei mammiferi, in quanto negli Uccelli manca l'apporto delle ghiandole sessuali accessorie.

Il plasma seminale, oltre alla componente acquosa, è costituito principalmente da sali e da aminoacidi, presenti in piccole percentuali sono l'inositolo e il sorbitolo, in maggiore quantità è presente il glutammato (Tabella 1).

Sono presenti enzimi idrolitici.

| Componente | Concentrazione (mM) |
|------------------|---------------------|
| Glucosio | 0.18 |
| Cloro | 46 |
| Sodio | 145 |
| Potassio | 13 |
| Calcio | 1.4 |
| Gutammato | 75 |
| Lattato | 3.7 |
| Piruvato | 0.3 |
| Carnitina | 3.2 |
| Acetil-carnitina | 0.5-2.0 |
| Proteine (g/l) | 8 |

Tabella 1 Componenti del plasma seminale di gallo (da Etches et al., 1996).

Lipidi del seme

La componente lipidica del seme riveste un ruolo decisivo nella vita dello spermatozoo, essa si ritrova sia nel plasma seminale che nella cellula spermatica essendo la componente principale delle membrane citoplasmatiche. Alla componente lipidica del seme si attribuì un ruolo chiave del metabolismo energetico dello spermatozoo. Ben presto si scoprì che la sua funzione non si limitava a quello, ma consentiva allo spermatozoo di fecondare la cellula uovo (Zaniboni et al., 2006).

I lipidi degli spermatozoi di gallo che costituiscono le membrane cellulari sono caratterizzati da una elevata quantità di acidi grassi polinsaturi omega 6, rappresentati per lo più dall'acido docosatetraenoico (DTA) e dall'acido arachidonico (AA), in quantità specie

specifiche. La presenza del DTA è correlata all'efficienza riproduttiva del maschio (Cerolini et al., 2006).

2. Tecnologia riproduttiva

Qualsiasi operazione sul seme che vada al di là della monta naturale prevede il prelievo di seme e l'impiego di un diluente.

2.1 Inseminazione artificiale

L'inseminazione artificiale è una pratica indispensabile se si utilizza seme conservato. L'inseminazione artificiale è una tecnica riproduttiva ampiamente studiata anche in campo avicolo, può essere utilizzata nella maggior parte dei volatili e permette di ottenere un tasso di fertilità migliore e più costante durante la stagione riproduttiva della femmina.

Tuttavia, i vantaggi dell'inseminazione artificiale sono ottenuti solo tramite l'impiego di manodopera specializzata e ben preparata che comporta costi maggiori rispetto alla monta naturale. La monta naturale è generalmente preferita nell'allevamento avicolo intensivo, il 90 % della produzione di polli da carne è ottenuto in condizioni di monta naturale (Brillard, 2004). I centri di selezione fanno eccezione, perché l'inseminazione artificiale permette di accelerare il processo di selezione delle linee parentali. L'inseminazione strumentale è invece indispensabile nell'allevamento dei volatili con elevato dimorfismo sessuale, come nel tacchino o nelle linee di polli in cui si utilizzano femmine nane, e nell'allevamento della faraona, nel quale risulta conveniente allevare un ridotto numero di maschi (Brillard e de Reviere, 1989), nonostante la specie sia quasi monogama.

L'inseminazione artificiale prevede diverse operazioni successive: il prelievo del seme, la preparazione della dose di inseminazione e l'inseminazione della stessa nella femmina. Di norma, il materiale seminale fresco deve essere utilizzato entro 30 minuti dal prelievo, mentre per intervalli maggiori è necessario ricorrere a procedure di conservazione del seme appropriate.

Prelievo di seme

Il prelievo del seme nei volatili viene attuato nella maggior parte dei casi tramite la consolidata tecnica del massaggio dorso-addominale e spremitura della cloaca. Questa tecnica di prelievo prevede un massaggio che stimola la regione dorso addominale e cloacale del maschio. La tecnica fu descritta da Burrows and Quinn negli anni trenta e da

allora è stata perfezionata e ampiamente utilizzata. E' prevista la presenza di due operatori oppure di un solo operatore se si è provvisti di strutture di contenimento per gli animali. Un operatore sarà incaricato appunto al contenimento dell'animale, che deve essere adagiato sul petto con gli arti posteriori distesi, e della raccolta in provetta dell'eiaculato, mentre il secondo operatore è deputato al massaggio e alla spremitura della cloaca. Il massaggio è effettuato a livello della regione addominale ventrale e dorsalmente fra l'attaccatura delle ali e la coda, in direzione antero-posteriore. Il gallo risponde con l'innalzamento della coda e con l'inturgidimento dell'organo copulatore che determina una doccia, l'operatore procede quindi con una leggera spremitura della regione cloacale che provoca l'estroffessione della cloaca e la fuoriuscita del seme che viene raccolto per caduta o per aspirazione in provetta. A causa dello sbocco comune dell'apparato escretore e genitale, è probabile ottenere del seme inquinato da feci o urine, pertanto è indispensabile addestrare i volatili al prelievo manuale per almeno due settimane prima di iniziare la raccolta vera e propria di seme, in modo tale da ridurre lo stress e quindi l'emissione involontaria di feci e urine, inoltre è opportuno mantenere gli animali a digiuno e seguire una corretta prassi igienica prima del prelievo.

Modalità di preparazione delle dosi di inseminazione

Subito dopo la raccolta, il seme deve prontamente essere valutato per volume, densità e colore. Il volume viene misurato raccogliendo il seme al momento del prelievo direttamente dentro una provetta graduata; oppure, se il volume è troppo ridotto, pesando la provetta col seme all'interno. Si pone per convenzione che la densità del seme corrisponde a quella dell'acqua (1 Kg/L). La densità è valutata soggettivamente in base all'opalescenza dell'eiaculato. Il colore deve essere bianco latte, indicativo dell'assenza di contaminanti. La valutazione del colore è importante per scartare gli eiaculati contaminati da sangue, feci o urine.

Se non interessa risalire alla paternità della prole, è utile preparare le dosi con un pool di eiaculati per diminuire il rischio di inseminare con un eiaculato poco vitale e in generale, per standardizzare la qualità del seme (Marzoni, 2008).

Subito dopo il prelievo, il seme è diluito secondo una proporzione che può variare da 1:1 a 1:3 e in seguito si procede con la preparazione delle dosi (Brillard, 1995). La diluizione permette di utilizzare in modo adeguato il materiale seminale, che allo stato puro si presenta molto denso, e di tamponare eventuali prodotti acidi derivanti dal metabolismo spermatico che, di conseguenza, potrebbero determinare un ambiente *in vitro* sfavorevole al mantenimento della vitalità cellulare (Marzoni, 2008).

La concentrazione ideale della dose di inseminazione varia da 60 a 100 milioni di spermatozoi, tuttavia commercialmente si consigliano dosi più concentrate di 150 milioni di spermatozoi, che potranno essere aumentate a 200 milioni nella seconda metà del ciclo riproduttivo per garantire la massima fertilità (Marzoni, 2008). In condizioni ideali, si effettua la valutazione della concentrazione effettiva del campione di seme e si calcola quindi il volume necessario ad ottenere la dose ottimale di inseminazione. Al contrario, nella pratica di allevamento la dose di inseminazione è preparata unicamente in base al volume e si utilizzano quantità variabili dai 20 microlitri, per il seme fresco su cui si effettua una diluizione minima (1:1), ai 200 microlitri, per il seme conservato e molto diluito (Taneja e Gowe, 1961; Sexton, 1977).

La preparazione delle dosi di inseminazione prevede sempre la diluizione del seme in un diluente specifico. Esistono diluenti per il seme di diverse specie e per diverse procedure (Donoghue, 2000), la loro composizione varia dai più semplici ai più complessi in funzione della durata del periodo di conservazione. In generale, il diluente è una soluzione salina in grado di contrastare l'azione di eventuali sostanze tossiche e mantenere *in vitro* un ambiente (pH, osmolarità, fonte energetica) idoneo alla sopravvivenza di spermatozoi integri e funzionali. La sola diluizione del seme non è sufficiente a prevenire i danni cellulari che di norma si verificano durante la conservazione (Sturkie, 1976; Lorenz, 1969) e sovente si associa alla diluizione anche l'abbassamento della temperatura considerando un range variabile dai 2 ai 20 °C in funzione della specie in esame e della durata della conservazione (Sexton, 1979; 1980).

Considerando un breve periodo di conservazione di 45 minuti, il seme di gallo può essere diluito con un diluente molto semplice non tamponante e può essere mantenuto a temperatura ambientale di 13-20°C. Al contrario, per periodi prolungati di conservazione di

alcune ore è necessario utilizzare diluenti con formulazioni più complesse e mantenere il seme a temperature di refrigerazione (Marzoni, 2008).

Le caratteristiche della conservazione per refrigerazione verranno descritte in maggior dettaglio in un paragrafo successivo.

Inseminazione artificiale nella femmina

Questa pratica può essere effettuata da due operatori, uno deputato al contenimento dell'animale, l'altro deputato alla deposizione del seme, oppure da un solo operatore quando si ha a disposizione un piano di lavoro con pinze di contenimento. E' necessario effettuare l'estroflessione della cloaca della femmina per evidenziare l'orifizio vaginale dove deve essere introdotta la cannula contenente la dose di seme. La frequenza di inseminazione è influenzata dalla presenza delle ghiandole di stoccaggio (*Sperm Storage Tubules*, SST) dell'apparato genitale femminile. Queste ghiandole, presenti nella giunzione utero-vaginale, stoccano gli spermatozoi depositati in vagina durante l'accoppiamento o l'inseminazione artificiale per periodi piuttosto lunghi che dipendono dalla specie di appartenenza. Gli spermatozoi sono qui conservati in uno stato di quiescenza metabolica e vengono rilasciati costantemente dalle ghiandole per raggiungere il primo tratto dell'ovidutto, l'infundibulo, dove avviene la fecondazione. Di conseguenza, le femmine presentano un lungo periodo fertile in seguito ad una sola monta o inseminazione durante il quale depongono uova fecondate. Il periodo fertile della gallina dura 21 giorni e la probabilità di fecondazione dell'ovocita è massima nei primi 8-10 giorni successivi all'inseminazione, per poi diminuire progressivamente nei giorni successivi fino ad annullarsi. Al fine di mantenere la fertilità costantemente ai livelli ottimali, la frequenza migliore di inseminazione corrisponde a 7 giorni per le femmine di tutte le specie domestiche.

2.2 Tecniche di conservazione degli spermatozoi.

Il seme avicolo conservato *in vitro*, già poche ore dopo il prelievo, va incontro ad un brusco calo della fertilità. Una serie di meccanismi sono responsabili di cambiamenti cellulari e/o ambientali che portano ad un calo della motilità e della capacità fecondante degli spermatozoi (Ressequie, 1984). Questo fenomeno appare molto più evidente per il seme

degli Uccelli che per il seme dei Mammiferi. Alcuni meccanismi che partecipano al decadimento della qualità degli spermatozoi sono stati spiegati e coinvolgono componenti del seme che, paradossalmente, all'interno dell'apparato genitale maschile contribuiscono alla sopravvivenza dei gameti. Infatti, il plasma seminale contiene sostanze minerali e organiche che diventano deleterie per il seme conservato *in vitro* (Blesbois e de Reviere, 1992; Thurston et al., 1993b), inoltre contiene anche cellule dette "spermiofagi" ed enzimi proteasi che, *in vitro*, si attivano contro gli spermatozoi (Richardson et al., 1987). Infine, gli spermatozoi sono caratterizzati da un'elevata presenza di PUFA, come accennato nel capitolo precedente (Ravie e Lake, 1985), che possono essere substrato di perossidazione spontanea con la conseguente produzione di sostanze tossiche (Fujihara, 1984; Cecil e Bakst, 1993).

Allo scopo di prevenire i fenomeni negativi descritti, si sono studiate specifiche tecniche di conservazione *in vitro* in grado di mantenere costante la capacità fecondante dei gameti maschili per periodi prolungati. La refrigerazione permette la conservazione del seme allo stato liquido per diverse ore (3-48 h) e la crioconservazione permette la conservazione del seme allo stato solido per periodi di tempo illimitati.

Refrigerazione

La refrigerazione è la prima tecnica di conservazione del seme messa in atto nelle specie avicole (Kotolowska et al., 2007; Douard et al., 2004). La diluizione e la refrigerazione del seme furono i primi interventi utilizzati per rallentare i processi catabolici del seme e di conseguenza prolungare la vita degli spermatozoi per il tempo necessario agli operatori per svolgere le diverse attività previste nella pratica di inseminazione artificiale (IA). Il diluente ideale per preservare *in vitro* gli spermatozoi mimava inizialmente, per contenuto ionico e pH (Lake e Ravie, 1982), le ghiandole di stoccaggio (SST) dell'ovidutto (Wishart, 1989).

Il seme conservato a temperature di refrigerazione mantiene, anche se rallentata, la sua attività metabolica, con consumo di ossigeno e produzione di CO₂ e di cataboliti (Wishart, 1981; Thurston et al. 1994).

In generale, il diluente di refrigerazione è una soluzione salina che deve rispondere a diversi requisiti elencati di seguito in breve (Marzoni, 2008):

- contenere sostanze tamponanti allo scopo di prevenire l'instaurarsi di un ambiente acido e mantenere il pH prossimo alla neutralità (7.0-7.4); le sostanze tampone spesso utilizzate sono i sali di fosfato e dell'acido aminoetansulfonico (BES e TES);
- contenere composti che le cellule possono utilizzare come substrato energetico, nel caso del seme di gallo si utilizza fruttosio e glucosio;
- assenza di ioni calcio e di metalli pesanti e presenza di cationi inorganici (magnesio e zinco) regolatori del metabolismo spermatico;
- avere una pressione osmotica leggermente superiore a quella del seme e corrispondente a circa 360 mOsmoli/kg;
- prevedere la presenza di agenti antibatterici (antibiotici) allo scopo di limitare la moltiplicazione dei batteri normalmente presenti nel seme e probabilmente di derivazione cloacale.

La presenza del plasma seminale è un fattore che condiziona la conservazione del seme. Mentre è un elemento fondamentale per il seme fresco, tanto che i principali diluenti mimano la sua composizione, è invece un elemento negativo per il seme conservato per più di 4 ore a temperature di refrigerazione (Blesbois e Mauger, 1987; 1989). L'utilizzo della dialisi ha rivelato che la frazione di plasma seminale deleteria per la conservazione del seme ha peso molecolare basso (< 1KDa), mentre frazioni con peso molecolare maggiore risultano essere di beneficio (Blesbois e de Reviers, 1992). Il plasma seminale è coinvolto anche nel catabolismo dei fosfolipidi a causa dell'attivazione delle fosfolipasi. Inoltre, il plasma seminale contiene sia attivatori (Henricks et al., 1998; Ashizawa e Wishart, 1987) sia fattori inibenti della motilità (Mohan et al., 1995).

La conservazione per refrigerazione del seme di gallo in un idoneo diluente ad una temperatura compresa tra 2 e 5 °C per un periodo anche di 24 ore permette di ottenere dopo IA una fertilità molto simile a quella conseguente all'utilizzo di seme fresco (Van Wambeke, 1967; Etches, 1996) .

Crioconservazione

La crioconservazione permette di mantenere *in vitro* il seme per lunghi periodi, praticamente illimitati, e consiste nella conservazione in azoto liquido a -196°C . Questa tecnica consente di creare banche del seme ed è oggi l'unica tecnologia riproduttiva applicabile in avicoltura per lo sviluppo di strategie di conservazione *ex situ in vitro* di risorse genetiche (Gee, 1995). Infatti, negli Uccelli, la crioconservazione di ovociti ed embrioni non è praticabile con successo a causa della peculiare biologia riproduttiva di questi animali (Blesbois et al., 2007; Blesbois e Labbè, 2003).

Lo spermatozoo degli Uccelli è strutturalmente predisposto a subire danni in seguito allo stress subito durante le fasi di congelamento e scongelamento. La sua elevata sensibilità alla crioconservazione è messa in relazione principalmente alla scarsa presenza di citoplasma, che rende meno efficace l'utilizzo di quei crioprotettori che esplicano la propria funzione penetrando nella cellula, ed alla struttura della coda lunga e sottile (Donoghue, 2000).

Lo stress da congelamento è il primo fattore che influenza la funzionalità cellulare. Lo stress da congelamento è causato principalmente dai repentini e consecutivi cambiamenti di osmolarità a cui la cellula deve reagire attivando le pompe ioniche e regolando l'influsso e l'efflusso di acqua, gonfiandosi e raggrinzendosi (Blanco, 2008).

I danni che la cellula subisce durante il congelamento/scongelamento possono dipendere, oltre che dalla temperatura, anche dalla presenza di alcune sostanze indispensabili alla procedura stessa, come il crioprotettore, che vengono incluse nel diluente ed esercitano una notevole forza osmotica. Di conseguenza, tempi e temperature di equilibrio influenzano in maniera decisiva la sopravvivenza cellulare.

Le variabili studiate e influenti sul successo delle varie procedure di crioconservazione sono: diluente, diluizione, tipo e quantità di crioprotettore, gradienti di congelamento, metodo di confezionamento, procedura di scongelamento.

Ciascuna procedura messa a punto prevede l'utilizzo di un crioprotettore. Il crioprotettore è una sostanza che permette alla cellula di affrontare il congelamento riducendo per quanto possibile i danni cellulari causati dalla formazione di cristalli di ghiaccio all'interno e all'esterno della cellula (Blanco et al., 2008; Curry et al., 1994). L'utilizzo del crioprotettore è indispensabile nelle procedure di congelamento (Fujihara e Buckland, 1987; Mitchell et

al., 1977) e la scelta della sostanza da utilizzare e della sua concentrazione è un punto critico nella procedura di congelamento.

Durante il congelamento, il momento più delicato è il passaggio del seme dallo stato liquido a quello solido (tra i -5 °C e i -15 °C), in concomitanza con la trasformazione dell'acqua in cristalli di ghiaccio, che concentra i soluti extracellulari mettendo la cellula in una condizione di iperosmolarità. In questa condizione gli spermatozoi tendono ad eliminare l'acqua al loro interno raggrinzendosi. Inoltre, i cristalli di ghiaccio possono danneggiare la delicata struttura delle cellule. Durante lo scongelamento, la permanenza prolungata degli spermatozoi in condizioni di iperosmolarità crea un ambiente tossico per gli spermatozoi. Il ritorno a condizioni di isosmolarità in seguito a iperosmolarità causa danni alla membrana cellulare e conseguente riduzione della vitalità spermatica (Blanco, 2000).

I principali crioprotettori utilizzati per il congelamento del seme avicolo sono il glicerolo, la dimetilacetammide (DMA), il dimetilsolfossido (DMSO) (Tselutin et al., 1999) e l'1,2 etandiolo (ED) (Woelders et al., 2006), sostanze che appartengono tutte alla classe di crioprotettori che penetrano nella cellula. L'altra grande categoria di crioprotettori esplica la propria azione permanendo al di fuori delle cellule.

Il glicerolo è la sostanza che garantisce *in vitro* di conservare il più elevato numero di spermatozoi vivi e normoformati dopo la procedura di congelamento/scongelamento (Long e Kulkarmi, 2004) seguito dalla DMA. Il glicerolo ha però effetti negativi sulla fertilità *in vivo*, in quanto esplica un effetto anticoncezionale sull'apparato genitale della gallina; di conseguenza, deve essere rimosso prima della inseminazione artificiale mediante dialisi o centrifugazione. Tuttavia, queste operazioni sono possibile causa di una ulteriore perdita di vitalità degli spermatozoi dopo scongelamento. La DMA non ha effetti contraccettivi e può permanere nel seme all'atto della inseminazione evitando agli spermatozoi conservati lo stress di un ulteriore trattamento. Il DMSO e l'ED hanno delle performance inferiori al glicerolo e alla DMA e pertanto non rientrano nei principali protocolli di congelamento attualmente utilizzati.

Il metodo di confezionamento delle dosi influenza enormemente la riuscita di una tecnica. Il confezionamento in paillettes offre i vantaggi di occupare poco spazio, di una migliore identificazione del campione e di garanzia di igiene superiore agli altri metodi di confezionamento. Il seme confezionato in paillettes non entra mai in contatto direttamente

con l'azoto liquido o con ghiaccio secco e pertanto è difficile che possano esserci contaminazioni crociate delle dosi. Il confezionamento delle paillettes avviene in maniera automatizzata e quindi standardizzata; inoltre, grazie all'applicazione di un codice a barre direttamente sulla confezione è possibile risalire con precisione a tutte le informazioni del donatore e del campione.

Il confezionamento in pellets consente il congelamento immediato del campione e quindi si ritiene provochi meno danni alle cellule. La procedura viene effettuata dall'operatore, facendo gocciolare con una pipetta un volume fisso di seme direttamente in un bagno di azoto liquido. Il pellet viene poi trasferito in cryovials identificate manualmente. La tecnica è molto semplice, poco costosa e può essere svolta senza la necessità di particolari attrezzature. Gli svantaggi legati a questa procedura sono dovuti alla manualità dell'operatore e al contatto diretto dei pellets con l'azoto liquido, situazione che non esclude, anche se ancora da dimostrare, potenziali contaminazioni crociate. Attualmente, le linee guida internazionali relative alla creazione di criobanche del seme escludono la possibilità di confezionare le dosi in pellets per motivi di igiene e di tracciabilità dei campioni (Blesbois, 2007).

La bibliografia riguardante il congelamento del seme su torte di ghiaccio secco è molto scarsa, così come raro è il suo utilizzo. Gli svantaggi di questa tecnica sono gli stessi del confezionamento in pellets.

2.3 Tecniche di congelamento in uso per la costituzione delle banche del seme avicolo in Europa

L'utilizzo di differenti crioprotettori associato a diversi metodi di confezionamento del seme hanno dato vita a svariati protocolli alcuni dei quali sono attualmente utilizzati in Europa per la creazione di criobanche nell'ambito di programmi di conservazione delle risorse genetiche animali.

La procedura di crioconservazione del seme avicolo tradizionalmente studiata prevedeva l'utilizzo di glicerolo come crioprotettore, il confezionamento in paillettes, un lento gradiente termico per effettuare la fase di congelamento e lo scongelamento a freddo. Il

seme così crioconservato permetteva un valore di fertilità del 76% dopo IA (Seigneurin e Blesbois, 1995).

Nel 1995, il russo Tselutin pubblicò un protocollo di crioconservazione innovativo che prevedeva l'utilizzo di DMA come crioprotettore, il confezionamento in pellets, un congelamento immediato per contatto diretto del campione con l'azoto liquido e lo scongelamento rapido a caldo. Il seme così crioconservato permetteva un valore di fertilità del 93-94% dopo IA (Tselutin et al., 1995).

Gli stati europei che possiedono criobanche delle risorse genetiche avicole sono la Francia e l'Olanda. In entrambe gli Stati, si è adottata una procedura ufficiale di crioconservazione del seme per la creazione della criobanca di razze locali e/o linee genetiche altamente selezionate. La procedura ufficiale è stata individuata attraverso il confronto delle due procedure di crioconservazione citate in precedenza.

L'esperienza francese

In Francia, le specie avicole sono incluse nel più ampio progetto di conservazione 'French National Cryobank of Domestic Animals' (Danchin-Burge e Hiemstra, 2003). Le popolazioni oggetto di conservazione sono 3 linee genetiche altamente selezionate per caratteri specifici (R+, Y33, B4/B4) e l'antica razza francese Gauloise doreé. Allo scopo di inserire questi tipi genetici nel programma di conservazione, si sono avviate diverse attività di ricerca presso l'INRA (Tours, Francia) ed una di queste era quella di individuare la procedura di crioconservazione più idonea per il seme aviario, considerando che non esistono procedure standardizzate in uso nella pratica avicola. I ricercatori francesi hanno messo a confronto due procedure di crioconservazione utilizzando il seme della linea genetica R+, caratterizzata dalla minore fertilità. La prima procedura prevedeva l'uso di glicerolo ed il confezionamento in paillettes secondo la descrizione di Seigneurin e Blesbois (1995), mentre la seconda procedura prevedeva l'uso di DMA, un congelamento rapido (-50°C/min), il confezionamento in paillettes ed uno scongelamento molto rapido a caldo (5 sec a 50°C) (Blesbois et al., 2007). Questa seconda procedura era stata studiata partendo dal metodo Tselutin (Tselutin et al., 1995; 1999) poi modificato per standardizzare la procedura ed introdurre il confezionamento in paillettes, raccomandato per motivi di sicurezza e di

identificazione degli eiaculati nella creazione di criobanche di risorse genetiche La combinazione DMA – paillettes diede risultati di fertilità peggiori rispetto alla combinazione glicerolo – paillettes (2.8 vs 30%) e la procedura prescelta è stata quindi la seconda. La procedura di crioconservazione del seme utilizzata per l’allestimento della criobanca francese prevede in dettaglio i seguenti passaggi (Seigneurin e Blesbois, 1995):

- diluizione del seme 1:1 con diluente A (Lake, 1968);
- equilibramento a +5 °C per 30 min;
- aggiunta del diluente A con glicerolo alla concentrazione finale dell’11% a +5 °C;
- equilibramento a +5 °C per 30 min;
- trasferimento in paillettes in plastica da 0.5 ml;
- congelamento da +5 °C a -35 °C con un gradiente termico di -7 °C/min e da -35 a -90°C con un gradiente di -8°C/min con congelatore programmato; immersione successiva delle paillettes in azoto liquido;
- scongelamento in bagno termostato a 5°C per 4 min.

Prima della inseminazione artificiale, è indispensabile diluire, centrifugare il campione (500 g per 15 min a + 5°C) per rimuovere il glicerolo e risospendere le cellule in diluente Lake 7.1 alla concentrazione di 2×10^9 /ml circa.

La fertilità del seme crioconservato dei diversi tipi genetici ottenuta dopo inseminazione artificiale di dosi di 600×10^6 di spermatozoi è risultata variabile dal 7 al 68% utilizzando galline omologhe e dal 25 al 59% utilizzando galline eterologhe (Blesbois et al. 2007).

L’esperienza olandese

In Olanda, il Center for Genetic Resources, The Netherlands (CGN) è stato istituito per sviluppare a livello nazionale programmi di conservazione e di uso sostenibile delle risorse genetiche vegetali ed animali. Dal 2003, il CGN ha sviluppato una banca del seme di razze avicole locali che nel 2006 è arrivata ad includere 11 razze olandesi di pollo, con 10 donatori per razza e da 50 a 100 dosi di inseminazione per donatore (Woelders et al., 2006). La procedura di crioconservazione del seme utilizzata per la banca olandese è il frutto di una serie di studi in cui sono stati messi a confronto diversi crioprotettori (glicerolo, DMA, DMSO e ED), gradienti di congelamento (da 5 a 600°C/min) e metodi di confezionamento (paillettes e pellets). La procedura finale adottata combina la comodità delle paillettes

all'utilizzo di basse concentrazioni di DMA, evitando così l'uso del glicerolo che ha azione anticoncezionale nell'apparato genitale femminile. La generale descrizione della procedura fornita dagli Autori è la seguente (Woelders et al., 2006):

- diluizione del seme 1:1 con diluente ASG (Animal Science Group, Wageningen University, Lelystad, The Netherlands) e raffreddamento a 5°C;
- aggiunta di 0.6 mol DMA/L;
- congelamento ad una velocità di -200 °C/min con congelatore programmato.

La fertilità del seme di broiler così crioconservato dopo inseminazione artificiale di 300×10^6 spermatozoi su galline ovaiole è risultata 87.6%.

PARTE SPERIMENTALE

La conservazione del seme in azoto liquido è attualmente l'unica biotecnologia riproduttiva che permette di preservare *ex-situ* le risorse genetiche delle razze avicole in via di estinzione. Inoltre, se si arrivasse ad avere risultati convenienti, questo metodo potrebbe spianare la strada ad una ottimizzazione della fase riproduttiva e quindi, in generale, delle risorse economiche e gestionali dell'allevamento avicolo.

Attualmente, in Europa, le tecniche utilizzate permettono di ottenere risultati spendibili solo per qualche specie avicola ed esclusivamente ai fini di conservazione. Sono indispensabili ulteriori studi dei protocolli di congelamento per gli spermatozoi delle razze avicole, adattati alla fisiologia delle razze locali e delle linee industriali, per rendere reali le potenzialità di questa procedura.

A fronte dei due obiettivi (conservazionista e zootecnico) che può avere l'utilizzo della crioconservazione del seme, l'attività sperimentale svolta ha riguardato sia lo studio del metabolismo della cellula spermatica, nel periodo che va dal prelievo del seme alla inseminazione artificiale, che il perfezionamento di una procedura di congelamento sulla razza locale *Mericanel della Brianza (MdB)* e sui riproduttori gran parents di una linea commerciale.

3. Metodiche di valutazione dei parametri qualitativi e quantitativi del materiale seminale utilizzate nelle sperimentazioni.

La soluzione utilizzata per la diluizione del seme di gallo nelle misurazioni e nelle sperimentazioni è il *Diluente Lake* (Lake, 1968), così composto:

- 15.2 gr Sodio glutammato;
- 0.8 gr magnesio acetato;
- 1.28 gr di citrato di potassio;
- 6 gr glucosio;

- 30.5 gr BES;
- 58 ml NaOH 1N

pH 7.1, Osmolarità 370 mOsmol/kg

oppure la sua variante utilizzata durante il congelamento: il *Prefreezing Lake's Diluent* (Saint Jalme et al., 2003)

- 8.0 g D-fruttosio
- 5.0 g Potassio acetato
- 19.2 g Sodio glutammato
- 3 g Polivinilpirrolidone
- 0.7 g Magnesio acetate

pH 7; Osmolarità 340 mOsmol/kg

3.1 Valutazione del volume

Il volume dell'eiaculato è stato misurato subito dopo il prelievo del seme grazie all'utilizzo di una provetta conica graduata.

3.2 Valutazione della concentrazione

La concentrazione dell'eiaculato è stata calcolata con metodo spettrofotometrico (Brillard e Mc Daniel, 1985). La densità ottica (DO) di 10 µl di campione diluiti in 2 ml di soluzione fisiologica era valutata utilizzando una lunghezza d'onda di 535 nanometri. Il valore era poi convertito in miliardi di spermatozoi/ml grazie ad una curva standard di riferimento calcolata nel nostro laboratorio per lo spettrofotometro da noi utilizzato (Accucell, IMV Technologies)

Si eseguivano 2 repliche per campione.

3.3 Valutazione della motilità

- METODO SOGGETTIVO: i campioni di seme con concentrazione di 1×10^9 spz/ml erano diluiti in soluzione fisiologica 1 + 40, mentre i campioni con concentrazione di 1.5×10^9 spz/ml venivano diluiti 1 + 50. Dopo 2 minuti di equilibramento a temperatura ambiente si posizionava una goccia da 10 μ l nella camera di Makler e si valutava la motilità degli spermatozoi classificandoli in percentuale. La valutazione veniva effettuata in doppio per ogni campione.

- PROCEDURA ACCUDENZ® (Froman e Feltmann, 2000): si preparavano i seguenti reagenti:
 - 1) *Motility Buffer o Soluzione A* (50 mM TES pH 7.4, contenente 111 mM NaCl, 25 mM Glucosio e 4 mM di CaCl₂ portato a 100 ml di volume con acqua distillata, Osm 320 mmol/kg);
 - 2) *Soluzione B* (5mM TES, pH 7.4, contenente 3 mM KCl);
 - 3) *Stock Solution* al 30% di Accudenz ® (30 grammi di polvere Accudenz® disciolta in soluzione B e portata ad un volume di 100 ml.)
 - 4) *Dilute Motility Buffer* (Soluzione A portata ad una osmolarità di 290 mmol/kg).
 - 5) *Soluzione al 6% di Accudenz ®* (diluizione della stock solution al 30% con *dilute motility buffer* a raggiungere la concentrazione del 6%)

Si ponevano in una cuvetta 3 ml di *Soluzione al 6% di Accudenz ®* e si incubava in stufa a 41 °C. Il campione di seme era diluito a 1×10^9 /ml con *Motility Buffer* (400 microlitri). Si prelevavano 300 μ l di seme così diluito e si stratificavano sulla superficie della *Soluzione al 6% di Accudenz ®* in cuvetta e si incubava per 5 minuti a 41°C. Si procedeva alla lettura della densità ottica del campione in cuvetta dopo 1 minuto (lunghezza d'onda di 550 nm). Il risultato della valutazione era la lettura di DO, valori maggiori di DO erano indicativi di una motilità maggiore.

3.4 Valutazione della vitalità

- METODO FLUORIMETRICO MODIFICATO

- La vitalità del materiale seminale era valutata utilizzando una procedura modificata (Gliozzi et al., 2003) dell' Ethidium Bromide Exclusion Procedure (Bakst e Cecil, 1997). La procedura si basa sulla capacità del bromuro di etidio di penetrare le cellule con membrana danneggiata e di legarsi al DNA nucleare generando fluorescenza rossa che viene valutata con fluorimetro (Jasco FP 750) utilizzando come emissione una lunghezza d'onda di 570 nanometri e come eccitazione una lunghezza d'onda di 365 nanometri.

Si preparavano i seguenti reagenti:

- 1) *Soluzione tampone* (8.5 g NaCl, 0.262g NaH₂O₄H₂O, in 1 L di acqua distillata, pH 7.2);
- 2) *Soluzione colorante* (24 mg Etidio Bromuro SIGMA, USA, in 10 ml di *Soluzione tampone*);
- 3) *Soluzione al 0.5% di digitonina* (SIGMA, USA) in etanolo assoluto.

L'analisi si svolgeva a temperatura ambiente e mantenendo il campione in cuvetta in costante agitazione. Si trasferivano 10 µl di seme, diluito con *diluente Lake* ad una concentrazione di circa $1.5 - 2 \times 10^9$ /ml, in una cuvetta con 1990 µl di *Soluzione tampone* e si registrava la prima misura di fluorescenza (Lettura A).

Si aggiungevano 10 µl di *Soluzione colorante* e dopo 2 minuti si registrava la seconda misura di fluorescenza (Lettura B).

Si aggiungevano 20 µl di *Soluzione al 0.5% di digitonina* e dopo 2 minuti si registrava la terza misura di fluorescenza (Lettura C).

Inoltre, si registrava la fluorescenza di una soluzione contenente il campione + *Soluzione tampone* + *Soluzione al 0.5% di digitonina* utilizzando gli stessi volumi indicati precedentemente (lettura D) e la misura di fluorescenza propria del colorante (FEB) trasferendo 10 µl di *Soluzione colorante* in 2 ml di *Soluzione tampone*.

Per ogni campione erano effettuate 2 repliche e la percentuale delle cellule danneggiate veniva calcolata con la seguente formula:

$$Y = (\text{Lettura B} - \text{Lettura A} - \text{FEB}) / (\text{Lettura C} - \text{Lettura D} - \text{FEB}) * 100$$

- STRESS TEST

- La valutazione della vitalità era effettuata dopo stress osmotico (Bakst e Cecil, 1997). Questa misurazione si effettuava secondo il metodo fluorimetrico modificato appena descritto, ma utilizzando al posto della *Soluzione tampone* una soluzione tampone iposmotica ottenuta diluendo quest'ultima 1:5 con acqua distillata.

- DOPPIA COLORAZIONE NIGROSINA-EOSINA

La procedura si basa sulla capacità dell'eosina di penetrare le cellule con membrana danneggiata che acquisiscono di conseguenza colorazione rosso-rosata valutabile soggettivamente al microscopio ottico (Bakst e Cecil, 1997).

Si preparavano i seguenti reagenti:

- 1) *Soluzione madre* a pH 7 (17.35 gr di glutammato di sodio, 1.28 gr di potassio citrato monoidrato, 8.51 gr di sodio acetato triidrato e 0.676 gr di cloruro di magnesio esaidrato, portato al volume di 1 L con acqua distillata).
- 2) *soluzione di lavoro* (100 ml di *Soluzione madre*, 1 gr di eosina e 5 g di nigrosina).

Si ponevano in una eppendorf 10 µl di seme diluito a circa 1.5×10^9 spz/ml e **500 µl di soluzione di lavoro**.

Dopo averlo agitato delicatamente, il campione era mantenuto per 2 minuti a temperatura ambiente, quindi si strisciavano sul vetrino 10 µl e si lasciava asciugare. Il campione era poi fissato con Entellan e coperto con coprioggetto. La conta degli spermatozoi vivi (bianco-trasparenti) e di quelli morti (rosa) si effettuava con microscopio ottico con obiettivo 100x ad immersione. Si effettuavano 2 repliche per ogni campione.

- DOPPIA COLORAZIONE LIVE/DEAD®

La procedura si basa sulla proprietà di due coloranti che emettono fluorescenza in seguito al legame con DNA nucleare: SYBR-14 penetra tutte le cellule e genera fluorescenza verde, ioduro di propidio (PI) penetra le cellule con membrana danneggiata (anche se già colorate con SYBR-14) e genera fluorescenza rossa. Si preparavano i seguenti reagenti:

- 1) *SYBR-14* (LIVE/DEAD® Sperm viability kit - Invitrogen) diluito in *DMSO* 1 + 99.
- 2) *PI* (LIVE/DEAD® Sperm viability kit - Invitrogen) diluito con *diluente Lake* 1 + 99.

Si diluivano 5 µl di seme diluito a 1.5×10^9 spz/ml con 44 µl di *diluente Lake* e si aggiungeva 1 µl di *SYBR-14* (reagente 1) e si incubava per 10 minuti al buio a temperatura ambiente. Si aggiungevano 5 µl di *PI* (reagente 2) e si incubava per 5 minuti al buio.

10 µl di campione erano trasferiti su vetrino e stratificati con coprioggetto.

La conta delle cellule vive (verdi colorate col colorante SYBR14) e delle cellule morte (rosse, colorate con PI) era effettuata con microscopio ottico in fluorescenza utilizzando un obiettivo 40x. Si effettuavano due repliche per ogni campione. La conta cellulare al microscopio veniva effettuata sempre il giorno stesso della preparazione del campione.

3.5 Valutazione del pH.

La valutazione veniva effettuata con pH-metro digitale (WTW Inolab pH Level 1), per immersione diretta dell'elettrodo nel campione.

3.6 Analisi lipidica del seme

Preparazione delle aliquote: si preparavano aliquote da 1×10^9 /ml. Il seme diluito era centrifugato a 2000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente, il surnatante si eliminava e il pellet si risospesava in 1 ml di *Lake diluent* e si procedeva alla seconda centrifugata a 3000 rpm per 20 minuti a 5 °C. Il surnatante era eliminato e il pellet risospeso in 0.5 ml di *diluente Lake*.

Estrazione dei lipidi totali: I lipidi totali degli spermatozoi venivano estratti in cloroformio:metanolo (2:1) (Folch et al., 1957) e stoccati in cloroformio a -20 °C.

Separazione delle classi lipidiche: I lipidi totali venivano separati nelle principali classi lipidiche tramite cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography TLC) in cui la fase stazionaria era Silica Gel G60 e la fase mobile una miscela di esano:dietiletere:acido formico (80:20:1). Le due classi principali, i fosfolipidi totali e il colesterolo libero, venivano separate, lavate (i fosfolipidi in metanolo ed il colesterolo libero in dietil etere) e risospesi in cloroformio fino all'analisi successiva.

Composizione acidica dei fosfolipidi totali: I fosfolipidi totali erano sottoposti a transmetilazione utilizzando una miscela di acido solforico:toluene:metanolo (1:10:20) in reflux a 40°C. Ai fosfolipidi totali era aggiunto 1 ml di C15:0 (0.0322 mg/ml in metanolo) come standard interno.

La composizione acidica veniva identificata tramite gas cromatografia (Gas Cromatografo HP 6890 Hewlett Packard, Wilmington, DE) utilizzando una colonna capillare (Carbowax 30 m x 0.25 mm, Alltech, Canforth, GB), e software cromatografico (HP Chemstation, Wilmington, DE) che calcolava la proporzione dei singoli acidi grassi identificati.

Valutazione del colesterolo libero: Il colesterolo libero era quantificato con metodo colorimetrico utilizzando un Kit commerciale (Boehringer, Germany). La misurazione veniva effettuata tramite spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

4. Protocolli di ricerca

L'attività di ricerca svolta ha avuto l'obiettivo generale di ottimizzare la procedura di crioconservazione in pellets in due diversi tipi genetici della specie *Gallus gallus* e di valutare il tipo e l'entità del danno cellulare procurato dalla stessa crioconservazione. Durante il triennio di dottorato si sono svolti i seguenti protocolli sperimentali con obiettivi specifici:

Protocollo 1 Ottimizzazione della procedura di crioconservazione in pellets di seme di galli *Mericanel della Brianza*. Studio della concentrazione di lavoro, concentrazione di DMA e relativa fase di equilibrio.

Protocollo 2 - Ottimizzazione della procedura di crioconservazione in pellets di seme di galli Hubbard. Studio delle fasi successive di lavorazione del seme dal prelievo allo scongelamento.

Protocollo 3 - Valutazione della fertilità *in vivo* utilizzando seme crioconservato di galli Hubbard.

Protocollo 4 – Studio della sensibilità del seme alla crioconservazione in funzione della qualità iniziale. Valutazione della funzione mitocondriale e del danneggiamento al DNA nucleare

Tutti i protocolli sperimentali effettuati facevano riferimento alla metodica pubblicata da Tselutin et al. nel 1995, che prevedeva i seguenti passaggi:

- Raccolta del seme e diluizione con diluente specifico 1:1 o 1:2
- Equilibramento per 20 min ad una temperatura compresa tra -10 e -12 °C
- Aggiunta di Dimetilacetammide (DMA) ad una concentrazione di 6% e equilibramento per 1 min.
- Congelamento per gocciolamento diretto del seme in azoto liquido,
- Raccolta e conservazione dei pellets in azoto liquido.
- Scongelamento rapido a 60 °C.

4.1 Protocollo 1 - Ottimizzazione della procedura di crioconservazione in pellets di seme di galli *Mericanel della Brianza*. Studio della concentrazione di lavoro, della concentrazione di DMA e relativa fase di equilibrio.

L'obiettivo di questo protocollo era verificare tre condizioni di lavoro della procedura di crioconservazione in pellets del seme di galli di razza *Mericanel della Brianza (MdB)* già studiate in un protocollo sperimentale precedente svolto nello stesso laboratorio di zoocolture presso il dipartimento VSA. Le condizioni analizzate erano: la concentrazione di lavoro del seme, la concentrazione del crioprotettore e il relativo tempo di equilibrio.

Materiali e metodi

Per lo svolgimento di questo protocollo si sono utilizzati 16 galli *MdB* di età compresa tra i 26 e i 29 mesi all'inizio della sperimentazione, provenienti da un allevamento amatoriale. I galli erano accasati in gabbie singole presso lo stabulario sperimentale del dipartimento DSA, Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano. Gli animali erano mantenuti in ambiente controllato alla temperatura di 20 °C, ad un fotoperiodo di 14L:10B ed alimentati *ad libitum* con mangime commerciale per riproduttori. I galli erano sottoposti a prelievo di seme secondo la tecnica del massaggio dorso addominale e spremitura della cloaca (Lake e Stewart, 1978).

I soggetti erano divisi in due gruppi di 8 galli ciascuno. Dopo due settimane di addestramento al prelievo manuale del seme, gli animali venivano sottoposti a prelievo di seme costantemente due volte a settimana. Il seme dei maschi di ciascun gruppo veniva riunito a formare un pool, che era valutato per volume e concentrazione e successivamente diluito con *diluente Lake prefreezing* addizionato con glicina 50 mM (Cerolini et al., 2007) per raggiungere la diluizione prevista dal trattamento.

Dopo diluizione, si registrava la qualità del campione (tempo 0 = T0) mediante la misurazione dei seguenti parametri: motilità soggettiva, vitalità con stress test e con colorazione nigrosina-eosina. I metodi di analisi sono stati descritti in precedenza. Il seme veniva processato considerando diverse condizioni:

- 2 concentrazioni di lavoro (1 e 1.5×10^9 spz/ml)
- 2 concentrazioni di DMA (6 e 9% v/v)
- 2 tempi di equilibrio dopo aggiunta di DMA (1 e 30 min)

Tutte le possibili combinazioni ottenute con le condizioni di lavoro corrispondevano a 8 trattamenti diversi. La procedura di crioconservazione si svolgeva in sintesi come segue:

1. Diluizione alla concentrazione di lavoro e prima fase di equilibrio di 20 min a 5 °C;
2. Aggiunta del crioprotettore DMA e seconda fase di equilibrio a 5 °C;
3. Congelamento in pellets per gocciolamento diretto in bagno di azoto liquido di volumi di 100 µl di campione;
4. Scongelamento dei pellets in provette di vetro coniche immerse in bagno termostato a 60 °C per 7 secondi.

Dopo scongelamento si effettuava la valutazione della qualità del campione come al tempo 0. Ogni trattamento prevedeva 4 repliche ottenute in diversi giorni di prelievo.

Il periodo sperimentale si è svolto da Febbraio a Luglio in corrispondenza del ciclo riproduttivo naturale della razza. Durante tutto il periodo si è potuto rilevare costantemente la qualità del materiale seminale sia in termini quantitativi sia qualitativi. Le misurazioni effettuate sono state quindi utilizzate anche per la definizione dell'efficienza riproduttiva dei galli di razza *MdB* durante la stagione di riproduzione. Inoltre, alla fine del periodo sperimentale si sono utilizzati alcuni eiaculati per la valutazione dei principali lipidi spermatici, importanti componenti strutturali e funzionali associate alla capacità fecondante dei gameti. In particolare, si sono rilevati i seguenti parametri: quantità di fosfolipidi totali e di colesterolo, composizione acidica dei fosfolipidi totali.

Le metodiche di analisi sono state descritte nel capitolo precedente.

Analisi statistica

L'analisi statistica si è svolta sui valori di recovery calcolati per i diversi parametri di qualità del materiale seminale misurati. La Recovery (Han et al., 2005) è una percentuale che quantifica l'efficacia del processo di congelamento nel preservare le caratteristiche iniziali del seme. Il valore di Recovery si calcola con la seguente formula (T_0 = misura sul seme fresco, T_{100} = misura dopo congelamento/scongelamento):

$100 - [(\text{Valore a } T_0 - \text{Valore a } T_{100}) / \text{valore a } T_0] \times 100$ Questo dato permette di avere un'idea dell'efficacia del trattamento indipendentemente dalla qualità iniziale del campione.

La Recovery dei parametri motilità e vitalità è stata sottoposta ad analisi della varianza

utilizzando la procedura GLM del software SAS version 8. Si sono utilizzati come fattori di variazione la concentrazione di lavoro, la concentrazione di DMA, il tempo di equilibrio con DMA e le relative interazioni.

Inoltre si sono calcolati i parametri di statistica descrittiva sulle misure relative alla qualità del seme svolte durante l'intero periodo sperimentale corrispondente alla stagione riproduttiva Febbraio-Luglio.

Risultati

I risultati dell'analisi della varianza sono riportati in tabella 1.

| recovery | Fattori di variazione | | Interazioni | | | | |
|----------------------|-----------------------|------|----------------|---------------|-----------------------|------------------|------------------------|
| | Concentrazione Seme | DMA | Equilibrio DMA | conc seme*DMA | Conc seme*tempo equil | DMA* tempo equil | Conc seme*DMA*tempo eq |
| Vivi tot. E/N | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Vivi int. E/N | ns | 0.01 | 0.02 | ns | ns | ns | ns |
| Vitalità ST | ns | ns | 0.01 | ns | ns | ns | ns |
| Motilità | ns | 0.03 | 0.02 | ns | ns | ns | ns |

Tabella 1 Tabella della significatività dei vari fattori e delle interazioni

La concentrazione di lavoro non ha avuto un effetto significativo sulla qualità del seme dopo congelamento/scongelo.

La percentuale di DMA ha influenzato significativamente la recovery di motilità e di cellule vive valutata con la colorazione nigrosina/eosina.

Il tempo di equilibrio con la DMA ha avuto un effetto significativo sulla recovery di cellule vive (stress test e colorazione nigrosina-eosina) e sulla recovery di cellule motili. Tutte le interazioni considerate tra i vari parametri non sono risultate significative.

La qualità del seme misurata subito dopo il prelievo (T0) e dopo congelamento/scongelo (T100) è riportata in tabella 2. La recovery calcolata sulla

percentuale di spermatozoi vivi (stress test e colorazione eosina/nigrosina) e motili è riportata in tabella 2.

| CL | D M A | T D E | T 0 | | | | | T 100 | | | | | Recovery % | | | |
|----|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | | | VIVI E/N | M E/N | MAL E/N | MOT | ST | VIVI E/N | M E/N | MAL E/N | MOT | ST | VIVI E/N | MOT | VIT ST | |
| 1 | 6 | 1 | 62.3± 5.6 | 28.5± 5 | 9.2±1 .5 | 71.3± 5.2 | 10±3. 4 | 6.64± 2.99 | 71.4± 10.3 | 21.9± 9.7 | 26.1± 15.9 | 72.4± 9.3 | 10.4± 4.0 | 36.3± 5.9 | 30.7± 4.5 | |
| | | 30 | 66.8± 1.6 | 24.4± 5.6 | 6.8±5 .2 | 76.3± 4.8 | 6.7±1. 5 | 7.23± 3.93 | 70.3± 7.3 | 22.5± 9.0 | 29.4± 7.3 | 63.5± 11.1 | 10.8± 3.7 | 39.0± 5.6 | 39.2± 4.2 | |
| | 9 | 1 | 69.0± 4.4 | 22.7± 5.7 | 8.3±2 .1 | 65.0± 4.1 | 9.5±3. 0 | 9.04± 6.65 | 63.9± 9.1 | 27.1± 9.7 | 22.0± 14.1 | 58.9± 13.0 | 13.2± 4.0 | 33.3± 5.9 | 45.2± 4.5 | |
| | | 30 | 67.9± 5.8 | 24.8± 3.6 | 7.4±4 .2 | 70.0± 7.1 | 6.5±2. 6 | 19.36 ±13.1 9 | 68.3± 12 | 12.3± 4.8 | 9.7±5. 8 | 73.0± 12.7 | 28.6± 4.0 | 13.4± 4.93 | 28.9± 4.5 | |
| | 1.5 | 6 | 1 | 66.5± 4 | 24.2± 2.0 | 9.3±3 .5 | 75.0± 4.1 | 6.7±3. 8 | 6.92± 4.90 | 72.5± 5.3 | 20.1± 5.1 | 24.3± 5.4 | 65.7± 7.5 | 10.3± 4.0 | 32.3± 5.9 | 36.9± 4.5 |
| | | | 30 | 66.5± 4.5 | 20.3± 4.4 | 13.2± 2.6 | 68.1± 7.5 | 8.1±2 | 10.68 ±8.89 | 70.6± 10.6 | 18.7± 10.0 | 15.6± 8.9 | 77.5± 6.5 | 16.0± 4.7 | 24.9± 7.0 | 24.1± 5.3 |
| 9 | | 1 | 72.5± 2.7 | 17.8± 5.3 | 9.8±4 .9 | 66.3± 11.1 | 5.8±1. 1 | 1.73± 5.50 | 67.9± 16 | 21.9± 19.7 | 19.7± 10.0 | 65.2± 13.8 | 14.8± 3.7 | 32.0± 5.6 | 36.9± 4.2 | |
| | | 30 | 67.6± 5.4 | 21.1± 6.0 | 11.3± 2.1 | 73.1± 5.5 | 5.7±1. 5 | 13.87 ±6.71 | 74.2± 5.3 | 12.0± 4.6 | 11.9± 5.3 | 77.2± 10.3 | 20.7± 3.7 | 16.4± 5.6 | 24.2± 4.2 | |

Tabella 2. Qualità del seme misurata subito dopo il prelievo (T0) e dopo crioconservazione (T100) e relativa recovery (%). Il congelamento prevedeva diverse condizioni relative a: concentrazione di lavoro (CL, x10⁹/ml), DMA (DMA, %) e tempo di equilibrio con DMA (TED, min). La vitalità (%) è stata valutata con colorazione eosina/nigrosina (EN) e stress test (ST).

La minore percentuale di DMA del 6% ha permesso di mantenere un valore medio di recovery della motilità spermatica superiore a quella misurata utilizzando la percentuale maggiore di DMA del 9% (33 vs 24%). Anche il tempo di equilibrio con DMA ha presentato un andamento simile; infatti, in corrispondenza del tempo di equilibrio più breve di 1 min si sono osservati i valori maggiori di recovery sia di spermatozoi vivi (stress test), 37 vs 29%, sia di spermatozoi motili, 33 vs 23%.

La concentrazione di lavoro non ha avuto effetto significativo sulla qualità del seme dopo crioconservazione, tuttavia, si suggerisce di utilizzare la concentrazione di 1.5x10⁹/ml che permette il congelamento di campioni di seme più concentrati e, di conseguenza, più facilmente adattabili ad un eventuale protocollo di inseminazione artificiale dopo scongelamento.

I presenti risultati hanno confermato e completato la procedura di congelamento migliore per il seme di galli *MdB* che risulta la seguente:

Diluizione a 1.5×10^9 /ml in diluente Lake prefreezing

Equilibramento per 20 min a +5 °C

Aggiunta del 6% (v/v) di DMA

Equilibramento per 1min a +5 °C

Congelamento in pellets per gocciolamento in azoto liquido di volumi pari a 100 μ l

Scongelamento a 60°C per 7 sec

La vitalità e motilità spermatica misurata prima e dopo crioconservazione utilizzando questaprocedura è riportata in Figura 1. I corrispondenti valori di recovery di cellule con membrana cellulare integra e motili corrispondono al 37% e 32% rispettivamente.

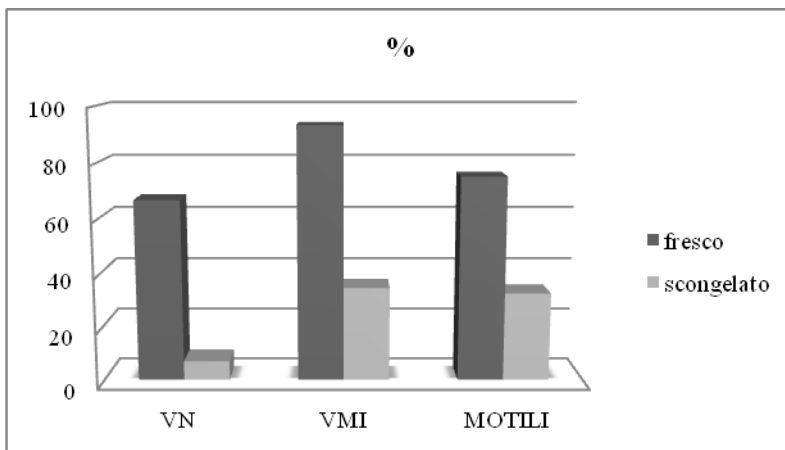


Figura 1 Vitalità (%) e motilità (%) del seme prima e dopo congelamento/scongelamento. Gli spermatozoi vivi normoformati (VN) sono stati valutati con colorazione eosina/nigrosina; gli spermatozoi vivi con membrana integra (VMI) sono stati valutati con stress test.

La qualità del materiale seminale durante la stagione riproduttiva

Il protocollo sperimentale si è svolto da Febbraio a Luglio, corrispondente alla stagione riproduttiva della razza in condizioni naturali, e le misurazioni effettuate permettono di conoscere le caratteristiche qualitative della produzione di seme specifiche della razza autoctona.

| | MEDIA ± DS | MINIMO | MASSIMO |
|---|-------------------|---------------|----------------|
| Volume (µl) | 59.93±15.52 | 35.71 | 104.17 |
| Concentrazione (x10 ⁹ cell/ml) | 2.1±0.52 | 0.99 | 3.45 |

Tabella 3, Parametri statistici descrittivi relativi al volume ed alla concentrazione degli eiaculati nel corso della sperimentazione

In tabella 3 sono riportati i valori medi, le deviazioni standard, i valori minimi e massimi dei parametri quantitativi misurati nei singoli eiaculati durante il periodo sperimentale. In Figura 1 e 2 è riportato rispettivamente l'andamento del valore medio del volume e della concentrazione degli eiaculati durante la stagione riproduttiva. La produzione di seme dei galli *MdB* è risultata inferiore ai valori medi tipici della specie *Gallus gallus* la cui media ammonta a 0.5 – 0.75 ml; tuttavia questo risultato è giustificato dalle ridotte dimensioni corporee dei maschi adulti che raggiungono un peso vivo medio di 800 g, trattandosi di una razza nana. Il volume medio dell'eiaculato è risultato costante durante la stagione riproduttiva, corrispondente a 60 µl, ad eccezione del mese di Marzo in cui è aumentato a 70 µl (Figura 2). Il volume dell'eiaculato ha presentato comunque un ampio range di valori, variando da un minimo di 35.71 ad un massimo di 104.17 µl (Tabella 4). La concentrazione media dell'eiaculato è invece aumentata progressivamente da Febbraio a Maggio per diminuire nell'ultimo mese di Luglio (Figura 3). La concentrazione media del seme è stata di $2.1 \times 10^9 \pm 0.52$ spz/ml con un minimo di 0.99 e un massimo di 3.45×10^9 spz/ml (Tabella 3). Nel mese di Marzo si sono registrati i valori massimi di volume contemporaneamente a concentrazioni piuttosto elevate di cellule/ml e, di conseguenza, può essere considerato il periodo di maggiore efficienza riproduttiva in termini quantitativi dei galli.

I valori medi di vitalità e motilità cellulare sono stati elevati e paragonabili ai valori caratteristici della specie. La percentuale media di spermatozoi vivi e normoformati valutata mediante colorazione eosina/nigrosina è stata di 71.75 ± 7.87 , la percentuale media di cellule vive con malformazioni è stata di 9.26 ± 3.54 , mentre quella di cellule morte di 18.99 ± 7.49 .

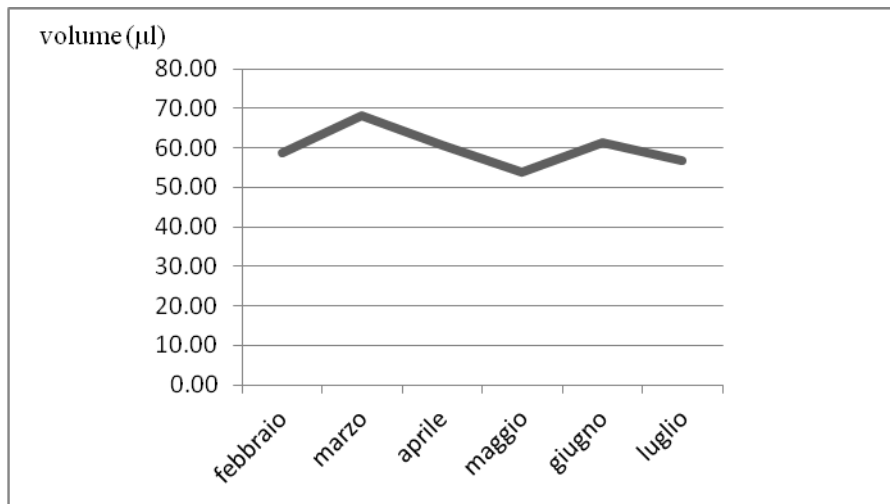


Figura 2. Andamento del volume medio dell'eiaculato di gallo MdB nel corso della stagione riproduttiva considerata.

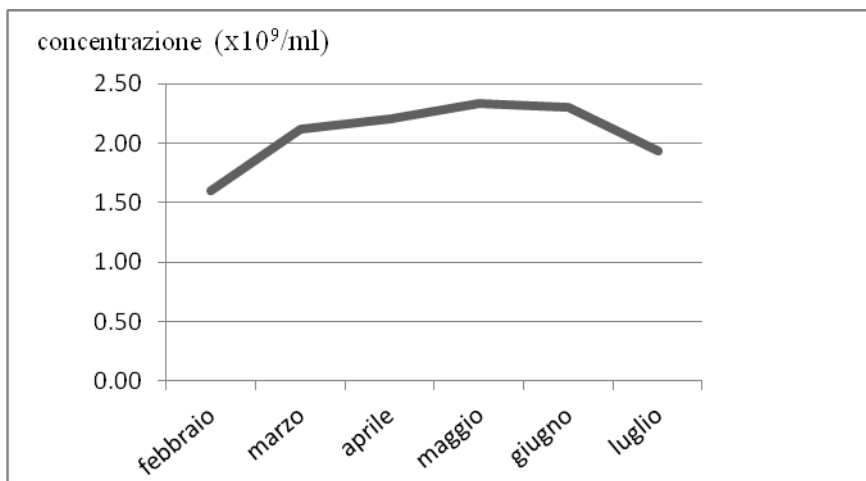


Figura 3 Andamento della concentrazione media del seme di gallo MdB nell'arco della stagione riproduttiva considerata.

Il contenuto di fosfolipidi totali nei gameti maschili è risultato di $210 \pm 42 \mu\text{g}/10^9$ di spermatozoi e di $111 \pm 21 \mu\text{g}/\text{ml}$ di plasma seminale.

L'analisi al gas cromatografo della componente fosfolipidica degli spermatozoi ha confermato l'elevata percentuale di PUFA n-6 che caratterizza gli spermatozoi di gallo; in particolare, si sono distinti i seguenti acidi grassi: C20:4n-6 (acido arachidonico) $9.89 \pm 2.05\%$ e C22:4n-6 (acido docosatetraenoico) $16.25 \pm 3.37\%$. Il rapporto acidi grassi n-3/n-6 è risultato di 0.05 (Tabella 4). La composizione acidica dei fosfolipidi del plasma seminale si differenzia nettamente da quella cellulare; infatti, è stata rilevata una netta prevalenza di

acidi grassi saturi, che rappresentano l'80% degli acidi grassi totali, ed una netta riduzione di acidi grassi polinsaturi, che rappresentano solo l'8% (Tabella 4).

| Acidi Grassi | Spermatozoi | Plasma seminale |
|-----------------|-------------------|------------------|
| C16:0 | 22.28±1.51 | 35.65±3.56 |
| C18:0 | 20.4±4.46 | 27.04±3.21 |
| SFA | 49.45±5.98 | 79.55±3.16 |
| C18:1n-9 | 12.06±2.95 | 7.52±2.35 |
| C18:1n-7 | 1.05±0.73 | 0 |
| C20:1n-9 | 2.29±0.43 | 0 |
| MUFA | 16.21±2.85 | 12.18±3.14 |
| C18:2n-6 | 2.26±0.89 | 1.21±2.42 |
| C20:2n-6 | 0.08±0.15 | 0 |
| C20:4n-6 | 9.89±2.05 | 1.66±1.99 |
| C22:4n-6 | 16.25±3.37 | 0 |
| C22:6n-3 | 1.40±1.63 | 0 |
| PUFA | 34.34±3.44 | 8.27±2.78 |
| n-3 | 1.53±1.82 | 0 |
| n-6 | 32.8±4.11 | 8.27±2.78 |
| n-3/n-6 | 0.05 | |
| PUFA/SFA | 0.71 | 0.1 |

Tabella 4 Composizione in acidi grassi (percentuale degli acidi grassi totali) dei fosfolipidi totali presenti in spermatozoi e plasma seminale di galli Mericanel della Brianza. Si riportano media ± DS degli acidi grassi > 1%.

La quantità di colesterolo libero misurata nel materiale seminale è risultata pari a 942 ± 314 $\mu\text{g}/10^9$ spermatozoi e a 1.66 ± 0.03 mg/ml di plasma seminale.

Discussione e Conclusioni

I risultati ottenuti hanno confermato la validità della procedura di crioconservazione in pellets del seme di galli *MdB* studiata nel laboratorio di zoocolture. In particolare, è stata confermata la maggior qualità del seme congelato/scongelato adottando una ridotta quantità di DMA, 6%, ed un relativo tempo di equilibrio molto rapido di 1 min. Questi risultati confermano la potenziale tossicità del crioprotettore (Donoghue e Wishart, 2000) e quindi la necessità di individuare la percentuale ottimale in grado di svolgere l'azione protettiva specifica senza danneggiare gli spermatozoi.

La concentrazione di lavoro degli spermatozoi non ha avuto effetto significativo sulla qualità cellulare dopo scongelamento e, per una maggiore praticità in previsione della fecondazione artificiale, si suggerisce di adottare la concentrazione di lavoro più elevata in modo tale da contenere il volume delle dosi di inseminazione. Infatti, in caso di seme congelato, la concentrazione della dose di seme si aggira sui 300 milioni di spermatozoi per dose. La ridotta concentrazione del seme di galli *MdB* ha impedito di poter utilizzare concentrazioni di lavoro più elevate, ma si ritiene utile verificare questa condizione anche in protocolli sperimentali futuri in funzione della concentrazione di cellule del seme disponibile. L'identificazione della concentrazione ottimale di lavoro è importante ai fini della standardizzazione della procedura di crioconservazione poiché influisce indirettamente anche sull'efficacia del crioprotettore. In letteratura, viene indicata di norma una diluizione di lavoro del seme in preparazione del congelamento in azoto liquido, ma tale criterio risulta variabile in funzione della concentrazione del campione e non permette una standardizzazione adeguata con un conseguente aumento della variabilità dei risultati finali allo scongelamento. L'intera procedura di crioconservazione adottata, descritta nei precedenti paragrafi, conferma in parte le condizioni originali riportate da Tselutin et al. nel 1995 e introduce alcune importanti variazioni, come l'aggiunta di glicina al diluente (Cerolini et al, 2007), il volume di gocciolamento di 100 μ l e il periodo di scongelamento di pochi secondi (Cassinelli et al. 2008).

Nella tabella 2 è evidenziata la qualità del seme prima del congelamento e dopo scongelamento effettuato con la procedura migliore. Il fattore tempo, come ci si aspettava, risulta essere altamente significativo e il danno cellulare subito durante il processo di congelamento/scongelamento è molto elevato. La procedura ottimale identificata permette il recupero del 37% circa di spermatozoi vitali (valutati con stress test) e del 32% di spermatozoi motili dopo congelamento/scongelamento. I risultati ottenuti si discostano da quelli riportati in letteratura ottenuti con un analogo metodo di congelamento/scongelamento. Blesbois et al. (2005), utilizzando la razza di pollo Geline de Touraine, hanno rilevato una diminuzione di vitalità dall'87 al 32% prima e dopo crioconservazione, con un aumento della percentuale di spermatozoi morti dopo scongelamento pari a tre volte quella misurata sul campione fresco. Utilizzando la stessa metodica di valutazione della vitalità cellulare (colorazione eosina/nigrosina), anche i nostri

risultati hanno evidenziato un aumento di 3 volte della percentuale di spermatozoi morti dal campione fresco a quello crioconservato, tuttavia gli spermatozoi classificati come vivi presentano per la maggior parte anomalie morfologiche (20%) e solo una ridotta percentuale (7%) risulta con morfologia normale. La percentuale di spermatozoi motili nel seme fresco di galli *MdB* è stata soddisfacente, 75%, e si è ridotta a 24% dopo crioconservazione. In letteratura, non esistono altri valori di motilità cellulare misurati prima e dopo crioconservazione in pellets del materiale seminale con cui poter fare un confronto. Utilizzando una diversa procedura di crioconservazione che prevede l'uso di glicerolo e il confezionamento in paillettes, la percentuale di motilità dal seme fresco a quello crioconservato diminuisce da 85-90% a 41-42% (Seigneurin e Blesbois, 1995; Blesbois et al., 2008). La suscettibilità del seme alla crioconservazione e il conseguente danno cellulare dipendono largamente dalla specie di appartenenza del campione considerato (Blesbois, 2005) e dal tipo genetico o razza entro la specie (Blesbois et al., 2007). Inoltre, anche i metodi di valutazione della qualità del seme possono influire sulla valutazione dell'entità del danno cellulare conseguente a crioconservazione (Chalah et al., 1999). Per questi motivi risulta spesso difficile comparare i risultati riportati in letteratura in cui vengono utilizzate condizioni sperimentali differenti. A completamento dei risultati sperimentali ottenuti, si ritiene opportuno svolgere ulteriori indagini mirate soprattutto alla verifica della fertilità *in vivo* del seme crioconservato in pellets.

La qualità del materiale seminale durante la stagione riproduttiva

Dai dati si evidenzia un'elevata variabilità tra i soggetti; essendo una razza rustica, la stagione influenza concentrazione e volume dell'ejaculato. Nel mese di Luglio in particolare, ultimo mese della stagione riproduttiva, abbiamo evidenziato valori bassi per entrambi i parametri valutati, mentre la temperatura dei mesi invernali ha favorito la produzione di seme. La qualità del materiale seminale, valutata come vitalità e motilità, è risultata buona e paragonabile ai valori medi riportati per questa specie in letteratura (Marzoni, 2008). Inoltre, la qualità dei gameti maschili non ha evidenziato variazioni rilevanti durante la stagione riproduttiva.

La quantità di lipidi, fosfolipidi e colesterolo libero misurata nel materiale seminale di galli *MdB* è risultata molto elevata e superiore ai quantitativi rilevati nel materiale seminale di

ibridi selezionati (Cerolini et al., 1997). Le elevate quantità rilevate possono rappresentare una caratteristica della razza autoctona oppure essere giustificate dall'età degli animali, corrispondente al secondo anno di vita. Infatti, l'aumento dei lipidi sia negli spermatozoi sia nel plasma seminale è una variazione osservata in galli riproduttori durante l'invecchiamento da 25 a 60 settimane di vita (Kelso et al., 1996).

La composizione acidica dei fosfolipidi spermatici di questa razza rispecchia quella tipica della specie, con lievi differenze, in particolare nel rapporto tra acidi grassi polinsaturi n-3 e n-6 (0.05 *MdB* vs 0.13 media della specie *Gallus gallus*) (Zaniboni e Cerolini, 2008). La composizione acidica dei fosfolipidi del plasma seminale risulta caratterizzata da una elevata proporzione di acidi grassi saturi, 80%, decisamente superiore ai valori osservati nel plasma seminale di ibridi commerciali (Cerolini et al., 1996). Dato che la composizione in acidi grassi polinsaturi influenza i processi degenerativi del seme e il comportamento delle membrane cellulari durante cambiamenti di stato del seme, incluso lo shock dovuto al freddo, è interessante raccogliere questo genere di dati per confronto con quelli ottenuti da linee genetiche diverse.

4.2 Protocollo 2 - Ottimizzazione della procedura di crioconservazione in pellets di seme di galli Hubbard. Studio delle fasi successive di lavorazione del seme dal prelievo allo scongelamento.

Questo lavoro aveva lo scopo di ottimizzare la tecnica di crioconservazione in pellets sul seme di galli appartenenti ad una linea genetica commerciale, quindi differente dal seme della razza rustica *MdB*. Le condizioni di lavoro relative alle successive fasi di preparazione, congelamento e scongelamento del seme sono state studiate e la procedura ottimale identificata.

Materiali e metodi

Per questa sperimentazione sono stati accasati in gabbie singole 25 galli grand parents della linea da carne Hubbard F15 a 22 settimane di età in stabulario sperimentale (Dipartimento DSA, Facoltà di Medicina Veterinaria). Ai galli era somministrato un mangime composto integrato per riproduttori razionato a 130 g/die/capo, un fotoperiodo di 14L:10B ed una temperatura costante di 20 °C. Dopo 2 settimane di addestramento al prelievo manuale del seme, i galli sono stati prelevati regolarmente tre volte a settimana (lunedì, mercoledì e venerdì) da Dicembre a Febbraio. Gli animali erano divisi in 5 gruppi, il seme dei galli appartenenti a ciascun gruppo era riunito a formare un pool.

Il pool di seme veniva analizzato a fresco per i seguenti parametri (le metodiche sono state descritte in precedenza):

- Volume
- Concentrazione
- Motilità oggettiva con procedura ACCUDENZ®
- Vitalità (stress test)
- Motilità soggettiva

Il seme veniva quindi processato secondo differenti protocolli per confrontare l'efficacia dei seguenti trattamenti:

- Diluizione iniziale del seme a 1.5 o 2×10^9 spz/ml in diluente Lake prefreezing con glicina 50 mM
- Primo tempo di equilibrio di 20 o 40 minuti a 5 °C
- Aggiunta di DMA 6 o 9%

- Tempo di equilibrio dopo aggiunta di DMA di 1 o 30 minuti
- Scongelamento per 7 secondi a 60 °C o 30 secondi a 50 °C in bagno termostato

In totale si avevano 32 trattamenti e si sono effettuate 4 repliche per ogni trattamento.

Dopo aver calcolato la recovery sulle misurazioni di motilità e vitalità come descritto nel protocollo 1, si è proceduto all'analisi statistica dei dati. Si è svolta l'analisi della varianza utilizzando la procedura GLM del software SAS version 8. Si sono utilizzati come fattori di variazione la concentrazione di lavoro, il tempo di equilibrio, la concentrazione di DMA, il tempo di equilibrio con DMA, la modalità di scongelamento e le relative interazioni.

Risultati

L'analisi della varianza ha evidenziato un'influenza significativa ($P < 0.05$) della concentrazione di lavoro sulla recovery di cellule motili (valutazione soggettiva), della percentuale di DMA sulla recovery di cellule vive e del tempo di equilibrio con DMA sulla recovery della motilità oggettiva (procedura ACCUDENZ®) (Tabella 1).

| variabili | Concentrazione di lavoro | Primo Tempo equilibrio | DMA | Secondo Tempo equilibrio | Scongelamento |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------|---------------------------------|----------------------|
| Motilità | 0.0029 | ns | ns | ns | ns |
| Vitalità | ns | ns | 0.0434 | ns | ns |
| Accudenz | ns | ns | ns | 0.046 | ns |

Tabella 1 Risultati dell'analisi della varianza. La probabilità dei singoli fattori di variazione è riportata per la recovery delle variabili qualitative misurate.

Le possibili interazioni tra i diversi fattori di variazione considerati non sono risultati significativi per nessuna variabile e sono quindi stati eliminati dal modello (dati non riportati).

In tabella 5 si riportano i valori dei parametri qualitativi del seme misurati subito dopo il prelievo, tempo 0, e dopo congelamento/scongelamento, tempo 100, in funzione della concentrazione di lavoro; in tabella 6 le recovery relative al trattamento migliore. In tabella 7 si riportano i valori dei parametri qualitativi del seme dopo il tempo di equilibrio. La concentrazione spermatica di lavoro è risultata significativa sulla recovery di cellule motili,

infatti l'aumento della concentrazione di lavoro da 1.5 a 2×10^9 /ml ha diminuito significativamente la recovery di spermatozoi motili dopo crioconservazione dal 22 al 16 (Tabella 2).

| Recovery (%) | Concentrazione di lavoro ($\times 10^9$ spz/ml) | |
|-----------------|--|-----------------------|
| | 1.5 | 2 |
| Motilità | 21.65 ± 1.30 a | 16.12 ± 1.31 b |
| Vitalità | 37.60 ± 1.50 | 35.10 ± 1.51 |
| Accudenz | 2.62 ± 0.37 | 1.67 ± 0.37 |

Tabella 2 Valori di recovery (medie stimate ± ES) relative alla motilità e vitalità spermatica misurate dopo crioconservazione utilizzando diverse concentrazioni di lavoro (a,b indicano una differenza significativa fra i trattamenti con $P < 0.05$).

La recovery di cellule vive è risultata significativamente superiore, 39 vs 34% , aumentando la percentuale di DMA dal 6 al 9 % (Tabella 3).

La recovery di motilità misurata con la procedura Accudenz è invece risultata significativa sul tempo di equilibrio del crioprotettore: il risultato migliore del 2.7% si è osservato con un tempo di equilibrio molto breve di 1 minuto e aumentare il tempo a 30 minuti ha provocato una diminuzione significativa della recovery all'1.6% (Tabella 4).

La durata del primo tempo di equilibrio a 5°C non è risultata significativa sulle variabili misurate e si suggerisce di adottare il tempo più breve di 20 minuti per diminuire il tempo di conservazione *in vitro* del campione prima del congelamento. Anche le condizioni di scongelamento non hanno avuto un effetto significativo sulle variabili misurate, tuttavia le recovery più elevate di motilità oggettiva e vitalità si sono osservate effettuando lo scongelamento a 50°C per 30 secondi che viene suggerito come procedura ottimale.

| Recovery (%) | DMA (%) | |
|--------------|----------------|----------------|
| | 6 | 9 |
| Motilità | 20.13 ± 1.27 | 17.64 ± 1.33 |
| Vitalità | 34.11 ± 1.47 a | 38.59 ± 1.54 b |
| Accudenz | 2.24 ± 0.36 | 2.06 ± 0.38 |

Tabella 3 Valori di recovery (medie stimate ± ES) relative alla motilità e vitalità spermatica misurate dopo crioconservazione utilizzando diverse concentrazioni di DMA (a,b indicano una differenza significativa fra i trattamenti con P<0.05).

| Recovery (%) | Tempo di equilibrio | |
|--------------|---------------------|--------------------|
| | 1 min | 2 min |
| Motilità | 18.69 ± 1.29 | 19.08 ± 1.32 |
| Vitalità | 35.39 ± 1.49 | 37.31 ± 1.52 |
| Accudenz | 2.68 ± 0.37 | 1.61 ± 0.37 |

Tabella 4 Valori di recovery (medie stimate ± ES) relative alla motilità e vitalità spermatica misurate dopo crioconservazione utilizzando diversi tempi di equilibrio con DMA (a,b indicano una differenza significativa fra i trattamenti con P<0.05).

| C L | D M A | T D E | % T 0 | | | | | % T 100 | | | | |
|--------|-------------|-------------|--------------|---------------|------------|---------------|-------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------|
| | | | V E/N | M E/N | MAL E/N | MOT | ST | V E/N | M E/N | MAL E/N | MOT | ST |
| [1] | 6 | 1 | 62.3±5. 6 | 28.5±4. 99 | 9.2±1.5 | 71.3±5. 0 | 10±3. 4 | 6.6±3 | 71.4±10 .3 | 21.9±9.7 | 26.07±15. 93 | 72.4±9. 3 |
| | | 30 | 66.8±1. 6 | 24.4±5. 6 | 6.8±5.2 | 76.3±5. 0 | 6.7±1. 5 | 7.2±3.9 | 70.3±7. 2 | 22.5±9.0 | 29.38±7.2 9 | 63.5±11 .1 |
| | 9 | 1 | 69.0±4. 4 | 22.7±5. 7 | 8.3±2.1 | 65±4.1 | 9.5±3. 0 | 9.0±6.6 | 63.9±9. 1 | 27.1±9.7 | 21.97±14. 12 | 58.9±12 .9 |
| | | 30 | 67.9±5. 8 | 24.8±3. 6 | 7.4±4.2 | 70.0±7. 1 | 6.5±2. 6 | 19.4±13 .2 | 68.3±12 .0 | 12.3±4.8 | 9.71±5.82 | 73.0±12 .7 |
| [1.5] | 6 | 1 | 66.5±4. 0 | 24.2±2. 1 | 9.3±3.5 | 75.0±4. 1 | 6.7±3. 8 | 6.9±4.9 | 72.5±5. 3 | 20.1±5.08 | 24.29±5.4 | 65.7±7. 5 |
| | | 30 | 66.5±4. 5 | 20.3±4. 4 | 13.2±2.6 | 68.1±7. 5 | 8.1±2. 0 | 10.7±8. 9 | 70.6±10 .6 | 18.73±10. 02 | 15.6±8.9 | 77.5±6. 5 |
| | 9 | 1 | 72.5±2. 7 | 17.8±5. 3 | 9.8±4.9 | 66.3±11 .1 | 5.8±1. 1 | 1.7±5.5 | 67.9±16 .0 | 21.93±19. 68 | 19.7±10.0 | 65.2±13 .8 |
| | | 30 | 67.6±5. 4 | 21.1±6. 0 | 11.3±2.1 | 73.1±5. 5 | 5.7±1. 5 | 13.9±6. 7 | 74.2±5. 3 | 11.97±4.6 3 | 11.9±5.3 | 77.2±10 .3 |

Tabella 5. Qualità del seme misurata subito dopo il prelievo (T0) e dopo crioconservazione (T100. Il congelamento prevedeva diverse condizioni relative a: concentrazione di lavoro (CL, x10⁹/ml), DMA (DMA, %) e tempo di equilibrio con DMA (TDE, min). La vitalità (%) è stata valutata con colorazione eosina/nigrosina (EN) e stress test (ST)

| CL | DMA | T EQ | % Recovery (MEANS E ES) | | |
|-------|-----|------|-------------------------|------------|-------------|
| | | | N/E VIVI TOT | MOT | FLUO VIVE |
| [1] | 6 | 1 | 10.41±3.96 | 36.31±5.93 | 30.68±4.51 |
| | | 30 | 10.82±3.70 | 39.02±5.55 | 39.18±4.21 |
| | 9 | 1 | 13.19±3.96 | 33.27±5.93 | 45.23±4.51 |
| | | 30 | 28.58±3.96 | 13.37±.93 | 28.90±4.51 |
| [1.5] | 6 | 1 | 10.29±3.96 | 32.33±5.93 | 36.9 ± 4.51 |
| | | 30 | 15.97±4.68 | 24.87±7.02 | 24.14±5.33 |
| | 9 | 1 | 14.82±3.70 | 31.97±5.55 | 36.90±4.22 |
| | | 30 | 20.66±3.70 | 16.39±5.55 | 24.21±4.22 |

Tabella 6. Recovery della qualità del seme dopo crioconservazione (T100) e relativa recovery (%).

| conc | % DMA | t equil | % dopo equilibrio | | | | |
|-------|----------|-----------|-------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | | | N/E VIVI | N/E MOR | N/E MAL | MOT | FLUO DAN |
| | | 1 | 52.57±5.61 | 38.41±4.91 | 9.03±1.29 | 71.88±4.27 | 12.25±1.44 |
| | 6 | 30 | 60.15±2.88 | 30.30±2.84 | 9.55±1.74 | 76.88±2.39 | 19.48±5.11 |
| | | 1 | 58.37±6.58 | 27.06±3.50 | 14.58±6.66 | 60.00±4.08 | 11.32±2.12 |
| [1] | 9 | 30 | 67.85±2.39 | 24.75±5.86 | 7.40±3.58 | 70.00±8.54 | 6.45±3.59 |
| | | 1 | 60.31±5.94 | 27.97±6.10 | 11.7±2.76 | 73.75±4.79 | 8.04±3.18 |
| | 6 | 30 | 49.54±14.84 | 21.91±5.55 | 28.55±18.98 | 45.63±12.97 | 12.91±1.37 |
| | | 1 | 60.28±5.13 | 27.56±5.82 | 12.17±5.99 | 61.25±6.29 | 11.93±2.11 |
| [1.5] | 9 | 30 | 57.63±7.78 | 26.22±10.16 | 16.16±8.01 | 40.00±12.25 | 12.51±1.81 |

Tabella 7 Qualità del seme misurata dopo il tempo di equilibrio dopo l'aggiunta di DMA.

La misura della motilità con la metodica ACCUDENZ[®] al 6% sui campioni congelati/scongelati ha fornito valori di DO molto bassi, compresi mediamente fra 0.001 e 0.025, probabilmente dovuti allo scarso potere di penetrazione nella soluzione densa dei gameti conservati. Nonostante questa misura sia stata comunque in grado di evidenziare differenze significative nei campioni di seme crioconservato, si ritiene opportuno modificare le condizioni della misurazione e adattare alle caratteristiche del seme crioconservato allo scopo di ottenere misure di DO sicuramente superiori allo zero.

In base ai risultati ottenuti, la procedura ottimale di crioconservazione in pellets di materiale seminale di galli della linea parentale Hubbard è risultata la seguente:

- Diluizione del seme fresco alla concentrazione di lavoro di 1.5×10^9 /ml in diluente Lake prefreezing con 50 mM glicina;
- Prima fase di equilibrio di 20 minuti a 5°C;
- Aggiunta di DMA 9% ed equilibrio di 1 minuto a 5°C;
- Gocciolamento di 100 µl di campione direttamente in bagno di azoto liquido e formazione di pellets di seme congelato;
- Scongelo in bagno termostato a 50°C per 30 secondi.

La qualità del seme congelato/scongelato e i relativi valori di recovery utilizzando la combinazione migliore delle condizioni studiate è riportata in tabella 8.

| | T 0 | T 100 | recovery |
|----------------------------|--------------|---------------|-----------------|
| Motilità (%) | 62.33 ± 5.70 | 12.40 ± 8.04 | 20.03 ± 4.88 |
| Accudenz (DO) | 0.45 ± 0.33 | 0.01 ± 0.01 | 5.78 ± 1.53 |
| Spz danneggiati (%) | 14.75 ± 7.26 | 71.49 ± 14.05 | 40.06 ± 5.79* |

Tabella 8 Qualità del materiale seminale (medie stimate ± ES) misurata prima (T0) e dopo (T100) crioconservazione e relativi valori di recovery utilizzando la procedura ottimale studiata (*la percentuale di recovery è stata calcolata sulle cellule vive).

Discussione e conclusioni

Con questo esperimento è stata individuata la combinazione di fattori statisticamente più vantaggiosi per la crioconservazione in pellets del seme di galli appartenenti alla linea parentale dell'ibrido da carne Hubbard F15.

I galli grand parents durante la sperimentazione hanno risentito negativamente delle condizioni di stabulazione e sicuramente la qualità del seme è stata influenzata da questo fattore.

La percentuale di DMA necessaria a svolgere una azione protettiva sui gameti durante il processo di congelamento/scongelo è risultata del 9%, valore superiore a quello individuato per la crioconservazione del seme di galli *MdB* (protocollo 1). La maggior percentuale di crioprotettore permette la sopravvivenza alla crioconservazione del 40% degli spermatozoi vivi con membrana cellulare integra presenti inizialmente nel campione fresco, ma solo il 20% di spermatozoi motili. Al contrario, nella razza locale, è stato possibile ottenere dopo crioconservazione una recovery di cellule motili superiore, pari al 32%, nonostante l'utilizzo di una minore quantità di crioprotettore. In generale, questi risultati evidenziano una diversa sensibilità alla crioconservazione del seme dei due tipi genetici che potrebbe essere attribuita alla differenza di qualità iniziale del materiale seminale, più scadente nell'ibrido, oppure a caratteristiche strutturali e funzionali dei gameti che non sono state prese in considerazione. In particolare, la minore qualità del seme fresco dei galli Hubbard rispetto a quello dei galli di razza locale era dovuta sia ad una maggior

presenza di gameti con membrana cellulare danneggiata sia ad una minore presenza di gameti motili.

L'importanza della qualità iniziale del seme ai fini del successo di crioconservazione è stata oggetto di indagine in un protocollo sperimentale successivo.

In sintesi, i risultati ottenuti confermano l'elevata variabilità esistente nella sensibilità alla crioconservazione del seme ottenuto da tipi genetici diversi e, di conseguenza, la necessità di verificare per ogni tipo genetico le migliori condizioni di lavoro *in vitro* del seme allo scopo di ottimizzare il possibile successo di crioconservazione dei gameti maschili.

4.3 Protocollo 3 - Valutazione della fertilità *in vivo* utilizzando seme crioconservato di galli Hubbard.

Materiali e metodi

Il gruppo di galli Hubbard F15 utilizzati nel protocollo sperimentale precedente sono stati mantenuti nelle stesse condizioni già descritte anche per lo svolgimento del presente protocollo. I prelievi di seme sono continuati con una regolare frequenza di 2 prelievi/settimana. Si sono utilizzati gli eiaculati di 7 galli uniti a formare 4 pools di seme. Il seme di ogni pool era analizzato a fresco e si effettuava la misurazione della vitalità (doppia colorazione LIVE/DEAD sperm viability kit®) e della motilità (procedura ACCUDENZ®). Il seme veniva poi congelato/scongelato tramite la metodica in pellets messa a punto nel protocollo descritto in precedenza. Il seme era conservato in azoto liquido per alcuni giorni prima dello scongelamento. Gli eiaculati dei 7 galli sono stati congelati in diversi giorni di prelievo allo scopo di ottenere un numero di pellets per ogni pool di seme adeguato a fecondare 4 galline ovaiole per 3 inseminazioni consecutive.

Le inseminazioni sono state effettuate in galline ovaiole stabulate in gabbie singole in ambiente controllato (Dipartimento DSA, Facoltà di Medicina Veterinaria). Le galline erano alimentate *ad libitum* con un mangime commerciale standard per galline in ovodeposizione e ricevevano un fotoperiodo di 15L:9B. La temperatura ambiente era 20°C. In totale si sono utilizzate 16 galline (4 per ogni pool di seme). Le galline sono state inseminate ogni 3 giorni per 4 volte consecutive (2 settimane in totale) con lo stesso pool di provenienza ed utilizzando una dose di inseminazione di 300×10^6 spermatozoi.

Le uova venivano raccolte ogni giorno, marcate con il numero della gallina e la data di ovodeposizione e incubate 1 volta a settimana per 3 settimane consecutive. La percentuale di ovodeposizione è stata calcolata con la seguente formula:

numero uova in n. giorni / (numero galline x n. giorni) x 100.

I parametri di incubazione corrispondevano a quelli standard per la specie *Gallus gallus*, temperatura 37.7 °C e umidità relativa (UR) 45-50% in fase di incubazione e 37.2 °C con UR 70-80% in fase di schiusa. La fertilità è stata valutata al 7° giorno di incubazione mediante speratura; tutte le uova non fecondate sono state aperte per valutare la mortalità embrionale molto precoce nelle prime 24-48 ore di incubazione. L'incubazione delle uova fertili è stata completata fino alla schiusa.

Risultati

Il seme fresco dei quattro pools utilizzato per il congelamento/scongelo e la successiva inseminazione artificiale possedeva le seguenti caratteristiche qualitative (media \pm DS): Accudenz (DO): 0.59 ± 0.22 ; Vitalità (%): 78.75 ± 7.96 .

Nel corso di tre settimane sono state deposte 180 uova in totale. Nella prima settimana si è registrato il 70.4% di ovodeposizione, nella seconda il 93.1% e nella terza l'83%.

Alla speratura solo un uovo della prima e un uovo della seconda incubazione sono risultati fertili. Le uniche due uova trovate fertili sono state entrambe deposte dalla stessa gallina, e quindi la fecondazione è avvenuta con lo stesso pool di seme, 3 giorni dopo l'inseminazione.

Le uova incubate la settimana successiva all'ultima inseminazione sono risultate tutte chiare (0 fertili su 38 uova incubate). La percentuale di fertilità del seme crioconservato è risultata di 1.89.

Entrambe le uova fertili hanno schiuso un pulcino vivo.

Discussione e conclusioni

La percentuale di fertilità ottenuta fecondando artificialmente galline ovaiole (fecondazione eterologa) con seme crioconservato di galli di linea parentale Hubbard è stata dell'1.89%. Questo dato è inferiore rispetto a quello atteso dopo l'analisi qualitativa *in vitro* del seme. Le analisi indicavano, infatti, la presenza di circa il 20% di spermatozoi motili e con membrana integra dopo congelamento/scongelo. D'altra parte, è anche opportuno osservare che la capacità di movimento dei gameti, parametro correlato con la capacità fecondante (Froman, 2000) dopo conservazione era drasticamente ridotta, come dimostrato dal test Accudenz.

La divergenza tra i dati di qualità *in vitro* e quelli di fertilità *in vivo* sta ad indicare la complessità dei meccanismi che entrano in gioco nel processo di fecondazione dell'uovo, che vanno oltre la motilità e vitalità, da qui la necessità di incrementare il tipo di analisi per predire il comportamento del seme *in vivo*.

Il risultato ottenuto, benché basso, è comunque in linea con altri risultati presenti in bibliografia che riportano una perdita della capacità fecondante del 98% (Donoghue e Wishart, 2000) in generale del seme crioconservato di gallo e, in particolare, di linee genetiche caratterizzate da scarsa efficienza riproduttiva (Blesbois et al., 2007).

4.4 Protocollo 4 – Studio della sensibilità del seme alla crioconservazione in funzione della qualità iniziale. Valutazione della funzione mitocondriale e del danneggiamento al DNA nucleare

Questo lavoro aveva lo scopo di valutare la sensibilità del seme al danno da congelamento/scongelo in relazione alla sua qualità al momento del prelievo e quindi la possibilità di predire il comportamento del seme dopo congelamento/scongelo in funzione della qualità iniziale. La sperimentazione si svolgeva in due fasi: una prima fase di classificazione dei galli riproduttori in base alla qualità dell'eiaculato, una seconda fase di valutazione dei danni subiti dal seme in seguito alla procedura di congelamento e scongelamento mettendo a confronto materiale seminale di alta e bassa qualità.

Per valutare il danno cellulare, oltre ad analisi qualitative già utilizzate nei protocolli precedenti, si è valutata la funzionalità mitocondriale dopo scongelamento, l'integrità del DNA nucleare tramite il metodo COMET e la presenza dello SNP 11177 nel DNA mitocondriale. I mitocondri sono gli organuli cellulari deputati alla produzione di energia e la loro funzionalità è pertanto legata alla vitalità, alla motilità e a tutte le attività cellulari. In studi recenti, la funzione mitocondriale è stata valutata utilizzando un marcatore fluorescente specifico per la membrana mitocondriale (Mc Clean, 2008). La tecnica COMET è stata utilizzata in diversi animali domestici proprio come test di valutazione del danno subito dai gameti maschili in seguito a diverse condizioni di stress, inclusa la crioconservazione (Gliozzi et al., 2011). La presenza dello SNP 11177 nel DNA mitocondriale è stata associata ad una alterata funzione mitocondriale, a sua volta associata ad una ridotta motilità spermatica in una linea genetica selezionata per la ridotta motilità (Froman e Kirby, 2005).

Materiali e metodi

Si sono utilizzati 30 galli Hubbard accasati in gabbie singole in stabulario sperimentale (Dipartimento DSA, Facoltà di Medicina Veterinaria) ad ambiente controllato. Il management di allevamento dei galli e le modalità di prelievo del seme sono state descritte nel precedente protocollo 2.

Fase sperimentale 1 - Classificazione dei riproduttori in funzione della qualità del seme

Gli eiaculati di tutti i riproduttori sono stati sottoposti singolarmente ad analisi qualitativa ad ogni prelievo per 2 settimane consecutive. I parametri qualitativi misurati erano i seguenti:

- volume;
- concentrazione;
- motilità spermatica soggettiva e oggettiva tramite procedura ACCUDENZ®;
- vitalità tramite metodo fluorimetrico modificato.

In base alla variabilità dei parametri qualitativi misurati si prevedeva di identificare due gruppi di galli uno ad alta qualità ed uno a bassa qualità da utilizzare nella fase sperimentale 2. L'obiettivo era individuare due gruppi che presentassero differenza significativa fra le medie dei rispettivi parametri qualitativi del materiale seminale.

Fase sperimentale 2 - Valutazione del danno cellulare dopo crioconservazione in materiale seminale di alta e bassa qualità.

Gli eiaculati dei galli inclusi nei gruppi migliori e peggiori sono stati sottoposti alla procedura di crioconservazione in pellets messa a punto in precedenza per questo tipo genetico (protocollo 2).

La sensibilità alla crioconservazione dei due gruppi sperimentali è stata valutata mediante la misurazione dei seguenti parametri:

- parametri qualitativi tradizionali, vitalità e motilità;
- integrità del DNA nucleare;
- funzionalità mitocondriale;
- presenza di SNP 11177 nel DNA mitocondriale.

Parametri qualitativi tradizionali

La misurazione della motilità è stata effettuata con metodo ACCUDENZ® e quella della vitalità con metodo LIVE/DEAD Sperm viability kit® (metodiche descritte in precedenza). La qualità del seme era valutata subito dopo il prelievo (tempo 0) e dopo congelamento/scongelo (tempo 100). La procedura è stata ripetuta in diversi giorni di prelievo allo scopo di avere 3 repliche per ogni riproduttore.

Integrità del DNA nucleare

L'integrità del DNA nucleare è stata valutata con procedura COMET (Olive et al., 2001). La misurazione è stata effettuata sia in materiale seminale fresco sia dopo crioconservazione e si sono svolte misurazioni in doppio per ogni campione.

Si preparavano i seguenti reagenti:

- *PBS/BSA solution*: BSA 10 mg/ml in PBS
- *Gel di agarosio a basso punto di fusione*: LMPA, 0.8 % w/v in PBS
- *Gel di agarosio a punto di fusione normale*: 1.5 % w/v in PBS
- *Lysis buffer*: 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 100 mM Tris, 1 % Triton X-100 (TX), 10 mM DTT, pH 10)
- *Proteinase K*
- *Soluzione per elettroforesi neutra*: TAE, pH 7.3
- *Neutralising buffer*: 0.4 Tris HCl, pH 7.5
- *Metanolo*
- *Etidio bromuro*: 20 µg/ml in PBS

La procedura prevede diversi passaggi: preparazione dei campioni, gel elettroforesi sulle singole cellule, fissaggio e colorazione delle cellule, valutazione ed elaborazione risultati con software dedicato.

Il campione era diluito con *diluyente Lake* a raggiungere una concentrazione di 1×10^6 spz/ml e lavato due volte tramite centrifugazione in *PBS/BSA solution*. Gli spermatozoi erano poi mescolati a 37 °C con *Gel di agarosio a basso punto di fusione*. Si pipettava poi la soluzione su un vetrino da microscopio precedentemente ricoperto di *Gel di agarosio a punto di fusione normale* e si copriva con vetrino coprioggetti. Dopo solidificazione del gel (lasciato per 10' a 4 °C), il vetrino copri oggetti veniva rimosso e al suo posto si poneva un terzo strato di gel, *Gel di agarosio a basso punto di fusione*. Una volta ricoperto da vetrino coprioggetti, il gel veniva lasciato solidificare a 4 °C. A questo punto si toglieva il vetrino copri oggetti e il vetrino col campione veniva immerso in *Lysis buffer* per 1 ora a 4 °C. Il vetrino era poi incubato a 37 °C in 5 µg/ml di *Proteinase K* in *Lysis buffer* per 1 ora. Il

vetrino era quindi risciacquato in PBS e equilibrato nella tanica da elettroforesi immerso nella *Soluzione per elettroforesi neutra* per 20'. Si effettuava quindi l'elettroforesi a temperatura ambiente a 10 V e 8 mA per 20'.

Il vetrino era lavato in *Neutralising buffer*, fissato in metanolo, asciugato e stoccato asciutto fino all'analisi. Il campione veniva quindi colorato con *Etidio bromuro* e sciacquato in PBS. Si poneva un vetrino copri oggetti e si analizzava con microscopio a epifluorescenza (Leica DMLB) ad un ingrandimento di 400x.

Per ogni vetrino venivano osservati 200 spermatozoi random, che venivano classificati in "danneggiati" e "non danneggiati" e veniva effettuata una proporzione tra di essi. Venivano scattate immagini di ogni campo con Leica DC 300F e software FW 4000. Duecento spermatozoi per campione venivano analizzati tramite software CASP (Comet Assay Software Project 1.2.2) che permette di calcolare una serie di parametri elencati come segue:

- "Tail DNA", indica la percentuale di DNA presente nella coda della cometa, la percentuale è classificata in 5 classi:

1 = 0-10% (no danno)

2 = 10-25%

3 = 25-50%

4 = 50-75%

5 = >75%

la distribuzione degli spermatozoi nelle 5 classi è stata calcolata sul totale delle cellule;

- "Tail lenght", è la distanza in μm tra il bordo della testa e la fine del DNA migrato;
- "Comet lenght", è la distanza in μm tra il bordo destro e sinistro della cometa;
- "Olive tail moment", è un parametro espresso come il prodotto tra la percentuale di DNA nella coda della cometa e la distanza tra il punto medio del DNA nella testa e nella coda della cometa.

Le misurazioni effettuate dal software sono espresse in pixel.

Funzionalità mitocondriale

Il potenziale di membrana mitocondriale (MMP) preso come indicatore di funzionalità mitocondriale veniva valutato utilizzando il sensore di potenziale mitocondriale JC-1 (Invitrogen), colorazione cationica, secondo la metodica indicata da Zee (2007). La colorazione JC-1 si accumulava in maniera potenziale-dipendente nei mitocondri, l'accumulo era indicato dall'emissione di una fluorescenza che virava dal verde (~ 525 nm) al rosso (~ 590 nm). La depolarizzazione mitocondriale era indicata da un viraggio dalla fluorescenza rossa verso lo spettro del verde. La mutazione del colore era dovuta alla formazione degli aggregati fluorescenti (detti aggregati-J), la cui formazione era dipendente dal potenziale di membrana.

Questa misurazione è stata effettuata in campioni di seme congelato/scongelato presso il laboratorio di analisi della Zoological Society of London (Regent's Park, Londra) con la supervisione del Professor William V. Holt.

Si preparavano i seguenti reagenti:

- 1) *stock solution* diluendo 5 mg di JC-1 in 1 ml di DMSO (Dimetilsolfossido) e si stoccava a -20 °C in provette da PCR 0.2.
- 2) *SYBR-14* (LIVE/DEAD® Sperm viability kit - Invitrogen) *diluito in DMSO* 1:99
- 3) *Etidio omodimero-1*: 1.167 mM (Peña F.J. et al. 2005)

I pellets di seme venivano scongelati a 50°C per 30 sec.. Ad 1 ml di seme, diluito con *Lake's diluent* ad una concentrazione di 1.5×10^9 spz/ml, si aggiungevano 0.3 µl di *stock solution* e si incubava per 30 min al buio in stufa a 41 °C.

Il seme veniva poi diluito con *Lake's diluent* a raggiungere una concentrazione di 4.5×10^6 spz/ml.

Si aggiungevano poi 1.9 µl /ml di SYBR-14 e 2 µl /ml di etidio omodimero-1 (EO1) e si incubava per 10 min a 41 °C al buio.

Una goccia di campione da 10 µl era trasferita su vetrino e coperta con coprioggetto, quindi si procedeva alla classificazione di 200 spermatozoi al microscopio in fluorescenza classificandoli come segue: morti (testa rossa), vivi con potenziale di membrana mitocondriale basso (testa verde) e vivi con potenziale di membrana mitocondriale alto (testa verde e tratto intermedio arancio). La frequenza degli spermatozoi nelle 3 classi era calcolata in percentuale.

Ricerca dello SNP 11177 nel DNA mitocondriale

La ricerca dello SNP 11177 nel DNA mitocondriale è stata effettuata in campioni di seme congelato/scongelato seguendo la procedura di Froman e Kirby (2005). L'analisi si è svolta presso il laboratorio della Zoological Society of London, Regent's Park, Londra, dove ho svolto un periodo di studio sotto la supervisione del Professor William V. Holt.

La procedura di analisi prevedeva diverse fasi: estrazione del DNA totale, amplificazione e purificazione del DNA mitocondriale, elettroforesi,

I pellets di seme congelato venivano scongelati in bagno termostato a 50°C per 30 sec e si procedeva alla estrazione del DNA totale dagli spermatozoi. Si lavava il campione con 1 ml di PBS, centrifugando x 2 volte a 5.000 rpm per 1 min eliminando ogni volta il surnatante. Si risospendeva il campione nel residuo di surnatante e si aggiungevano 250 µl di Cell Lysis Solution (Gentra Systems, Puregene Genomic DNA Purification Kit) e si mescolava con Vortex per 10 secondi e tramite pipettamento (x 10 volte).

Si aggiungevano quindi 1.5 µl di Proteinase K solution (20 mg/ml) (Gentra Puregene) e 12 µl di DTT (1M) al lisato cellulare e si mescolava capovolgendo l'eppendorf (x 25 volte).

Si incubava poi il campione a + 55 °C per 12 ore.

Il campione era poi risospeso e si aggiungevano 1.5 µl di RNase A solution (Gentra Puregene) e si mescolava capovolgendo la eppendorf (x 25).

Si incubava a + 37 °C per 15 min.

Si aggiungevano 100 µl di Proteine Precipitation Solution (Gentra Systems, Puregene Genomic DNA Purification Kit) mantenuto a +4 °C e si mescolava con Vortex (10 sec) e si poneva il campione in ghiaccio per 5 minuti.

Si centrifugava il campione (13.000 g per 3 min) due volte affinché si formasse un pellet ben compatto.

Si travasava quindi il surnatante in una eppendorf da 1.5 ml contenente 300 µl di isopropanolo puro al 100 % e si mescolava delicatamente invertendo la provetta (x 50 volte) e si incubava per 5 minuti a temperatura ambiente.

Si centrifugava a 13.000 g per 5 min e si eliminava l'isopropanolo asciugando la provetta capovolgendola rapidamente su carta assorbente.

Si aggiungevano 300 µl di etanolo al 70% e si mescolava capovolgendo la provetta (x10 volte), si centrifugava il campione (13.000 g per 1 min) e si eliminava l'etanolo surnatante. Si procedeva quindi ad una rapida asciugatura della provetta capovolgendola velocemente su carta assorbente e si lasciava asciugare all'aria per 10 min.

Si aggiungevano quindi 50 µl di ddH₂O sterile, si mescolava e si incubava a 65 °C per 1 ora o a temperatura ambiente x 12 ore.

Amplificazione del DNA mitocondriale: dopo aver mescolato il campione, si misurava con Nanodrop la concentrazione di DNA svolgendo almeno 3 letture per campione. Una volta calcolata la concentrazione di DNA in ogni campione si trasferivano 300 ng di DNA in una provetta PCR da 0.2 ml con il master mix così composto:

Buffer (10 x NH₄ Reaction Buffer BIOLINE)

MgCl₂ (50 mM Stock solution BIOLINE)

dNTPs mix (diluito a 100 mM 50:50 BIOLINE)

PRIMER (Sigma Genosys, The Woodlands, TX) per l'amplificazione del DNA mitocondriale:

forward 5'- CAGGGCGGCTAGAATGAGCAGA, nucleotides 11 102 to 11 122

reverse 5' – GGGTTGGGATTAGGGTTGCTTC, nucleotides – 11 873 to -11 895

BIOTaq DNA polymerase.

Si aggiungeva ad ogni provetta PCR ddH₂O ad arrivare ad un volume di 50 µl.

Si effettuava quindi la PCR con i seguenti parametri:

2 min a 94 °C

35 cicli di PCR così composti:

melting: 30'' a 94 °C,

annealing: 1' a 55 °C,

extension: 1' a 72 °C.

L'ultimo ciclo è seguito da 7' a 72 °C, dopodiché il campione era mantenuto a +8 °C.

Purificazione del DNA mitocondriale: una volta ottenuto il prodotto della PCR si effettuava l'elettroforesi ponendo in una nuova provetta PCR 0.2, 20 µl di prodotto con 6 µl di loading buffer e si poneva in un pozzetto nel gel di agarosio al 2%. Si effettuava quindi l'elettroforesi del campione per circa 1 ora ad un voltaggio di 70-80 V, 200 mA. Un pozzetto del gel era riempito con 6 µl di DNA ladder 100 bp (BioLabs New England).

Effettuata la corsa dei campioni sul gel, si procedeva alla purificazione della banda dell'elettroforesi con il DNA mitocondriale amplificato. Ponendo il gel sotto la luce ultravioletta si individuava la banda con il prodotto della PCR, si tagliava con un bisturi e si poneva in una eppendorf pulita. Il gel era pesato e vi si aggiungevano tanti microlitri di BUFFER QG (QIAquick gel Extracion Kit, QUIAGEN) quanto tre volte il peso del gel in milligrammi.

Si incubava quindi la provetta per 10 min a 55 °C, mescolando con Vortex ogni 2-3 min per facilitare lo scioglimento del gel.

Si aggiungevano poi tanti microlitri di isopropanolo quanti milligrammi di gel e si mescolava la provetta capovolgendola (x10 volte)

Dal campione si prelevavano 800 µl e si ponevano nella provetta con filtro fornite dal kit (QIAquick gel Extraction Kit, Quiagen) e si centrifugava per 1 min a 13000 rpm. Eliminato il filtrato e riponendo il filtro sulla provetta si aggiungeva il restante volume di campione e si effettuava una nuova centrifugata allo stesso modo e si eliminava il filtrato.

Si aggiungevano 700 µl di BUFFER PE (QIAquick gel extracion Kit, QUIAGEN) e si centrifugava allo stesso modo per 2 volte eliminando il filtrato.

A questo punto si spostava il filtro sul quale era rimasto intrappolato il DNA su una eppendorf pulita e si aggiungevano 50 µl di ddH₂O ben nel mezzo del filtro. Si lasciava incubare per 2 minuti, e si centrifugava allo stesso modo.

La concentrazione di DNA, sceso nella provetta assieme alla ddH₂O, era misurata con Nanodrop.

Elettroforosi: per i nostri campioni, in cui la concentrazione di DNA era circa 20 ng/ µl, si utilizzavano i seguenti volumi:

12.5 µl di DNA purificato in acqua ddH₂O

1 µl di enzima HAE III (R0108T, BioLabs New England)

1.5 µl di Buffer NE BUFFER 4 (B7004S, BioLabs, New England).

incubazione a 37 °C per 1 ora

Ad ogni campione si aggiungevano 6 µl di loading buffer e si poneva nei pozzetti di un gel di agarosio all'1.5 %.

In un pozzetto si metteva il DNA ladder 100 bp. Si effettuava l'elettroforesi per un'ora a 70-80 V, 200 mA.

Risultati

Fase sperimentale 1 - Classificazione dei riproduttori in funzione della qualità del seme

Le medie generali, il valore minimo e massimo ed il range di variazione dei parametri qualitativi misurati nel materiale seminale di tutti i galli utilizzati sono riportati in tabella 1. L'esame dei risultati ottenuti ha permesso di individuare i seguenti criteri di classificazione degli individui:

- a) valori di motilità soggettiva superiori al 70% erano considerati buoni, dal 70 al 55% erano considerati intermedi e inferiori al 55% insoddisfacenti;
- b) valori di danno cellulare inferiore al 7% era considerato buono, dal 7 al 10% intermedio e superiore al 10% insoddisfacente;
- c) valori di motilità oggettiva (metodo Accudenz) superiori a 0.74 erano considerati buoni, da 0.74 a 0.54 intermedi e inferiori a 0.54 insoddisfacenti.

| | media | DS | CV | min | max | mediana | range |
|---------------------------------------|--------------|-----------|-----------|------------|------------|----------------|--------------|
| Volume (µl) | 383 | 170.95 | 44.56 | 90 | 780 | 350 | 690 |
| Concentr. (x10⁹/ml) | 2.81 | 0.73 | 25.77 | 1.2 | 4.18 | 2.72 | 2.98 |
| Motilità ogg. (DO) | 0.65 | 0.34 | 52.84 | 0.07 | 1.4 | 0.61 | 1.33 |
| Spz danneggiati (%) | 8.38 | 7.49 | 89.47 | 0.43 | 31.31 | 5.53 | 30.89 |
| Motilità sogg. % | 67.54 | 8.81 | 13.05 | 45 | 82.5 | 70 | 37.5 |

Tabella 1 Parametri di statistica descrittiva dei parametri qualitativi di valutazione del seme misurati nei 30 galli sottoposti a classificazione.

I galli sono stati assegnati a 3 classi differenti: 1 = migliore, 2 = peggiore, 3 = intermedia.

Le classi migliore e peggiore comprendevano entrambe 8 galli riproduttori, mentre quella intermedia raggruppava tutti i soggetti rimanenti. Tutti gli eiaculati, indipendentemente

dalla classe di appartenenza, avevano un volume medio di 400 μ l e una concentrazione media di 2.8×10^9 spz/ml. La qualità del seme nelle 2 classi estreme è riportata in tabella 2. La differenza tra le medie di tutti i parametri qualitativi misurati nelle due classi è risultata altamente significativa ($P < 0.0001$).

| Classe | Motilità sogg (%) | Motilità oggettiva (DO) | Spz. Danneggiati (%) |
|-----------------|---------------------|-------------------------|----------------------|
| migliore | 73.125 \pm 1.356a | 0.848 \pm 0.057a | 3.617 \pm 1.069a |
| peggiore | 60.87 \pm 1.385b | 0.415 \pm 0.058b | 16.184 \pm 1.092b |

Tabella 2 Qualità del seme (media \pm DS) dei galli appartenenti alla classe migliore e peggiore (a, b valori differenti indicano una differenza significativa fra le classi).

Fase sperimentale 2 - Valutazione del danno cellulare dopo crioconservazione in materiale seminale di alta e bassa qualità.

Parametri qualitativi tradizionali

I valori medi di motilità e vitalità misurati nel materiale seminale fresco (T0) e crioconservato (T100) dei galli appartenenti alla classe migliore e peggiore sono riportati in tabella 3. In questa fase sperimentale, la qualità del materiale seminale nella classe migliore risultava superiore a quella del materiale seminale di classe peggiore sia al tempo 0 sia dopo congelamento/scongelo, tuttavia i valori medi di motilità e vitalità dei due gruppi non presentavano differenze significative. La differenza di vitalità misurata fra le due classi aumenta dopo crioconservazione e, di conseguenza, il recovery rate di cellule vive è risultato superiore nella classe migliore (61%) in confronto a quello della classe peggiore (52%), tuttavia l'elevata variabilità dei risultati non ha evidenziato una differenza significativa fra i due gruppi. La misurazione della motilità con procedura Accudenz nei campioni di seme crioconservato ha fornito risultati variabili e le letture di DO erano prossime allo zero, confermando la ridotta sensibilità della procedura in campioni con scarsa motilità, come già evidenziato nel protocollo sperimentale 2. Considerando i valori misurati

in questa condizione non attendibili, non si è potuto calcolare il recovery rate di questo parametro.

| Classe | T0 | | T100 | | RECOVERY vitalità (%) |
|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------------------|
| | Motilità (DO) | Vitalità (%) | Motilità (DO) | Vitalità (%) | |
| migliore | 0.521±0.199 | 76.6±12.3 | - | 45.6±3.31 | 60.9±7.82 |
| peggiore | 0.196±0.127 | 71.3±14.9 | - | 35.5±3.54 | 52.6± 17.6 |

Tabella 3 - Motilità e vitalità (medie ± DS) misurate prima (T0) e dopo crioconservazione (T100) nel seme di galli appartenenti alla classe migliore e peggiore.

Integrità del DNA nucleare

Le medie dei parametri relativi alla procedura COMET misurati nei campioni di seme di classe 1 e 2 prima e dopo crioconservazione sono riportati in Tabella 4. La distribuzione delle cellule con diverso grado di danno nucleare al DNA osservata nei due gruppi sperimentali è riportata in tabella 5.

| | tempo | % Tail DNA | Tail lenght (pixel) | Comet lenght (pixel) | Olive tail moment | % cellule DNA integro | % cellule DNA dann |
|-----------------|-------|---------------|------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Migliore | 0 | 24.1±4.1 | 68.4±11.2 | 161.3±0.6 | 14.2±3.8 | 93.6±3 | 6.5±3 |
| | 100 | 27.1±4.7 | 79.4±24.3 | 175.0±24.3 | 16.9±5 | 72.6±15 | 27.4±15 |
| Peggiore | 0 | 27.9±15.2 | 62.0±16.9 | 146.6±3.3 | 9.2± 2.6 | 96.1±2.8 | 3.9±2.8 |
| | 100 | 23.9±3 | 84.5±10.1 | 187.9±9.4 | 16.1±3.4 | 69.5±2.2 | 30.5±2.2 |

Tabella4 Parametri (medie ± DS) relativi all'analisi della frammentazione del DNA valutati tramite metodo COMET sul seme di galli di classe migliore e peggiore prima (T0) e dopo (T100) crioconservazione.

| | tempo | % Classe 1 | % Classe 2 | % Classe 3 | % Classe 4 | % Classe 5 |
|-----------------|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Migliore | 0 | 91.8±4 | 5.6±4.4 | 2.0±1 | 0.5±0.4 | 0±0 |
| | 100 | 72.5±14.9 | 16.5±9.1 | 9.4±5.5 | 1.4±1 | 0.2±0.2 |
| Peggior | 0 | 96.3±2.7 | 3.2±3.1 | 0.2±0 | 0±0 | 0.2±0.3 |
| | 100 | 68.5±9 | 21.9±9.9 | 8.9±0.5 | 0.7±0.5 | 0±0 |

Tabella 5. Parametri (media e deviazione standard) relative alla distribuzione delle cellule con diverso grado di danno al DNA nucleare.

Le medie dei parametri COMET misurate nei campioni di seme di alta e bassa qualità non hanno presentato differenze significative al momento del prelievo e neppure dopo congelamento/scongelo (Tabella 4). Anche la distribuzione di spermatozoi nelle diverse classi di danneggiamento cellulare identificate in base alla quantità di DNA nella coda della cometa non ha presentato differenze significative tra le due classi sperimentali (Tabella 5).

In generale, la percentuale di gameti con DNA integro è molto elevata nel seme fresco, 93-96%, e si riduce al 70-73% dopo crioconservazione. La percentuale di DNA nella coda misurata nelle cellule danneggiate del seme fresco e conservato è risultata molto simile (Tabella 4). La classe di danno al DNA in cui si è osservata la maggiore frequenza di cellule è risultata la classe 2, corrispondente al 10-25% di DNA nella coda, in entrambe i trattamenti sia prima sia dopo crioconservazione (Tabella 5).

Funzionalità mitocondriale

L'utilizzo del colorante JC-1 in letteratura è descritto solo sul seme di mammiferi e, quindi, è stato sperimentato per la prima volta sul seme aviario. Il principio della procedura si è dimostrato valido anche sugli spermatozoi di gallo che hanno presentato la prevista

colorazione fluorescente dovuta alla marcatura con colorante JC-1. Al microscopio risulta evidente la presenza di spermatozoi morti con testa rossa (EO1), di spermatozoi vivi con basso potenziale di membrana mitocondriale con testa verde (SYBR 14) e di spermatozoi vivi con alto potenziale di membrana mitocondriale con testa verde e tratto intermedio arancio (JC-1).

La frequenza delle tre diverse tipologie cellulari osservate nel seme scongelato sono riportate in Figura 1. Nei campioni di classe 1 si è osservata una maggiore percentuale di spermatozoi vivi totali e, fra questi, una maggiore percentuale di spermatozoi con elevata funzione mitocondriale (alto MMP). Tuttavia, non si sono osservate differenze significative fra le medie delle due classi sperimentali. Questo risultato concorda con i valori di vitalità e motilità cellulare misurati negli stessi campioni dopo congelamento/scongelamento. In generale, l'elevata variabilità delle misurazioni effettuate rende i dati delle due classi in parte sovrapponibili e, di conseguenza, non è possibile evidenziare differenze significative. Il seme di gallo congelato/scongelato, indipendentemente dal gruppo di appartenenza, risulta avere mediamente il 14.27 % di spermatozoi con MMP elevato.

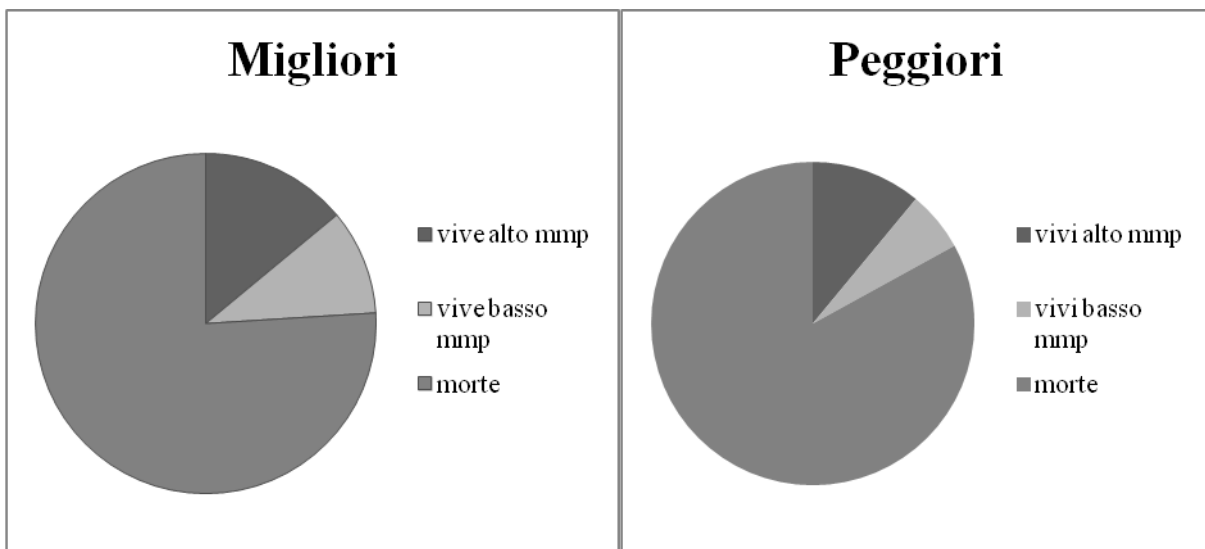


Figura 1 Percentuali di cellule vive con alto potenziale di membrana mitocondriale (MMP), vive con basso MMP e cellule morte nelle due classi di seme.

Nonostante si siano ottenuti dei risultati in linea con quelli riportati in letteratura, la metodica utilizzata richiede una messa a punto più ampia e specifica per il seme dei volatili. Infatti, la particolare morfologia degli spermatozoi di gallo si è dimostrata difficilmente adattabile alla procedura JC-1 così come riportata in letteratura e idonea ai gameti di mammifero. In particolare, le ridotte dimensioni del tratto intermedio negli spermatozoi di gallo non permettevano la marcatura di una superficie di membrana estesa, responsabile di una evidente variazione di fluorescenza in funzione dello stato di membrana del mitocondrio, e valutabile soggettivamente in modo attendibile al microscopio a fluorescenza. Numerosi sono i problemi emersi, in particolare quelli relativi ai coloranti da associare al JC-1, alle modalità di incubazione ed alle modalità di lettura dei dati. La lettura dei dati risulta probabilmente lo scoglio più grande da superare, in quanto la metodica fino ad ora utilizzata, anche sui mammiferi, prevede la lettura al microscopio, quindi soggettiva, di colorazioni molto sensibili alla luce del microscopio. In particolare, oltre al SYBR-14 è proprio il JC-1 che, sottoposto alla luce, vira rapidamente da rosso-arancio a verde per poi spegnersi sfalsando completamente i risultati. A questo problema si è cercato di ovviare scattando e archiviando rapide e numerose immagini ad alta definizione del campione, analizzandole poi con precisione in seguito. Al momento attuale pertanto la metodica risulta inapplicabile come metodo di analisi di routine del seme e si ritiene necessario lo studio di una procedura standardizzata specifica per il seme dei volatili.

Ricerca dello SNP 11177 nel DNA mitocondriale

La ricerca dello SNP 11177 non ha dato esito positivo su nessun campione. Non si è evidenziata infatti nessuna banda elettroforetica in corrispondenza delle dimensioni dello SNP 11177, previsto tra le 200 e le 300 paia di basi (Figura 2).

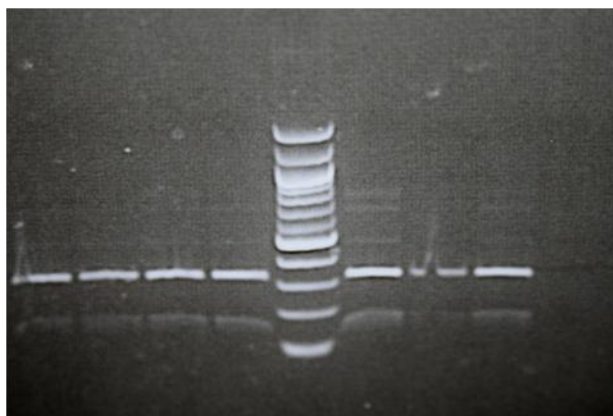


Figura 2 Fotografia del gel con assenza di banda elettroforetica tra 200 e 300 bp.

Discussione e conclusioni

Il metodo ACCUDENZ al 6% utilizzato per la valutazione della motilità si è dimostrato altamente sensibile per la classificazione qualitativa dei campioni di seme fresco, tanto da essere utilizzato come discriminante; ma, al contrario, non è stato sufficientemente sensibile quando utilizzato sui campioni di seme congelato/ scongelato, caratterizzati da una motilità molto inferiore. Alcune difficoltà nell'utilizzo della metodica ACCUDENZ su seme scongelato erano state già considerate in letteratura (Blesbois et al., 2008).

Le differenze di vitalità tra eiaculati di migliore e di peggiore qualità si sono accentuate dopo la procedura di congelamento/scongelamento, indicando la tendenza ad un maggior rischio di danno cellulare nei gameti di qualità iniziale inferiore.

La metodica COMET non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i campioni di Classe migliore e peggiore al tempo 0, e la percentuale di gameti con DNA frammentato è risultata molto limitata, 4-6%, in tutti i campioni di seme fresco. La procedura di crioconservazione è causa di danneggiamento al DNA nucleare e le cellule con DNA frammentato aumentano al 27-30%. Anche tra i campioni scongelati non si evidenziano differenze significative tra le due classi sperimentali. Tuttavia, le due classi sperimentali presentano un rapporto tra cellule con DNA danneggiato sul seme fresco e sul seme scongelato differente: la Classe migliore riporta un incremento di circa 4 volte mentre la Classe peggiore di circa 8 volte.

La misurazione della funzionalità mitocondriale è stata effettuata con successo per la prima volta sui gameti maschili di gallo. La particolare morfologia degli spermatozoi aviari suggerisce tuttavia la necessità di introdurre delle modifiche alla procedura per renderla più facilmente applicabile a queste specie.

Non è possibile fare un paragone tra danno mitocondriale tra seme fresco e crioconservato in quanto non era prevista l'analisi del potenziale mitocondriale sul seme fresco. I dati raccolti sullo scongelato non hanno permesso di evidenziare differenze tra le due classi di qualità, che presentano risultati pressoché sovrapponibili a causa della elevata variabilità dei risultati.

In generale, i risultati ottenuti indicano che il seme subisce un danneggiamento costante in seguito alla procedura di congelamento/ scongelamento indipendente dalla qualità iniziale del campione. Questa perdita è presente ed è di eguale entità sia che si congeli seme di buona qualità che di cattiva qualità. La qualità del seme di partenza non sembra pertanto avere un ruolo chiave nel successo della procedura, per cui partendo da un seme migliore si otterrà uno scongelato migliore. Tuttavia, si ritiene opportuno evidenziare che le misurazioni effettuate hanno presentato una elevata variabilità, tale da rendere non significative eventuali differenze osservate tra le diverse classi di materiale seminale. Risulta indispensabile quindi effettuare nuove indagini a riguardo, utilizzando un numero più elevato di campioni, per confermare i presenti risultati.

Il tentativo di trovare un'origine genetica nella diversità tra eiaculati, ricercando lo SNP 11177, unico citato in letteratura nel settore avicolo, non ha prodotto effetti positivi. Il mancato riscontro dello SNP 11177 può avere differenti significati: la sua presenza è vincolata alla linea in cui è stato effettuato lo studio e quindi nel ceppo da noi utilizzato non è presente; oppure le differenze di qualità dei nostri riproduttori non sono correlate alla presenza della sequenza genetica studiata.

Volendo proseguire per questa strada sicuramente interessante e promettente, bisognerebbe quindi ripartire dall'inizio ed evidenziare i geni che influenzano le caratteristiche spermatiche, disegnare dei primers per amplificare le zone desiderate e cercare le differenze tra le basi presenti in quel tratto di genoma.

Bibliografia

Ashizawa K. e Wishart G., 1987. Resolution of the sperm motility – stimulating principle of fowl seminal plasma into Ca^{2+} and an unidentified low molecular weight factor. *Journal of Reproduction and Fertility*, 8: 495-499.

Bakst, M.R. e Cecil, H.C., 1997 Sperm viability, in: Bakst, M.R. e Cecil, H.C. (Eds) *Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage, and Fertility Determination* 29-34 (Savoy Illinois, The Poultry Science Association, Inc.).

Bakst M.R., Cecil H.C., 1997. *Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage, and Fertility Determination*. Poultry Science Association, Savoy, IL.

Blanco J. M., Gee G., Wildt D. E., Donoghue A. M., 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biology of reproduction*, 63: 1164-1171.

Blanco J., Long J.A., Gee G., Donoghue A.M., Wildt D.E., 2008. Osmotic tolerance of avian spermatozoa: influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. *Cryobiology*, 56: 8-14.

Blesbois E. e Mauger I. 1987. Effects of ovalbumin on the motility and fertilizing ability of fowl spermatozoa stored for 24 h at 4°C. *British Poultry Science*, 28:483-492.

Blesbois E. e Mauger I.,1989. Zinc content of fowl seminal plasma and its effects on spermatozoa after storage at 4 °C. *British Poutry Science*, 39: 677-685.

Blesbois E. e de Reviere M., 1992. Effect of different fractions of seminal plasma on the fertilizing ability of fowl spermatozoa in vitro. *Journal Reproduction Fertillity*, 95: 263-268.

Blesbois E., Grasseau I., Blum J.C., 1993. Effect of vitamin E on fowl semen storage at 4 C. *Theriogenology*, 39: 771-779.

Blesbois E., Grasseau I., Hermier D., 1999. Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5 °C. *Theriogenology*, 52:325-34

Blesbois, E. e Labbe´C., 2003. Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. *Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe*. 55–66.D. Planchenault, ed. BRG, Paris, France.

Blesbois E., Seigneurin F., Grasseau I., Limouzin C., Besnard D.,Gourichon D., Coquerelle G., Rault P., Tixier-Boichard M., 2007. Semen Cryopreservation for Ex Situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poultry Science*, 86:555–564

Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F., 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129: 371-378.

Blesbois E., Grasseu I., Seigneurin F., Mignon-Grasteau S., Saint Jalme M., Mialon-Richard M.M., 2008. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology*, 69:252-261.

Brillard J.P. e Mc Daniel J., 1985. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poultry Science*, 64:155-158.

Brillard J.P. e de Reviers M., 1989. L'insemination artificielle chez la poule. *INRA Prod. Anim.* 2 (3): 197-203.

Brillard J. P., 1995. Artificial insemination: how many sperm? How often? Backst M.R., Wishart G.J. (eds), *Proceedings First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. Poultry Science Association, Savoy, Illinois, 176-183.

Brillard J.P., 2004. Natural mating in broiler breeders: present and future concerns. *World's Poultry Science Journal*, 60, December

Burrows W.H. e Quinn J.P., 1937. Artificial insemination of chicken and turkey. *US Dept Agric. 525 Poultry Science* 14: 251-254.

Cassinelli C., Zaniboni L., Mangiagalli G., Cerolini S., 2008. Chicken sperm cryopreservation by pellet method: effect of drop volume and thawing procedure. 6th Biannual Meeting Association Applied Animal Andrology, Budapest, July 12-13 2008, poster presentation, disponibile in CD.

Cecil H.C. e Bakst M.R., 1993. In vitro lipid peroxidation of turkey spermatozoa. *Poultry Science* 72:1370-1378.

Cerolini S., Pizzi F., Gliozzi T., Maldjian A., Zaniboni L., Parodi L., 2003. Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: a review. *World's Poultry Science Journal*, 59 (1) :65-75.

Cerolini S., 2005. Lipid composition of chicken semen and fertility. In De Vriese S., Christophe A.B. editors. *Male fertility and lipid metabolism*. AOCS Press; 2005. P. 86-95

Cerolini S., Zaniboni L, Maldjian A., Gliozzi T. , 2006. Effect of docosahexaenoic acid and a-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 66: 877–886.

Cerolini S., Zaniboni L., Mangiagalli M.G., Gliozzi T.M., 2007. Effect of glycine on cryopreservation of chicken spermatozoa. *Incubation and Fertility Research Group 2007 Meeting*, Edinburgh, *Avian and Poultry Biology Reviews*, 18(2): 65.

Cerolini S., Zaniboni L, Cassinelli C, Mangiagalli G, Marelli S. Guidobono Cavalchini L . 2009. Phenotypic characterization of the Italian chicken breed *Mericanel della Brianza*. *Italian Journal of Animal Science*, Proceeding of the ASPA 18th Congress, Palermo, June 9-12, p 809.

Chalah T., Seigneurin F., Blesbois E., Brillard j.P., 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39:185-191.

Christensen V.L., 1995. Diluents, dilution, and storage of poultry semen for six hours. In: Bakst, M.R., Wishart, G.J., (eds.), *Proc. First International Symposium on the artificial insemination of poultry*. Poultry Science Association, Savoy, IL, 90-106.

Curry M.R., Watson P.F., 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, 31:39-46.

Danchin-Burge C., and Hiemstra S. J., 2003. Cryopreservation of domestic animal species in France and Netherlands: Experience, similarities and differences. Pages 15–28 in Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe. D. Planchenault, ed. Online. <http://www.brg.prd.fr/brg/texte/Pdfs/SiaColloqueDocument.pdf>

Donoghue A.M. e Wishart G.J., 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction science*, 62: 213-232.

Douard V., Hermier D., Blesbois E., 2000. Changes in turkey semen lipids during in vitro storage. *Biology of Reproduction*, 63:1460-1466.

Douard V., Hermier D., Magistrini M, Blesbois E., 2003. Reproductive period affects lipid composition and quality of fresh and stored spermatozoa in turkeys. *Theriogenology*, 59:753-754.

Douard V., Blesbois E., Hermier D., Magistrini M., 2004. Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 61: 1-13.

Etches R., 1996 *Reproduction in poultry*. Cab international, Wallingford, Cambridge, UK. .

Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biological Chemistry*, 226: 497-509.

Froman, D.P. e McLean D.J., 1996. Objective measurement of sperm motility based upon sperm penetration of Accudenz ®. *Poultry Science*, 75: 776-784.

Froman D. P. e Feltmann A. J., 2000. Sperm mobility: phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by concentration of motile sperm and Straight Line Velocity, *Biology of Reproduction* 62, 303-309.

Froman D. P. and Kirby J. D., 2005. Sperm mobility: phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. *Biology of Reproduction*, 72:562-567.

Fujihara N. e Koga O., 1984. Prevention of the production of lipid peroxide in rooster spermatozo. *Animal Reproduction Science*, 7:385-390.

Fujihara N., Buckland R.B., 1987. The effect of different freezing rates on fertilizing ability of frozen-thawed chicken spermatozoa. *Japanese Journal Animal Reproduction*, 33:11-14.

Gee G.F., 1995. Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. In Proc. First Symp. Artif. Insem. Poult. M.R. Bakst and G.J. Wishart, ed. PSA, Savoy, IL., 262-280.

Giavarini I. 1982, Nuovo trattato di avicoltura, Edagricole.

Gliozzi T.M., Luzi F., Cerolini S., 2003 Assessment of sperm viability in boar, rabbit and rooster: a modification of the fluorometric ethidium bromide exclusion procedure. *Theriogenology*, 60/4: 635-645.

Gliozzi T.M., Zaniboni L., Cerolini S., 2011. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75:1613-1622.

Hafez E.S.E., 1984. *Biologia e tecnologia della riproduzione nelle specie animali di interesse zootecnico*. Ed. Grasso

Han X.F., Niu Z.Y., Liu F.Z., Yang C.S., 2005. Effects of Diluents, Cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen, *International Journal of Poultry Science*, 4: 197-201.

Henricks D., Kouba A., Lackey B., Boone W., Gray S., 1998. Identification of insulin-like growth factor I In bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biology of Reproduction*, 59: 330-7.

Kelso K.A., Cerolini S., Noble R.C., Sparks N.H., Speake B.K., 1996. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106(2):201-6.

[Kotłowska M.](#), [Dietrich G.](#), [Wojtczak M.](#), [Karol H.](#), [Ciereszko A.](#), 2007. Effects of liquid storage on amidase activity, DNA fragmentation and motility of turkey spermatozoa. [Theriogenology](#). Jan 15; 67(2):276-86. Epub 2006 Sep 11.

Iaffaldano N., 2000. Inseminazione artificiale nel tacchino” *Rivista di avicoltura* n. 3.

Lake P.E. e Stewart J.M., 1978. Artificial insemination in poultry. Bulletin 213 – Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK.

Iaffaldano N., Meluzzi A., 2003. Effect of dialysis on quality characteristics of turkey semen during liquid storage. *Theriogenology*, 60:421-7.

Lake P. E., 1960. Studies on the dilution and storage of fowl semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1: 30-35.

Lake P.E., 1968. Observation of freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen. 6th Cong Int Reprod Anim Insemin Artif. Paris, 2:1633-1635

Lake P.E., 1984. The male in reproduction. in Freeman BM (ed), *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Vol. 5, Academic Press Inc. London, 381-405.

Lake P.E., Ravie O., Macdam J., 1981. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application of breeding programmes. *British Poultry Science* , 22:71-77.

Lake P. e Ravie O., 1982. Effect on fertility of storing turkey semen for 24 hours at 10 degree C in fluids of different pH. *British Poultry Science*, 23:41-7.

Lake P.E. e Ravie O., 1984. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British poultry science*, 25:145-150.

Lake P.E., 1995. Historical perspective of artificial insemination technology. In Bakst, M.R., Wishart, G.J. (Eds), *Proc. Ist International Symposium on the Artificial Insemination in Poultry*. Poultry Science Association, Savoy, IL, pp. 1-20

Long J.A. e Kramer M., 2003. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *Poultry Science*, 82:1802-1807.

Long J.A. e Kulkarmi G., 2004. An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poultry Science*, 83:1594-1601.

Marelli S. P., Cassinelli C., Zaniboni L., Mangiagalli M. G., Cerolini S., 2009. Breeding performance in the Italian local breed *Mericanel della Brianza*. 6th European Poultry Genetic Symposium, Bedlewo near Poznan, Poland.

Marzoni M., 2008. Inseminazione artificiale. In: *Avicoltura e Coniglicoltura*. Editors Cerolini S., Marzoni M., Romboli I., Schiavone A., Zaniboni L, *Le Point Veterinaire Italie*, Milano: 125-138.

Zaniboni L. e Cerolini S., 2008. L'apparato riproduttore maschile. In: *Avicoltura e Coniglicoltura*. Editors Cerolini S., Marzoni M., Romboli I., Schiavone A., Zaniboni L, *Le Point Veterinaire Italie*, Milano: 93-105.

McLean R., Holt W.V., Zee P.Y., Lisle A., Johnston S.D., 2008. The effect of cryoprotectant on kangaroo sperm ultrastructure and mitochondrial function. *Cryobiology*, 57:297-303.

McRorie R.A. e Williams W.L., 1974. Biochemistry of mammalian fertilization. *Annual Reviews of Biochemistry*, 43, 777.

Mitchell R.L., Buckland R.B., Kennedy B.W., 1977. Heritability of fertility of frozen and fresh chicken semen and the relationship between the fertility of frozen and fresh semen. *Poultry Science*, 56:1168-1177.

Morton D.B., 1976. Lysosomal enzymes in mammalian spermatozoa. *In* *Lysosomes in biology and pathology*. Vol. 5. Dingle and R.T. Dean (eds) New York, American Elsevier Publishing Co., Inc., pp. 203-205.

Massip, A., Leibo S.P., Blesbois E., 2004. Cryobiology and the breeding of domestic animals. Pages 371–392 in *Life in the Frozen State*. E. Benson, B. Fuller, and N. Lane, ed. Taylor and Francis Group, London, UK

Mohan J., Saini M., Joshi P., 1995. Isolation of a spermatozoa motility inhibiting factor from chicken seminal plasma with antibacterial property. *Biochim. Biophys. Acta*, 1245:407-13.

Peña F.J., Saravia F., Johannisson A., Walgren M., Rodriguez-Martinez H., 2005. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *International Journal of andrology*, 28: 107-114.

Polge C., 1951. Functional survival of fowl sperm after freezing at -70 °C. *Nature*, 167:949-950.

Ravie O. e Lake P.E., 1985. The phospholipid-bound fatty acids of fowl and turkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 9:189-192.

Resseque W.D. e Hughes B.L., 1984. Phospholipid and Cholesterol profile from chicken seminal component during in vitro storage at 5 C. *Poultry Science*, 63:1138-1443.

Richardson M.E., Bodine A.B., Froman D.P., Thurston R.J., 1987. Turkey acrosin 1. Isolation. Purification and partial characterization. *Biology of Reproduction*, 38: 645-651.

Saint Jalme M., Lecoq R., Seigneurin F., Blesbois E. and Plouzeau E., 2003. Cryopreservation of semen from endangered pheasant: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*, 59: 875-888.

Sabbioni A. e Zanon A., 2001. Identificazione e salvaguardia genetica delle razze avicole Italiane. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, 21:117-134.

Seigneurin, F. e Blesbois E., 1995. Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology*, 43: 1351-1358.

Sexton T.J. 1977. Relationship between number of sperm inseminated and fertility of turkey hens at various stage of production. *Poultry Science*, 56: 1054-1056.

Sexton, T.J., 1979. Preservation of poultry semen. A review. In Beltsville symposium in agricultural research. 3. Animal Reproduction. Allanheld, Osmun and Co., Montclair, NJ, pp: 159-170.

Sexton, T.J., 1980. Recent advances in semen storage of fowl and turkey. In 9th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Vol. II, Roundtables, 527-533.

Sturkie P.D., 1976. *Avian Physiology*, Springer-Verlag, New York.

Taneja G.C. e Gowe R.S., 1961. Effect of varying doses of undiluted semen on fertility and hatchability in the domestic fowl. *Nature*, 191:828 – 829.

Thurston R.J. e Hess B.L., 1987. Ultrastructure of spermatozoa from domesticated birds: comparative study of turkey, chicken, and guinea fowl. *Scanning Microscope*, 1: 1829-1838.

Thurston R.J., Korn N., Froman D.P., Bodine A.B., 1993. Proteolytic enzymes in seminal plasma of domestic turkey (*Meleagris gallopavo*). *Biology of Reproduction*, 48:393-402.

Thurston R., Rogoff M., Scott T., Korn N., 1994. Perfluorichemical emulsions as turkey semen diluents: effects of varying aeration treatments and aqueous phase on fertilizing capacity of semen stored for twenty-four hours. *Poultry Science*, 73:724-32.

Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B., 1995. Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*, 36:805-811.

Tselutin K., Seigneurin F., Blesbois E., 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl sperm. *Poultry Science*, 78:586-590.

Van Wambeke F., 1967. The storage of fowl spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 13:571-575.

Verhoef E., Rijs A., 2006. *Enciclopedia dei polli*. White Star edizioni. Italia.

Wishart G.J., 1981. The effect of continuous aeration on the fertility of fowl and turkey semen stored above 0 C. *British Poultry Science*, 22: 445-450.

Wishart G.J., 1989. Physiological changes in fowl and turkey spermatozoa during in vitro storage. *British Poultry Science*, 30: 443-454.

Woelders H., Zuidberg C.A., Hiemstra S.J., 2006. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspectives. *Poultry Science*, 85:216-222.

Wolanski N.J., Renema R.A., Robinson F.E., Carney V.L., Fancher B.I., 2006. *Relationship Between Chick Conformation and Quality Measures with Early Growth Traits in Males of Eight Selected Pure or Commercial Broiler Breeder Strains. Poultry Science, 85:1490-1497.*

Zaniboni L., 2001. *Studio di componenti funzionali dell'apparato riproduttore e dei gameti maschili nelle piccole specie e possibilità di miglioramento con manipolazione alimentare. Tesi di dottorato di ricerca in Produzioni Animali, Università degli Studi di Milano.*

Zaniboni L. e Cerolini S. (2008) L'apparato riproduttore maschile. In: Avicoltura e Conigliicoltura. Editors Cerolini S., Marzoni M., Romboli I., Schiavone A., Zaniboni L, Le Point Veterinaire Italie, Milano: 93-105.

Zaniboni L., Rizzi R., Cerolini S., 2006. Combined effect of DHA and a-tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. *Theriogenology, 65:1813–1827.*

Zee Y.P., Holt W.V., Allen C.D., Nicolson V., Burridge M., Lisle A., Carrik F. N., Johnston S. D., 2007. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and heterogeneity, lipid raft stability and phosphatidylserine translocation in koala (*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development, 19: 850-860.*

Sitografia:

<http://www.ilpollaiodelre.com/pollit2.htm>

<http://www.agraria.org/polli/mericanelbrianza.htm>

<http://www.fiav.info/html/entratasito.html>

La biodiversità in avicoltura

http://lnx.wpsa.it/members/index.php?option=com_content&task=view&id=104&Itemid=5

5

www.fao.org/docrep/meeting/021/j8854e.pdf -

Ringraziamenti:

Grazie a Silvia, Luisa e Grazia e Teresa che mi hanno accolta, coinvolta e guidata nel mondo della ricerca;

a tutti gli amici del dipartimento V.S.A.: Michele, Luca, Marina, Stefania, Daniela, Manuela, Fausta, Alessandro, Roberta, Diego, Antonio, Andrea, Raffaella e Chiara, per le pause pranzo, per cui non c'è bisogno di aggiungere aggettivi ;-);

al Professor William V. Holt, della Zoological Society of London, e ai suoi collaboratori, Marta, Daphne e Rhiannon, per la disponibilità dimostrata durante l'esperienza londinese;

alla mia Famiglia: mamma, papà, Lorenzo e Caterina, senza i quali tutto sarebbe stato più difficile.