

LA CRIOCONSERVAZIONE DEL SEME COME STRATEGIA PER LA SALVAGUARDIA DELLA BIODIVERSITÀ: LA PRIMA CRIOBANCA IN EUROPA PER LA CONSERVAZIONE DELLA TROTA MEDITERRANEA NATIVA DEI FIUMI MOLISANI (LIFE NAT.SAL.MO PROJECT – REGIONE MOLISE - ITALY)

G. Rusco¹, M. Di Iorio¹, E. Antenucci¹, N. Iaffaldano¹

¹Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Università del Molise, Via F. De Sanctis 86100 Campobasso (CB), Italia

e-mail (Autore Corrispondente): nicolaia.unimol.it

Keywords: crioconservazione del seme, criobanche, tutela della biodiversità, trota Mediterranea

Le tecniche di crioconservazione unitamente allo stoccaggio del germoplasma in apposite criobanche rappresentano una preziosa strategia di conservazione *ex situ* finalizzata alla salvaguardia delle risorse genetiche animali di specie minacciate o a rischio di estinzione.

Attualmente, nell'ambito delle specie acquatiche la crioconservazione del seme risulta la tecnica più utilizzata, poiché, grazie alle ridotte dimensioni della cellula spermatica e alla maggiore resistenza della membrana alle basse temperature, gli spermatozoi sembrano rispondere meglio alle procedure di congelamento a differenza di quanto riportato per ovociti ed embrioni (Martinez-Pàramo et al., 2017). Tuttavia, la messa a punto di protocolli standardizzati di crioconservazione del seme specie-specifici rappresenta ancora oggi una delle principali sfide, che spinge numerosi ricercatori di tutto il mondo a lavorare per l'ottenimento di procedure efficaci che portino al raggiungimento di risultati soddisfacenti e ripetibili.

Il nostro progetto Life Nat.Sal.Mo, recentemente finanziato dall'UE, si colloca perfettamente nella cornice appena descritta, infatti, l'azione mirata all'identificazione di un protocollo efficace di crioconservazione del seme della trota Mediterranea ha rappresentato un importante *milestone*. Questo progetto è nato allo scopo di assicurare il recupero e la conservazione delle popolazioni di trota Mediterranea (*S. macrostigma*) native dei fiumi Molisani (Biferno e Volturno). Di fatto, la specie oggetto di studio è un salmonide endemico dell'area mediterranea, presente nell'Allegato II della Direttiva Habitat, classificato come vulnerabile in Europa e in pericolo di estinzione in Italia sotto il taxon *S. cettii*.

Durante le prime due stagioni riproduttive (2019-20, 2020/21), tra lo svolgimento delle diverse attività del progetto, quelle mirate all'avvio della prima criobanca del seme in Europa di questa importante trota nativa a rischio di estinzione hanno portato all'ottenimento di risultati considerevoli, con il congelamento e lo stoccaggio di circa 1600 dosi di seme provenienti da 95 donatori geneticamente puri.

Presupposto fondamentale per l'ottenimento di questi importanti risultati è stato appunto ottenere un protocollo di crioconservazione efficace al fine di stoccare dosi di seme congelate di buona qualità per il raggiungimento di alti tassi di fecondazione. A tal riguardo, diverse sperimentazioni sono state condotte dal nostro gruppo di ricerca (Iaffaldano et al., 2015; Di Iorio et al., 2019; Rusco et al., 2019, 2020), le quali hanno portato recentemente all'individuazione di un eccellente protocollo di congelamento, che ci ha consentito di registrare *in vitro* una motilità post congelamento > 50% ed un tasso di embrionatura *in vivo* > 70%. Questa semplice procedura prevede una diluizione iniziale del seme utilizzando una *stock solution* costituita da 0.35 M di glucosio e 17.8% di metanolo, al fine di raggiungere una concentrazione finale di 3×10^9 spermatozoi/ml, 0.15 M di glucosio e 7.5% di metanolo. Il seme così diluito è caricato in *straws* da 0.25 ml, successivamente equilibrate per 15 minuti mediante raffreddamento su una griglia a 3 cm dalla superficie del ghiaccio. Le dosi di seme sono poi congelate, inizialmente mediante esposizione sui vapori d'azoto liquido (LN₂) per 5 minuti,



utilizzando una griglia flottante alta 3 cm posta sul livello di LN₂, a cui segue la totale immersione delle stesse.

Lo stoccaggio nella criobanca di queste prime dosi di seme di trota Mediterranea (*S. macrostigma*), costituiscono una risorsa genetica preziosa nell'ambito del programma di conservazione *ex situ* del progetto, le cui attività proseguiranno anche nel prossimo anno. Inoltre, grazie all'ausilio delle tecniche di riproduzione artificiale, parte delle dosi di seme congelate in questi due anni, unitamente all'uso di appropriati schemi di fecondazione incrociata, sono state impiegate per fecondare oltre 100.000 uova provenienti da femmine native. Queste uova sono state inizialmente incubate presso appropriate strutture di incubazione sino allo stadio di embrionatura e successivamente posizionate in appositi nidi semi-artificiali, scavati nella ghiaia dei due bacini idrografici, per la schiusa, al fine di incrementare la variabilità genetica della prole ed ampliare così le dimensioni delle popolazioni native di *S. macrostigma* nell'area del progetto.

Ringraziamenti: questo lavoro è stato finanziato grazie al progetto LIFE Nat.Sal.Mo. (LIFE17 NAT/IT/000547)