

Programma di Sviluppo Rurale della Regione Calabria 2007-2013

ASSE 2

Miglioramento dell'ambiente e dello spazio rurale

Misura 214

Azione 6

Progetti comprensoriali per la salvaguardia del patrimonio genetico regionale

PROGETTO COMPrensORIALE PER LA SALVAGUARDIA DEL BOVINO PODOLICO DI CEPPO CALABRESE



PROGETTO D'INTERVENTO



PROVINCIA DI COSENZA



UNIVERSITA DEGLI STUDI FEDERICO II
DISCIZIA



ASSOCIAZIONE
REGIONALE
ALLEVATORI
CALABRIA



SLOW FOOD



OBIETTIVI

Lo scopo principale di questo progetto è quello di mettere in atto opportune strategie per la salvaguardia del bovina podolica di ceppo calabrese. Le strategie per la salvaguardia di specie o razze animali a rischio di estinzione e, quindi, per la tutela della biodiversità animale, si distinguono sostanzialmente in due tipologie: la conservazione *in situ* ed *ex situ*. Nella prima la razza resta allevata all'interno della specifica filiera zootecnica, nel quadro del suo contesto storico, culturale e paesaggistico. Ci si prefigge di individuare in termini oggettivi le caratteristiche di peculiarità del tipo genetico autoctono (TGA), del sistema di allevamento e qualificare e migliorare le produzioni tipiche. La conservazione *in situ* prevede, inoltre, di tesaurizzare il materiale genetico negli ecosistemi e negli habitat naturali e il mantenimento e recupero delle popolazioni vitali di specie o di razze animali nel loro ambiente naturale e, nel caso di razze animali domestiche, nell'ambiente domestico dove tali razze hanno sviluppato le proprie caratteristiche distintive. La strategia *ex situ*, invece, si identifica nella conservazione di materiale genetico per uso agricolo al di fuori dell'habitat naturale. Le strategie di conservazione *in situ* ed *ex situ* sono attualmente divenute fondamentali per la preservazione delle specie e delle razze a particolare rischio di estinzione, grazie all'utilizzo delle biotecnologie riproduttive avanzate. Tali strategie di conservazione prevedono la crioconservazione di materiale genetico sotto forma di gameti, embrioni ma anche di campioni di



cellule somatiche e tessuti. Ne consegue che la realizzazione di banche di risorse genomiche (Genome Resource Banking) è di fondamentale importanza per la conservazione del patrimonio genetico e, quindi, per la sua perpetuazione, rappresentando uno step propedeutico all'applicazione di tecnologie riproduttive innovative, quali l' inseminazione strumentale, la produzione embrionale in vitro, il trasferimento embrionale e il sessaggio sia del seme sia degli embrioni. Queste moderne tecniche di riproduzione assistita consentono di salvare dall'estinzione le specie a rischio, incrementando in maniera sensibile il numero di embrioni e, quindi di potenziali figli ottenibili da donatori e, nel contempo, assicurando anche la variabilità genetica, mediante la selezione dei genitori nell'ambito di fecondazioni programmate. Una problematica rilevante è, infatti, la perdita della biodiversità, causata dalla elevata incidenza di consanguineità che viene a crearsi all'interno di popolazioni animali ristrette e relegate in aree relativamente circoscritte. L'obiettivo del nostro progetto è pertanto, duplice: da un lato, si tenta di ovviare al fenomeno di erosione delle risorse genetiche animali; dall'altro, di definire un'azione finalizzata all'incremento che come illustrato nella relazione tecnica è considerata a rischio di estinzione. I bovini di razza podolica sono da considerare un vero e proprio bene 'culturale', cioè un patrimonio connaturato e connesso all'antropizzazione dell'ambiente peculiare di quella determinata 'nicchia ecologica'. La riduzione o l'assenza di variabilità genetica comporta una diminuzione (o scomparsa, nei casi estremi) della



capacità omeostatica o di autogoverno del sistema biologico, con il rischio di perdere informazioni che non sono più recuperabili. La diversità biologica deve essere considerata anche ai fini della produzione di 'beni materiali' o 'servizi', quali, ad esempio, i servizi di gestione e presidio ambientale di aree geografiche altrimenti destinate a essere abbandonate, con tutti gli effetti conseguenti. Pertanto, le risorse genetiche autoctone danno un contributo al 'terziario verde' di natura non commerciale. La convinzione dell'importanza delle criticità e delle considerazioni esposte, ci ha spinto alla stesura di un progetto che si propone i seguenti obiettivi:

- Definizione di idonee strategie di salvaguardia della popolazione bovina Podolica di ceppo calabrese.
- Valutazione morfologica di soggetti giovani allevati in aziende rappresentative
- Registrazione di tutti i parametri produttivi, riproduttivi e della qualità del latte nelle femmine in lattazione nelle aziende coinvolte
- Monitoraggio del livello di consanguineità all'interno della popolazione
- Scelta dei riproduttori maschi/giovani tori in funzione delle produzioni e della parentela, per minimizzare la consanguineità senza compromettere le produzioni. In particolare, ci si prefigge di valutare la fertilità dei soggetti



scelti sulla base dei criteri sovraesposti, mediante monitoraggio dei tassi di concepimento dopo fecondazione artificiale (FA) e fertility test

- Pianificazione degli accoppiamenti e assistenza agli allevatori per la scelta del toro
- Valutazione dell'effetto stagionale sulle performance produttive e riproduttive
- Utilizzo di tecnologie riproduttive avanzate per incrementare il numero di capi presenti attualmente sul territorio.
- Incremento del potenziale riproduttivo delle femmine mediante programmi di superovulazione ed embryo transfer (MOET).
- Incremento del potenziale riproduttivo delle femmine mediante prelievo in vivo di oociti (ovum pick-up) e produzione embrionale in vitro.
- Trasferimento degli embrioni prodotti in riceventi di altre razze presenti sul territorio che porteranno a termine le gravidanze.
- Creazione di una banca dati genetica, mediante la crioconservazione di parte degli embrioni, gameti e gonadi
- Valorizzazione dei prodotti tipici della razza specialmente per quanto attiene la carne.



Il perseguimento e la realizzazione di questi obiettivi ci consentirà di ottenere i seguenti risultati:

- Tesaurizzare la genetica del bovino di razza Podolica di ceppo calabrese.
- Migliorare l'efficienza riproduttiva mediante utilizzo di biotecnologie.
- Ridurre la consanguineità mediante fecondazioni programmate.
- Ottimizzare il potenziale riproduttivo dei tori e valutare la fertilità dei riproduttori.
- Incrementare il numero di embrioni e, quindi di potenziali figli ottenibili da donatori a rischio.
- Utilizzare femmine riceventi di altre razze come madri surrogate per portare a termine le gravidanze.
- Incrementare il numero di capi presenti in un arco di tempo relativamente contenuto.
- Creare banche di materiale genetico di razza bovino Podolico di ceppo calabrese.



DESCRIZIONE DEL PROGETTO

Per la realizzazione del progetto si prevede un arco temporale di 36 mesi e sarà articolato in 4 periodi.

1° periodo (scelta riproduttori)

Nei primi 6 mesi del progetto si individueranno le aziende da coinvolgere e si effettuerà la valutazione morfologica dei soggetti giovani in esse allevati. Inoltre si valuterà il livello di consanguineità all'interno della popolazione, sulla base dei dati disponibili presso il libro genealogico (LG). Verrà effettuata quindi la scelta di 15 bovine selezionate sulla base delle condizioni igienico-sanitarie, della fertilità e delle produzioni medie da utilizzare successivamente come donatrici di embrioni. Inoltre, saranno scelti i riproduttori maschi/giovani tori in funzione delle produzioni e della parentela, per minimizzare la consanguineità senza compromettere le produzioni. Quindi ci si prefigge di valutare la fertilità dei soggetti scelti sulla base dei criteri sovraesposti, mediante la valutazione dei tassi di concepimento dopo fecondazione artificiale (FA) e fertility test (1 anno).



2° periodo (MOET e sincronizzazione estri)

Nella seconda fase del progetto, della durata di 12 mesi, sulle 15 vacche preliminarmente scelte verrà utilizzata la tecnica dell'ovulazione multipla e trasferimento embrionale (MOET) che consiste nell' induzione di ovulazioni multiple in soggetti normalmente monovulanti, mediante somministrazione esogena di gonadotropine, e nel successivo recupero degli embrioni sviluppatosi in seguito ad accoppiamento/IS, mediante flushing uterino.

La produzione di embrioni mediante MOET è un metodo relativamente economico per l'ottenimento di un buon numero di embrioni con bassi costi. Gli animali verranno sincronizzati con una doppia iniezione di PGF2a a 12 giorni di distanza. Sessanta ore dopo l'ultima iniezione di PGF2a verranno sottoposti ad un esame rettale del tratto genitale attraverso l'utilizzo di una sonda ad ultrasuoni per valutare lo stato di estro: gli animali con un utero tonico ed un follicolo maggiore di 12 mm, con scolo vaginale saranno considerati in estro. Alle bovine che risponderanno al trattamento di sincronizzazione sarà inserito un dispositivo intravaginale (giorno 0) rilasciante progesterone (PRID) mantenuto in situ fino al decimo giorno. Il giorno 7, il giorno prima di iniziare il trattamento di superovulazione, tutti gli animali verranno sottoposti ad un esame ecografico per verificare la presenza di un corpo luteo sull'ovaio. A partire dal giorno 8 e per i 4 giorni successivi le bovine riceveranno una miscela di 500 UI di



FSH e LH due volte al giorno. Il giorno 10 (72 e 84 ore dopo l'inizio del trattamento con le gonadotropine) a tutte le bovine trattate verrà somministrata la PGF2a due volte al giorno per indurre la luteolisi. Dopo 60 e 80 ore l'ultima iniezione di PGF2a tutti gli animali verranno sottoposti ad ecografia e verrà registrato il numero dei follicoli con diametro maggiore di 12 mm. Dopo la seconda iniezione di prostaglandine verrà fatta l'inseminazione strumentale (IS) utilizzando seme congelato/scongelato di tori di comprovata fertilità scelti preliminarmente in modo da aumentare la variabilità genetica. Sei giorni dopo la prima IS tutti gli animali verranno sottoposti ad ecografia per valutare il numero di corpi lutei sulle ovaie e a flushing uterino. La maggior parte degli embrioni recuperati (80%) verrà trasferito, nel periodo 4, in bovine riceventi preferenzialmente di altre razze presenti nello stesso habitat e il restante 20% verrà crioconservato e stanziato nella banca dati genetica (Gene Resource Banking). Nel corso dell'anno il trattamento verrà ripetuto per 4 volte, per rispettare un periodo di riposo tra i trattamenti di 100 giorni circa. Considerando che ad ogni flushing si recuperano mediamente 5 embrioni per bovina, alla fine dei 12 mesi si prevede di ottenere un totale di circa 300 embrioni trasferibili.

Al contempo, saranno testati diversi protocolli per la sincronizzazione dell'estro in altre femmine delle aziende coinvolte. Una volta sincronizzate, le bovine saranno inseminate mediante monta naturale o FA con alcuni dei tori selezionati



durante la prima fase del progetto. Saranno valutati i principali parametri riproduttivi (tasso di calore, tasso di concepimento, tasso di fertilità e tasso di mortalità embrionale/neonatale), le caratteristiche morfologiche dei nascituri e le produzioni quali-quantitative. A partire da questo periodo e per tutta la durata del progetto, sarà fornita assistenza tecnica agli allevatori nella scelta del maschio, minimizzando il grado di parentela entro la popolazione e pianificando gli accoppiamenti. L'allevatore sarà inoltre assistito nella scelta di tecniche di allevamento mirate al miglioramento dell'efficienza riproduttiva della mandria. Saranno valutati i principali parametri riproduttivi e produttivi (in termini quali-quantitativi) sui soggetti delle aziende coinvolte. Analogamente sarà valutato l'effetto della stagione sulle performance riproduttive e produttive (sia in termini quantitativi che qualitativi), e verranno individuate tecniche di allevamento più idonee alla tutela del benessere della razza anche nel periodo estivo, in cui allo stress da calore si aggiunge la scarsa disponibilità foraggera.



3° periodo (OPU + IVEP)

Nel terzo periodo, della durata di 6 mesi, verrà effettuato l' OPU (ovum pick-up), che consente il prelievo in vivo, per via transvaginale ecoguidata, di oociti immaturi dalle donatrici precedentemente scelte (n=15). Il prelievo verrà eseguito una volta al mese, quindi per un totale di 6 prelievi.

Grazie alla maggiore ripetibilità, l'OPU consente il recupero di una notevole quantità di oociti meioticamente competenti da destinare alla IVEP (produzione embrionale in vitro), sfruttando l'attività follicologenetica dell'individuo donatore. Ne consegue che la suddetta tecnica, rispetto alle altre oggi disponibili, consente, in un determinato intervallo di tempo, una maggiore produzione di embrioni per donatrice. Inoltre, questa tecnica può essere utilizzata su una più ampia tipologia di donatrici come femmine acicliche e gravide fino al quarto mese, su soggetti che presentano occlusione tubarica o infezioni del tratto genitale ed in tutti quegli animali che non rispondono alla stimolazione ormonale. Un altro vantaggio dell'OPU associato all'IVEP è riferibile alla possibilità di ottenere molteplici combinazioni geniche, in quanto, grazie all'IVF gli oociti della stessa femmina o di femmine diverse possono essere fecondati con il seme di diversi tori opportunamente scelti. Ciò consente di aumentare la variabilità genetica, diminuendo la consanguineità.

Le donatrici saranno opportunamente contenute e sottoposte ad anestesia epidurale sacro-coccigea con 4 cc di Lidocaina



cloridrato al 2% (Gellini, Italia) per rilassare la muscolatura intestinale e consentire un buona manipolazione delle ovaia. L'OPU verrà tecnicamente effettuato utilizzando un ecografo portatile (SonoAce - PICO, Medison, Cypress, CA, USA) con una sonda convex da 4 a 9 MHz (mod. CD4_9/10EDN) montata su apposito supporto vaginale. Per ogni seduta di OPU, saranno pertanto registrati il numero di follicoli visualizzati, di quelli aspirati e dei complessi cumulo-oocita (COC) recuperati in ciascun soggetto. I COCs recuperati verranno valutati in base a criteri morfologici, attenendosi ad una classificazione universalmente riconosciuta (International Embryo Transfer Society) , in maniera da registrare l'incidenza dei COCs di buona qualità sul totale di quelli recuperati. I COCs verranno poi lavati in TCM 199 tamponato con Hapes e maturati in vitro in TCM 199 tamponato con bicarbonato di sodio ed addizionato con il 10% di siero fetale, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di FSH, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di LH e 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di 17 beta-estradiolo. Le piastre di maturazione saranno incubate a 39°C in atmosfera umidificata con il 5 % di CO_2 per 22-24 ore. Gli oociti maturi saranno poi fecondati con spermatozoi congelati/scongelati provenienti da più tori in modo da favorire nuove svariate combinazioni genetiche ed aumentare la variabilità genetica. Il seme previamente separato mediante gradienti di Percoll nel medium Tyrode Albumine Lactate Pyruvate (TALP), addizionato di 5 SI/mL di eparina, 30 μM penicillamina, 15 μM ipotaurina e 1 μM epinefrina, nelle stesse condizioni d'incubazione utilizzate per la maturazione. Dopo circa 20 ore di co-incubazione con gli spermatozoi, i presunti zigoti



saranno denudati delle cellule del cumulo e coltivati in vitro in medium SOF (37) addizionato di aminoacidi ed albumina sierica bovina. Si procederà con la valutazione del cleavage (divisione a 2 cellule) e della percentuale di blastocisti al giorno 7 (giorno 0= giorno della fecondazione).

Si ipotizza di recuperare ad ogni seduta mediamente 10 oociti per donatrice che equivalgono, con una percentuale di embrioni trasferibili del 35%, a 3.5 embrioni. Ne consegue che 6 prelievi si tradurranno nella produzione di circa 300 embrioni. Di questi, la maggior parte (80%) verrà trasferito in bovine riceventi allevate nell'habitat naturale, mentre il restante 20% verrà crioconservato nella Gene Resource Banking.



4° periodo (trasferimento embrionale e diffusione dei dati).

L'ultimo periodo, della durata di 12 mesi, verrà utilizzato per il trasferimento embrionale (ET) a tempo fisso e per il monitoraggio delle gravidanze. Innanzitutto si identificheranno le riceventi in cui impiantare gli embrioni prodotti mediante MOET e IVEP. Allo scopo si utilizzerà un protocollo di sincronizzazione che consente di effettuare l'ET a tempo fisso, basato sull'impiego di eCG in un protocollo basato sull'utilizzo di GnRH e progesterone. In particolare, le riceventi verranno sincronizzate mediante un impianto vaginale di progesterone e contemporanea somministrazione di GnRH e PGF2a al Giorno 0, rimozione dell'impianto e somministrazione di PGF2a ed eCG al giorno 7, ed un'ulteriore somministrazione di GnRH al giorno 9. Si procederà con l'ET di embrioni di 6 e 7 giorni in riceventi a 7-8 giorni dopo l'ovulazione rispettivamente. Al momento del trasferimento gli animali saranno sottoposti ad indagine ecografica per valutare la presenza e funzionalità del corpo luteo. Le diagnosi di gravidanza saranno effettuate a 25 giorni mediante ecografia trans-rettale e confermate a 45, e 70 giorni attraverso esplorazione rettale e monitorate fino al termine.



Disponendo di circa 600 embrioni prodotti con la MOET e con l'OPU-IVEP ed avendo previsto di crioconservare solo il 20%, trasferiremo circa 480 embrioni, mentre i rimanenti 120 saranno stoccati (GRB). Da questi trasferimenti ci si attende di ottenere 168 vitelli, dato che le percentuali di gravidanza attese, calcolate in modo estremamente prudente, sono del 40% e 30% rispettivamente per embrioni in vivo e in vitro. Ne consegue che, grazie all'utilizzo delle biotecnologie riproduttive, ciascuna donatrice in un anno produrrà il numero di vitelli che normalmente avrebbe prodotto in 12 anni. Inoltre l'utilizzo di tori diversi nell'ambito delle tecniche di produzione embrionale consentirà di aumentare notevolmente il numero di combinazioni genetiche, favorendo la biodiversità.

In questo periodo si provvederà, inoltre, alla elaborazione e divulgazione dei dati attraverso incontri da effettuarsi sul territorio con gli operatori del settore, nonché alla promozione dei prodotti tipici della razza.



CRONOPROGRAMMA

Primo anno: periodo 1 (6 mesi): individuazione delle aziende, valutazione morfologica dei soggetti giovani, valutazione del livello di consanguineità, scelta delle donatrici e dei giovani tori. *Periodo 2 (6 mesi):* MOET, trasferimento e crioconservazione embrionale, sincronizzazione, accoppiamenti programmati, valutazione dell'effetto della stagione e registrazione dei parametri produttivi e riproduttivi.

Secondo anno: periodo 2 (6 mesi): MOET, trasferimento e crioconservazione embrionale, sincronizzazione, accoppiamenti programmati, valutazione dell'effetto della stagione e registrazione dei parametri produttivi e riproduttivi. *Periodo 3 (6 mesi):* OPU+IVEP, trasferimento e crioconservazione embrionale, accoppiamenti programmati, valutazione dell'effetto della stagione e registrazione dei parametri produttivi e riproduttivi.

Terzo anno: periodo 4 (12 mesi): trasferimento embrionale e monitoraggio gravidanze, accoppiamenti programmati, valutazione dell'effetto della stagione e registrazione dei parametri produttivi e riproduttivi, elaborazione/divulgazione

ATTIVITA' PREVISTE	1° semestre	2° semestre	3° semestre	4° semestre	5° semestre	6° semestre
Individuazione delle aziende						
Valutazione morfologica						
Valutazione del livello di consanguineità						
Scelta delle donatrici						
Scelta tori						
MOET						
Trasferimento embrionale						
Crioconservazione embrionale						
Sincronizzazione						
Accoppiamenti programmati						
Valutazione dell'effetto della stagione						
Registrazione dei parametri produttivi						
Registrazione dei parametri riproduttivi						
OPU+IVEP						
Monitoraggio gravidanze						
Elaborazione/divulgazione dei dati						
Promozione dei prodotti tipici						

PIANO FINANZIARIO

	STEP	TIPOLOGIA DI SPESA		DISCIZIA	A.PRO.ZOO.	ARSA	ARA	PROVINCIA	SLOW FOOD	
STEP 1	selezione animali messa a punto protocolli	risorse umane	COSTI uomo	3.600						
			viaggi e missioni	1.440						
		risorse strumentali	acquisto/gestione animali		15.000					
			servizi			5.000		5.000		
STEP 2	MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer)	risorse umane	COSTI uomo	6.200						
			viaggi e missioni	1.440						
		risorse strumentali	farmaci	12.000						
			servizi		25.000	7.500				
STEP 3	OPU (Ovum Pick Up)	risorse umane	COSTI uomo	5.600						
			viaggi e missioni	576						
		risorse strumentali	materiale laboratorio	15.000						
			farmaci	5.000						
	servizi		25.000	10.000		5.000				
STEP 4	CRIOCONSERVAZIONE	risorse umane	COSTI uomo	1.180						
			viaggi e missioni	576						
		risorse strumentali	bidone LN2	2.000						
			materiale consumo	3.500						
	servizi				10.000					
STEP 5	EMBRYO TRANSFER	risorse umane	COSTI uomo	7.320						
			viaggi e missioni	2.880						
		risorse strumentali	farmaci	5.000						
			servizi			7.500				
STEP 6	INFORMAZIONE	risorse umane	COSTI uomo	1.100						
			viaggi e missioni	576						
		servizi			10.000		5.000	10.000	10.000	
	PROGETTAZIONE		5%		12.500					
	SPESE GENERALI		5%	12.500						
	TOTALE			137.488	67.500	10.000	15.000	10.000	10.000	249.988