



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Animali

*Effetto del prodotto "Heifer Plus" sulla fertilità e sul
sessaggio del seme bovino*

*Effect of "Heifer Plus" product on fertility and female purity of
cattle sperm*

Relatore

Prof. Cassandro Martino

Correlatore

Dott. Callegaro Massimo

Laureanda: Marin Irene

Matricola n. 1102984

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

*“Talvolta rossa, sono bianca e mora, so così arta come un
monumento. Er toro nun sò più ‘ndo sta de casa,
faccio l’amore cor veterinario e con er laico;
ma l’atto se basa su una paietta dentro ar tafanario!
Però so triste. È diventato saggio, l’allevatore mio.
S’è fatto vecchio e nun me guarda più.
Guarda ner secchio!”*

Giancarlo Lanari

INDICE

Riassunto	7
Abstract	8
1. Introduzione	9
1.1 La Frisona Italiana	9
1.1.1 La Storia	9
1.1.2 Il Libro Genealogico	14
1.1.3 L'Associazione Nazionale Allevatori di razza Frisona Italiana (ANAFI)	17
1.1.4 La Valutazione Morfologica	18
1.1.5 La Selezione ed il Miglioramento Genetico	20
1.1.6 Caratteristiche Produttive	26
1.1.7 Caratteristiche Riproduttive	27
1.2 Importanza dell'Efficienza Riproduttiva	29
1.3 L'Inseminazione Artificiale	33
1.3.1 Cenni storici e generalità	33
1.3.2 Metodo Tradizionale di preparazione del seme	36
1.3.2.1 Regime igienico, alimentare e sessuale del toro	37
1.3.2.2 Raccolta del seme	38
1.3.2.3 Valutazione del seme e parametri di qualità	41
1.3.2.4 Diluizione, Congelamento, Conservazione e Distribuzione del seme	43
1.3.3 La Tecnica di Inseminazione Artificiale	46
1.3.3.1 Strumenti per l'Inseminazione Artificiale	47
1.3.3.2 L'intervento di Fecondazione Artificiale	50
1.4 Fattori che influiscono sulla fertilità	52
1.5 Il Seme Sessato	58
1.6 La Diagnosi di Gravidanza	60
2. Obiettivi	64

3. Materiale e Metodi.....	65
3.1 Organizzazione della prova	65
3.2 Centro Tori e descrizione dei tori usati	66
3.3 Raccolta dei Dati	71
3.4 Analisi Statistica dei dati	72
4. Risultati e Discussione	74
5. Conclusioni	79
6. Allegati e Tabelle.....	81
7. Bibliografia e Sitografia	105
Ringraziamenti	108

Riassunto

La riproduzione, in quanto fase obbligata per effettuare una selezione, è un momento importantissimo dell'attività di allevamento ed è appunto da essa che dipendono, in buona parte, i risultati economici dell'allevamento stesso (Fusco, 1990). L'efficienza riproduttiva, infatti, rappresenta una priorità in tutti i sistemi di allevamento, poiché concorre a determinare l'efficienza economica dell'azienda. La fertilità nelle vacche da latte, nel corso degli ultimi decenni, è in costante calo a livello globale, mentre continuano a crescere i livelli di produzione. Per migliorare la fertilità delle bovine, è quindi necessario identificare delle strategie che apportino un beneficio sia per il settore lattiero-caseario che per il benessere della bovina. Molteplici sono le cause che, con diversa incidenza, riducono la fertilità; l'esito positivo di una gravidanza dipende, infatti, da una serie di fattori, come la qualità iniziale del seme, la sua idonea conservazione alle temperature previste, la sanità della femmina ricevente e l'esperienza dell'operatore (Bracco e DeAcetis, 2002).

La finalità del presente lavoro di tesi è stata quella di verificare l'efficacia del prodotto "Heifer Plus" in termini di fertilità e purezza, secondo quanto dichiarato dalla casa produttrice, in 26 aziende zootecniche specializzate da latte, del territorio del Nord Italia.

Il prodotto, la cui composizione per motivi brevettuali non è nota, è un additivo per il seme in fase di lavorazione, il cui effetto, come dichiarato dalla ditta produttrice, dovrebbe aumentare del 10% il tasso di gravidanza e del 20% la percentuale di figlie femmine, in seguito ad una maggior "stimolazione" della fertilità e della motilità degli spermatozoi con cromosoma X femminile.

Diversi sono i vantaggi pratici della preselezione del sesso, come ad esempio la possibilità di utilizzare un minor numero di vacche geneticamente migliori per la produzione di manze da sostituzione ed una più ampia possibilità di incrocio delle bovine con tori sia da latte che da carne (Hohenboken, 1999; Seidel, 2002).

In questa prova sperimentale, sono stati analizzati i dati relativi a 547 fecondazioni artificiali con diagnosi di gravidanza e 221 diagnosi ecografiche per la determinazione del sesso fetale, mediante Test del Chi-Quadrato e Analisi Logistica. In particolare, è stato studiato l'effetto dell'allevamento, del tipo di dose usata, del numero di intervento fecondativo, della categoria e del toro. Il tasso di gravidanza medio è risultato leggermente inferiore nel seme trattato con "Heifer Plus", rispetto a quello convenzionale non trattato, perciò l'ipotesi di un aumento del 10% del tasso di gravidanza non è stata confermata. Gli unici effetti ad aver influenzato il tasso di gravidanza sono stati l'allevamento e la categoria. Tuttavia, si è riscontrato un leggero aumento della percentuale di figlie femmine, rispetto a ciò che si è riscontrato con il seme convenzionale, ma non è apparso significativo; pertanto, nel territorio del Nord Italia, il prodotto "Heifer Plus" non è risultato un metodo affidabile per la preselezione del sesso nei bovini.

Abstract

Reproduction, as compulsory phase to make a selection, it's a very important moment of the breeding activity and it's indeed from its that depend, in large part, the economical results of a herd (Fusco, 1990). The reproductive efficiency, in fact, is a priority in all farming systems, because it helps to determine the economical efficiency of the herd.

Fertility in dairy cows, during the last decades, has been steadily declining at global level, while the production levels continuing to increase. To improve the fertility of dairy cows, it's therefore necessary to identify some strategies that bring a benefit for both the dairy industry and for the animal welfare. There are many causes that reduce fertility, even if with different incidence; the result of a successful pregnancy depends, in fact, on a series of factors, such as the initial quality of the cattle sperm, its suitable conservation at the required temperatures, the cow's health and the operator's experience (Bracco and DeAcetis, 2002).

The purpose of this thesis was to check the fertility and purity of the product "Heifer Plus" in 26 commercial dairy herds of the Northern Italy. The product, whose composition for patent reasons is unknown, is an additive for cattle sperm during processing, whose effect, as reported by the manufacturing company, should increase by 10% the pregnancy rate and by 20% the percentage of heifer calves, as a result of a major "stimulation" of fertility and motility of the sperm with the X-chromosome.

Several practical advantages have been suggested for sex preselection, such as the opportunity of using fewer and genetically better cows for producing replacement dairy heifers and a wider opportunity for crossbreeding of dairy cows with both dairy or beef bulls (Hohenboken, 1999; Seidel, 2002).

In this study, we analyzed the data of 547 artificial inseminations with diagnosis of pregnancy and 221 ultrasonographic diagnosis to determine fetal sex, using the Chi-Square Test and the Logistic Analysis. Particularly, it has been studied the effect of the herd, of the dose type used, of the number of insemination, of the category and of the bull. The average pregnancy rate is slightly lower in the cattle sperm treated with "Heifer Plus", compared to the conventional one, so the hypothesis of a 10% increase in the pregnancy rate has not been confirmed. The only effects that may have influenced the pregnancy rate were the herd and the category factors.

However, it was found a slight increase in the percentage of heifer calves, compared to what it has been found with the conventional cattle sperm, but it wasn't significant; so, in the territory of Northern Italy, the product "Heifer Plus" proved not to be a reliable method for sex preselection in cattle.

1. Introduzione

1.1 La Frisona Italiana

Razza cosmopolita, una volta presente in percentuale nettamente minoritaria nelle campagne italiane e raggruppata attorno a poche località, La Frisona Italiana è oggi la prima razza del Paese, per numero e per la qualità di selezione (Lanari, 1990).

Tutti sanno che la razza Frisona deve il suo nome alla regione dove ha avuto inizio il suo allevamento intensivo: la Frisia olandese; molti però ignorano che nel giro di poco più di un secolo essa è divenuta la razza in assoluto più diffusa e più lattifera del mondo.

Tale diffusione è da attribuirsi alla sua estrema capacità di adattamento, che la porta a vivere bene in tutte le regioni, alle altitudini più diverse, dal mare fino ad oltre 2000 m, dai climi freddi del Nord Italia alle zone semiaride del profondo sud; in secondo luogo, grazie alla sua inarrivabile potenzialità produttiva che la porta a distanziare le altre razze mediamente di 10-12 q.li per lattazione, quella stessa potenzialità che ha permesso a migliaia di vacche di superare i 100 q.li annui ed a centinaia di esse di superare i 1.000 q.li nella carriera (ANAFI, 1994).

1.1.1 La Storia

La razza Frisona è originaria della vasta area dei Paesi Bassi, della Germania del Nord, del Sud della Danimarca ed in particolare ha tipicamente popolato la Frisia da cui ha tratto il nome nel XIX secolo.

Sull'origine della razza Frisona, vi sono varie ipotesi e l'incertezza è dovuta al fatto che non esistono chiare prove in favore di una o di un'altra di queste ipotesi.

Una prima ipotesi vuole che la Razza sia autoctona della Frisia da oltre 2000 anni, ma non vi sono prove che affermino che possa essere stata presente anteriormente all'800 D.C.. Notizie certe di commercio di bestiame in quell'area risalgono al 1200; non è, però, possibile trarre notizia circa il tipo di razza allevata, anche se resti ossei di animali scheletricamente coincidenti con l'attuale morfologia della Frisona, risalenti al Medio Evo, non escludono la sua esistenza in quel periodo.

Un'altra ipotesi parte dall'analisi delle situazioni eccezionali derivanti da inondazioni ed epizootie gravissime che si verificarono nella Frisia dal Medio Evo in poi; in relazione a ciò, si ritiene che alla fine del 1700 fossero praticamente scomparse tutte le vecchie razze.

Questa ipotesi viene peraltro sostenuta dal fatto che, da notizie letterarie e pittoriche, il bestiame bovino di quel periodo era di colore bruno rossiccio, perciò si ipotizza che il bestiame bianco-nero si sarebbe stabilito nei Paesi Bassi nella seconda metà del 1700.

Probabilmente, tra queste due ipotesi, la verità è nel mezzo. Data, infatti, l'alta mortalità di bestiame che ha caratterizzato il secolo XVIII, è poco probabile che le razze autoctone si siano potute mantenere pure e certamente il patrimonio genetico delle vecchie razze si è fortemente mescolato con quello del bestiame di importazione che andava a colmare i vuoti dovuti alla mortalità.

Da questo vasto rimescolamento genetico è probabilmente emerso il carattere bianco-nero del mantello, o come frutto di aggregazione di geni di razze differenti rilevatosi dominante o come risultato dell'importazione di un carattere dominante.

L'aspetto importante è che il carattere bianco-nero dominante probabilmente ha prevalso negli incroci che si venivano a determinare con i resti delle precedenti razze bovine ed ha tipicizzato morfologicamente l'intera popolazione. Questo fenomeno è stato frutto di un'azione selettiva degli allevatori olandesi e non frutto di casualità di incrocio.

Dimostrazione di ciò è il fatto che il carattere rosso delle vecchie razze bovine dei Paesi Bassi, anche se come allele recessivo, è ancora presente nel patrimonio genetico della popolazione della Frisona e la nascita di bestiame pezzato rosso o tutto rossiccio è una caratteristica ben nota della razza.

Al di là di ipotesi più o meno accettabili, un dato di fatto è che nella metà del 1800, in Olanda, era presente ed allevata in larga percentuale una razza bovina pezzata nera ottima produttrice di latte e con una conformazione che, pur se non ne faceva una tipica razza da carne, certamente dava una soddisfacente resa al macello. Non si sa se in seguito alla fissazione degli ottimi caratteri genetici della Frisona oppure allo sviluppo vertiginoso dell'economia degli scambi che caratterizzò la seconda metà del 1800, ma a partire dal 1850 la razza Frisona Olandese superò velocemente i confini di origine e si espanse in Europa ed in America per giungere, all'inizio del 1900, ad una sua presenza in tutti i continenti, con ceppi differenti in relazione ai differenti ambienti di acclimatazione, e per affermarsi, oggi, come la migliore razza bovina produttrice di latte nel mondo (Fusco,1990).

In Italia, la storia della Frisona negli ultimi cento anni rispecchia in stretto parallelismo l'evoluzione dell'agricoltura e dell'economia agricola nazionale e ne è punta avanzata di questo processo.

I primi capi di Frisona Olandese furono introdotti in Italia nel 1860, precisamente nella Pianura Padana; si trattava di pochi capi, concentrati in poche aziende. Questa importazione fu il risultato di una ricerca promossa da singoli allevatori che operavano autonomamente, con iniziative personali finalizzate a migliorare l'organizzazione produttiva della propria azienda, spinti dalle notizie di notevoli produzioni lattifere che giungevano dall'estero ed in particolare dall'Olanda.

La Frisona rappresentava, infatti, la rivoluzione tecnologica ed economica dell'agricoltura; era la razza che tipicizzava la specializzazione produttiva e che consentiva di esprimere le massime produzioni di latte, ottimizzando la trasformazione di foraggi ricchi.

Il primo dato statistico ufficiale nella storia della Frisona risale al 1908. In quell'anno la consistenza della Frisona Olandese in Italia era di oltre 60.000 capi, quasi tutti concentrati nell'area padana (ANAFI). La loro affermazione, seppur non travolgente, a causa del confronto con la Bruna Alpina che maggiormente soddisfaceva la visione economica di gran parte degli allevatori padani di quel periodo, si stava consolidando.

Un aspetto particolare fu l'utilizzazione di una pratica selettiva che accelerò il processo di diffusione della Frisona in Val Padana: l'incrocio di sostituzione.

Nel momento in cui l'allevatore si convinceva della validità della nuova razza e decideva di immetterla nel proprio allevamento, si trovava di fronte ad un'alternativa per sostituire i capi di altre razze già presenti in stalla: o acquistava i capi di cui necessitava, oppure utilizzava esclusivamente tori della nuova razza, operando appunto un incrocio di sostituzione, per cui nell'arco di qualche anno il suo bestiame acquisiva sempre più le caratteristiche volute.

Dati i tempi, le ancora non eccellenti possibilità di scambio commerciali e lo stato delle disponibilità economiche di gran parte degli allevatori, l'affermazione della Frisona si realizzò in larga parte con incroci di sostituzione sulla Bianca Padana.

A fronte della situazione in Val Padana, nel resto dell'Italia gli allevamenti bovini risentivano ancora del livello tecnico-economico delle agricolture che caratterizzavano i singoli territori prima dell'unità nazionale e fino alla fine della prima guerra mondiale non se ne discostarono molto.

Con la guerra 1915-18, tutta l'agricoltura italiana risentì dello sforzo umano ed economico che l'eccezionalità del momento richiese. Fu con la stabilizzazione politica derivata dalla definitiva affermazione del regime fascista che l'economia si mise nuovamente in movimento. Per quanto riguarda l'allevamento bovino, la miglior comprensione dell'importanza dell'alimentazione, delle condizioni di allevamento, della selezione, diedero avvio ad una vera rivoluzione che vide nelle razze Bruna Alpina e Frisona le punte avanzate.

In Pianura Padana, dove le macchine agricole erano presenti in percentuale maggiore e dove la foraggicoltura si esprimeva a livelli molto alti, la Frisona era sempre più presente in stalle moderne, con molti capi, il cui numero era in continuo aumento. Le importazioni dall'Olanda, che si erano interrotte con gli anni di guerra, ripresero con maggiore intensità ed oculatezza di scelta.

La Frisona allevata in Italia, frutto di incroci di sostituzione continuamente sostenuti da nuovi patrimoni genetici importati con tori dall'Olanda, aveva assunto intorno agli anni '30 una fisionomia che rispecchiava il modello morfologico olandese.

Nel 1928, la Bonifica di Torre in Pietra, promossa da Luigi Albertini, importò i primi soggetti statunitensi nell'agro-romano dove è sempre prevalso il giudizio che si trattasse di un animale troppo delicato per resistere al suo clima.

La consistenza della razza Frisona, pur se quasi triplicata nell'arco di un trentennio (dal censimento del 1942 risultavano presenti in Italia 189.000 capi frisoni), in concreto era ancora poca cosa rispetto all'intero patrimonio bovino nazionale che ammontava a circa 8.400.000 capi (Fusco, 1990).

L'organizzazione economica e tecnica dell'impresa agricola, che utilizzava largamente lavoro animale, era l'ostacolo principale al diffondersi di una razza bovina a così alta specializzazione nel latte e poco adatta al giogo.

La pezzata nera era quasi esclusivamente allevata in aziende di punta, in territori del Nord Italia all'avanguardia tecnica ed economica; le stalle dove era allevata la pezzata nera in larga percentuale erano gestite dai migliori imprenditori agricoli. La Frisona era, quindi, il metro di misura per identificare un'agricoltura avanzata.

E' soltanto dopo la seconda guerra mondiale che la razza Frisona ha avuto un incremento eccezionale. Esauritisi gli eventi violenti, il mondo era cambiato, era cambiata l'Italia e l'agricoltura, e con gli anni '50 per gli allevatori italiani iniziò un nuovo periodo di attività e di sviluppo.

Nel buio degli eventi bellici, infatti, un fattore negativo si dimostrò, per effetto indotto, positivo. I conferimenti obbligatori di bestiame per macello, che hanno interessato anche le stalle da latte durante gli anni di guerra, hanno comportato una più accentuata pressione selettiva, poiché gli animali meno produttivi furono eliminati in percentuale maggiore che nelle normali condizioni di allevamento.

Negli anni subito successivi alla seconda guerra mondiale, quindi, in Val Padana esistevano stalle di Frisona con alta produzione di latte pro-capite. Si palesò, così, un netto divario produttivo ed economico tra la Frisona e le altre razze allevate, che fece nascere un orientamento abbastanza generalizzato a favore della pezzata nera; furono moltissimi gli allevatori che si convertirono a questa razza in breve tempo.

Ne conseguì che, a domanda crescente di capi frisoni, l'offerta era decisamente insufficiente. Questa situazione trovò forze economiche pronte a farvi fronte e quindi si aprì il capitolo delle importazioni del dopoguerra.

Si determinarono così due livelli di domanda: la prima indirizzata verso la razza Frisona in genere, per sostituire altre razze meno convenienti; questa domanda proveniva da un gran numero di aziende e di imprenditori che si erano convertiti recentemente all'allevamento della Frisona. La

seconda, focalizzata sulla Carnation, la linea Nord Americana, era una domanda numericamente meno consistente rispetto alla prima, che proveniva da aziende che avevano già da tempo in allevamento il ceppo olandese.

Le importazioni iniziate nel dopoguerra si trasformarono in breve tempo in un vero e proprio flusso continuo e la Frisona andò ben presto a sostituire le razze locali della Val Padana, ma anche del resto dell'Italia, pur se in modo meno accentuato.

La linea Carnation, grazie a buoni tori importati, alla fine prevalse e si sovrappose al ceppo olandese dando origine a quella popolazione Frisona, con sue peculiari caratteristiche, che fu battezzata come "Frisona Italiana".

Il periodo che va dal dopoguerra ai giorni attuali, per quanto riguarda la storia della Frisona Italiana, è molto articolato perché il suo evolversi non fu più solo il risultato diretto dell'azione degli allevatori interessati, ma anche il frutto di interazioni tra politica, economia e tecnica.

Secondo un'indagine statistica, i capi di razza Frisona Italiana passarono da 1.100.000 nel 1956 a 3.000.000 nel 1969. Alla fine del 1986, su un totale di 3.004.000 vacche da latte, il 54,5% appartenevano alla razza Frisona.

Per quanto riguarda la consistenza della Frisona in Italia dopo il 1986 si riportano le tabelle seguenti.

ANNO	VACCHE	LATTE KG	GRASSO %	PROTEINE %
1987	652.594	6.364	3,49	3,12
1988	696.804	6.595	3,51	3,10
1989	744.139	6.745	3,51	3,07
1990	802.654	6.943	3,48	3,05
1991	843.471	7.194	3,51	3,08
1992	844.354	7.353	3,53	3,11
1993	853.207	7.403	3,53	3,14

Statistiche Nazionali 1994, ANAFI

ANNO	CONSISTENZA		TREND FENOTIPICO			VACCHE x ALLEVAMENTO
	ALLEVAMENTI	VACCHE	LATTE KG	GRASSO %	PROTEINE %	
2006	14.069	1.102.655	8.945	3,70	3,33	78
2007	13.818	1.100.401	9.052	3,68	3,34	80
2008	13.510	1.101.868	8.979	3,68	3,37	82
2009	13.327	1.103.453	8.869	3,68	3,38	83
2010	13.164	1.113.859	9.125	3,70	3,36	85
2011	12.922	1.128.626	9.190	3,67	3,35	87
2012	12.578	1.130.270	9.320	3,72	3,38	90
2013	12.036	1.099.342	9.293	3,71	3,32	91
2014	11.517	1.076.181	9.472	3,67	3,29	93
2015	11.477	1.095.576	9.582	3,66	3,27	95

Statistiche Nazionali 2016, ANAFI

1.1.2 Il Libro Genealogico

Il Libro Genealogico è l'organizzazione unitaria degli allevatori che provvede ad individuare e catalogare tutti i soggetti della razza con le loro caratteristiche morfologiche, funzionali e genetiche; è lo strumento più efficace per il miglioramento e la valorizzazione della razza, a disposizione di tutti coloro, privati ed Enti, che ne abbiano interesse (ANAFI, 1972).

La storia del Libro Genealogico della Frisona Italiana è articolata e complessa e, per la sua parte più recente, è strettamente legata a quella dell'associazionismo degli allevatori italiani.

La registrazione delle genealogie ed il controllo del latte ebbero inizio nel 1922, quando alcuni Ispettori Agrari Provinciali iniziarono a raccogliere dati sulla produttività dei capi Frisoni ed a gestire Libri Genealogici provinciali.

Gli allevatori furono portati a seguire con maggiore attenzione la produzione dei singoli capi e ad analizzare criticamente le varie voci del bilancio aziendale, ma con gli eventi bellici ed il richiamo alle armi di controllori e funzionari, l'attività di controllo subì una serie di rallentamenti fino al quasi totale arresto.

Nel 1945 fu istituita l'Associazione Allevatori di Bovini di Razza Pezzata Nera Italiana con il compito di gestire direttamente l'effettuazione dei controlli funzionali e del Libro Genealogico. E' da tener presente che per ciascuna razza, in quel periodo, il Libro Genealogico era provinciale.

Nell'arco di vent'anni si modificò profondamente la figura dell'allevatore italiano che, con una sua elevazione culturale e tecnica, divenne in grado di strutturare e programmare il proprio allevamento utilizzando strumenti come selezione, riproduzione artificiale ed alimentazione razionale.

Successivamente, nel 1956 il MAF (Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste) unificò i Libri Genealogici provinciali ed istituì il Libro Genealogico nazionale della Frisona Italiana; l'anno seguente venne, poi, costituita l'Associazione Nazionale di Allevatori di Bovini di Razza Frisona Italiana (A.N.A.F.I.), più rispondente ai compiti ed agli obiettivi degli allevatori.

Il primo obiettivo che gli allevatori si posero, appena costituitisi in Associazione Nazionale, fu la rivendicazione del diritto di gestire autonomamente, pur sotto il controllo del MAF, il proprio Libro Genealogico.

Con la tenuta diretta e responsabilizzata del Libro Genealogico da parte degli allevatori, nel 1963, iniziò una nuova fase del lungo cammino della Frisona Italiana, anche se la politica dell'autonomia dei Libri Genealogici fu principalmente portata avanti dall'Associazione Italiana Allevatori (AIA), cui aderiva l'ANAFI. Gli animali iscritti al 31 Dicembre 1971 erano oltre 500.000 con tendenza all'aumento.

Oggi, le attività del Libro Genealogico continuano ad essere svolte dall'Associazione Nazionale di razza.

Il Libro Genealogico rappresenta lo strumento per la selezione ai fini del miglioramento della razza ed ha la finalità di indirizzare, sul piano tecnico, con particolare riguardo alla determinazione delle qualità genetiche dei riproduttori, l'attività di selezione e di produzione in seno alla razza, promuovendone nel contempo la valorizzazione economica.

Allo svolgimento dell'attività del Libro Genealogico, l'Associazione Nazionale Allevatori di razza provvede con: la Commissione Tecnica Centrale, l'Ufficio Centrale, gli Uffici provinciali, gli Uffici esteri ed il corpo degli Esperti.

La Commissione Tecnica Centrale studia e determina i criteri e gli indirizzi per la selezione ai fini del miglioramento della razza, stabilisce le metodologie per l'azione di selezione, e provvede a regolamentare le disposizioni in materia di riproduzione.

L'Ufficio Centrale ha la responsabilità diretta ed organizzativa e provvede al coordinamento ed al controllo del lavoro degli Uffici provinciali e degli Uffici esteri; il compito principale dell'ufficio del Libro Genealogico consiste soprattutto nella raccolta, registrazione ed interpretazione del maggior numero possibile di dati ed elementi relativi ad ogni soggetto di razza Frisona.

Le Associazioni Provinciali Allevatori, giuridicamente riconosciute e associate all'Associazione Nazionale di razza, provvedono alla organizzazione ed al funzionamento degli Uffici provinciali del Libro Genealogico, che hanno la responsabilità esecutiva e curano tutti i rapporti con gli allevatori.

Gli Uffici esteri si occupano di espletare sul piano nazionale le stesse attività previste per gli Uffici provinciali, ma sotto il diretto controllo dell'Ufficio centrale.

Il Corpo degli esperti, invece, è formato da: ispettori di razza, esperti nazionali ed esperti provinciali, per la valutazione morfologica dei tori e delle vacche da iscrivere al Libro Genealogico, nonché di quella dei bovini presentati nelle mostre e nei concorsi ufficialmente riconosciuti dal Libro.

L'adesione al Libro Genealogico da parte degli allevatori è volontaria ed è gestita dalle Associazioni Provinciali Allevatori (APA); possono essere ammessi al Libro Genealogico tutti gli allevamenti che possiedono soggetti di razza Frisona Italiana.

Dal 1976 il regolamento del Libro Genealogico accetta l'iscrizione non solo degli animali con il classico mantello pezzato nero, ma anche di quelli con mantello pezzato rosso, quando tali soggetti siano figli di genitori sicuramente iscritti. Ciò garantisce che il colore del mantello non sia

dovuto a meticciamento, bensì all'estrinsecarsi del noto carattere recessivo rosso presente nel patrimonio genetico della razza.

L'allevatore interessato deve farne esplicita richiesta per iscritto, all'Associazione Provinciale Allevatori competente per territorio, o alla competente Sezione estera.

Il Libro Genealogico della Frisona Italiana si può definire "aperto", anche se i soggetti da ammettere al Libro devono:

- essere in possesso dei caratteri di razza o importati dall'Italia nel caso delle Sezioni estere;
- appartenere ad un allevamento sottoposto al controllo sanitario dello Stato per quanto riguarda la brucellosi e la tubercolosi;
- appartenere ad un allevamento sottoposto, in forma regolare, al controllo ufficiale della produzione secondo le norme del regolamento di svolgimento dei controlli.

Il Libro Genealogico della razza Frisona in Italia accetta per l'iscrizione anche tutti gli animali che siano iscritti in un Libro Genealogico estero ufficialmente riconosciuto per poter disporre di materiale genetico pregevole dovunque questo si trovi (Fusco,1990).

Il Libro è sostanzialmente strutturato in tre sezioni:

- 1) Registro genealogico anagrafico, nel quale sono iscritti i soggetti, femmine e maschi, che abbiano i requisiti previsti dalle apposite "norme tecniche"; questo registro si divide in 4 sezioni:
 - Sezione 1^a: vengono iscritti alla nascita, i vitelli maschi e femmine;
 - Sezione 2^a: vengono iscritti i soggetti importati, previo deposito del certificato genealogico originale presso l'Ufficio Centrale che rilascerà l'apposita scheda genealogica sostitutiva.
 - Sezione 3^a: vengono iscritte le femmine mancanti dei requisiti previsti nelle Sezioni 1^a e 2^a e di ascendenza sconosciuta, che presentano i caratteri di razza.
 - Sezione 4^a: riguarda gli Uffici esteri ed in essa vengono iscritti i soggetti frisoni importati dall'Italia o nati da questi o dalla loro progenie. Per i nati all'estero si applicano le stesse norme previste per la Sezione 1^a sostituendosi l'Ufficio estero all'Ufficio provinciale.
- 2) Registro genealogico dei tori, al quale sono ammessi i tori in possesso dei requisiti previsti dalle apposite "norme tecniche"; sono radiati dal Libro Genealogico i tori che a giudizio dell'Ufficio Centrale siano risultati negativi alla valutazione genetica o che trasmettano tare, gravi vizi o altri caratteri negativi ai fini della selezione.
- 3) Registro genealogico delle vacche, al quale sono ammesse le vacche provenienti dal registro genealogico anagrafico.

Nel Libro Genealogico, dunque, confluiscono tutti i dati dei Controlli Funzionali (anagrafici, riproduttivi e produttivi) e morfologici, riguardanti i soggetti iscritti che rappresentano la popolazione animale controllata.

1.1.3 L'Associazione Nazionale Allevatori di razza Frisona Italiana (ANAFI)

L'Associazione nasce nel 1945 con la denominazione di "Associazione Allevatori di Bovini di razza Pezzata Nera Italiana" con i compiti di effettuare i controlli funzionali e di tenere il Libro Genealogico Nazionale. In seguito, nel 1957 diventa "ANAFI" Associazione Nazionale di Razza Frisona Italiana.

Oggi, essa ha l'incarico di gestire il "Libro Genealogico" della razza e di promuovere, attraverso l'attività deliberativa della Commissione Tecnica Centrale del Libro Genealogico, la selezione della razza stessa.

L'attività dell'ANAFI è riassumibile nei seguenti punti (Fusco, 1990):

- anagrafe del bestiame della razza;
- dati di produzione di latte, grasso e proteine, sulla base di quanto rilevato dall'Ufficio Centrale dei controlli dell'AIA;
- valutazione genetica di tutti i tori funzionanti nel Paese per quanto riguarda latte, grasso, proteine e vari aspetti della morfologia funzionale;
- controllo dei gruppi sanguigni con normale azione di routine;
- controllo e regolamentazione della fecondazione artificiale;
- controllo e regolamentazione del trapianto embrionale;
- assistenza genetica e controlli di performance dei giovani tori presso il Centro Genetico;
- promozione della Frisona Italiana nei Paesi esteri ed assistenza all'esportazione dei riproduttori mediante visite di tecnici ai capi in esportazione e rilascio dei certificati necessari;
- controllo e regolamentazione delle importazioni di bestiame;
- assistenza nella realizzazione di Mostre ed Aste;
- servizio di divulgazione tecnica per la qualificazione professionale degli allevatori.

Si tratta di un'intensa attività che si esplica presso la sede ed in tutto il Paese, ovunque vi siano allevamenti di Frisona Italiana iscritti al Libro Genealogico.

1.1.4 La Valutazione Morfologica

Prima che si pervenisse all'attuale organizzazione per il sistematico controllo delle produzioni e delle discendenze, i criteri di valutazione erano esclusivamente morfologici e si basavano su presunte correlazioni tra forma e funzione.

I giudizi venivano normalmente espressi da una commissione, per cui spesso il risultato era il compromesso di due o più pareri discordi perché del tutto personali, che correlavano automaticamente la bellezza estetica, ed in particolar modo le forme tondeggianti, alla produzione. I risultati dei controlli, però, dimostravano che molto spesso ai miglioramenti morfologici non corrispondevano quelli produttivi.

Una équipe di studiosi e specialisti ebbe, allora, l'incarico di individuare il modello della vacca da latte ideale, inteso come l'animale in grado di espletare le sue funzioni nel modo più economicamente vantaggioso ed il più a lungo possibile. Soltanto dopo aver pienamente soddisfatto questo concetto funzionale, veniva tenuta in considerazione anche l'estetica e, alla fine, ne risultava un animale funzionalmente bello per l'armonica fusione dei due aspetti.

Nel 1984, su raccomandazione della National Association of Animal Breeders, fu introdotto anche in Italia il nuovo sistema di valutazione lineare, che risultava essere il più preciso ed il più indicato per il raggiungimento di quattro scopi fondamentali: migliorare la produzione, aumentare il numero di lattazioni, ridurre la rimonta ed avere un maggior tornaconto economico.

La valutazione morfologica, oggi, rientra nei compiti istituzionali dell'ANAFI; questa attività viene svolta dagli ispettori di razza con il coordinamento dell'ANAFI che è responsabile della selezione, della formazione, dell'aggiornamento e del controllo del lavoro degli ispettori.

Obiettivo della valutazione morfologica è l'attribuzione ad ogni animale di un valore fenotipico per la sua conformazione.

La descrizione morfologica dell'animale viene fatta sulle femmine in produzione e sui maschi di oltre 18 mesi. Tutte le stalle iscritte al Libro Genealogico sono visitate due volte all'anno con scadenza semestrale e tutte le primipare presenti in allevamento vengono valutate in questa occasione.

La valutazione su scala lineare ci permette di valutare i caratteri morfologici considerati sulla scheda di valutazione, misurando la posizione di ogni carattere rispetto agli estremi biologici della razza e viene svolta utilizzando una scala lineare 1-50 per ogni carattere considerato (Allegato 1).

Ad ogni animale si attribuisce una valutazione soggettiva per quattro caratteristiche generali (Struttura, Forza da Latte, Arti e Piedi, Apparato mammario) per le femmine e tre per i maschi, ed un punteggio finale, basato sul confronto tra le caratteristiche dell'animale da valutare ed un ipotetico modello ideale.

Per quanto riguarda il punteggio finale, la scala di valutazione va da 50 a 100 punti; le vacche con valutazione inferiore a 70 punti non vengono iscritte al Libro Genealogico.

I dati ottenuti con la valutazione morfologica servono principalmente per la valutazione genetica dei riproduttori riguardante il tipo. Le valutazioni e gli indici genetici da queste derivati, vengono usati nella scelta delle madri di toro e per i piani di accoppiamento. In questo modo, si evidenziano i soggetti di maggior pregio ed il punteggio concorre a determinare anche il valore commerciale ed economico di un animale, che risulta essere sicuramente superiore per quei soggetti dove la correttezza dei vari caratteri morfologici si concretizza in un risultato armonico ed esteticamente bello.

Il presupposto fondamentale è che una particolare morfologia sia associata ad una maggiore durata e ad una maggiore funzionalità della vacca da latte, come dimostrato da numerosi studi sull'argomento. Le correlazioni tra morfologia e longevità funzionale, infatti, rappresentano una delle motivazioni più forti della selezione sul Tipo.

La “vacca ideale” (Fig. 1) rappresenta l’animale funzionalmente bello, capace di estrinsecare tutta la sua potenzialità produttiva in numerose regolari lattazioni, di produrre una notevole quantità totale di latte ed una numerosa discendenza (ANAFI, 1994).



Fig.1 *Modello di Vacca Ideale*

In generale, per quanto riguarda la “Struttura” i caratteri più importanti sono una groppa lunga e larga, leggermente inclinata verso il posteriore, con una corretta inserzione dell’articolazione coxo-femorale, equilibrio ed armonia fra le parti, statura e capacità corporea adeguate all’età, linea dorsale forte, soprattutto nella regione dei lombi, ed una corretta articolazione della spalla.

Una vacca da latte deve avere un aspetto che indichi predisposizione a produrre grandi quantità di latte, con forza fisica capace a sostenerle. Una vacca angolosa e di qualità dà l’impressione di convertire quanto mangia in latte e non in grasso; un costato largo ed aperto corrisponde spesso ad una vacca forte e potente, che appare sana e vigorosa. L’evidenza delle

caratteristiche da latte la troviamo in un collo lungo e disteso, in un musello largo, ma soprattutto in un costato aperto, con molto spazio intercostale ed un anteriore ampio e forte.

La struttura degli arti e la forma dei piedi hanno una sostanziale influenza sulla longevità e sono forse le parti più difficili da valutare, poiché ambiente e management influiscono molto su questi caratteri. Il piede ideale ha unghie corte e non aperte, un tallone alto e pastoie forti. L'arto posteriore perfetto è diritto visto da dietro; se osservato di lato deve avere un giusto appiombato, e non deve essere né stangato, né falciato. Inoltre, ogni passo deve essere armonico e sicuro visto che nelle stalle ricerchiamo vacche che si muovano facilmente.

Infine, i caratteri più importanti dell'apparato mammario sono la profondità e la posizione dei capezzoli. Mammelle di moderata profondità, al di sopra dei garretti, durano più a lungo e capezzoli corretti e ben posizionati contribuiscono ad una mungitura facile e veloce. La mammella anteriore deve essere fermamente attaccata e di giusta lunghezza, mentre quella posteriore, che deve produrre fino al 60% di latte, deve essere larga e ben estesa verso l'alto per poter contenere più latte possibile. Il tessuto deve essere morbido ed elastico, dimostrando così l'assenza di tessuto che non secerne latte.

Il modello ideale della Frisone Italiana è in continua evoluzione, in quanto la morfologia funzionale deve esprimere nel tempo l'adattamento della razza alle nuove tecniche gestionali ed alle nuove esigenze determinate dalla meccanizzazione e dalla robotizzazione degli allevamenti.

Il toro, invece, deve possedere ben espressi i caratteri di mascolinità e la sua conformazione esteriore deve dare un'impressione di potenza e di forza. Lo sviluppo e la mole devono comunque essere adeguati e conformi agli standard di razza.

Particolare importanza assumono la buona conformazione e la robustezza degli unghioni, soprattutto quelli del treno posteriore, su cui viene a gravare il peso di tutto il corpo nell'impennata indispensabile alla monta.

Notevole attenzione va posta anche all'esame morfo-funzionale dell'apparato genitale. Nel giovane maschio da adibire alla riproduzione e nel toro, i testicoli devono essere di giusta grandezza, ben discesi e mobili nella borsa scrotale, e privi di lesioni in atto o pregresse.

1.1.5 La Selezione ed il Miglioramento Genetico

Il miglioramento genetico degli animali zootecnici è la tecnica che consente l'aumento delle prestazioni produttive e riproduttive degli allevamenti attraverso la valutazione e la conseguente scelta (selezione) dei riproduttori. Può essere considerato una delle tecniche di produzione a disposizione dell'allevatore al pari dell'alimentazione, della mungitura, della riproduzione, dell'allevamento dei giovani animali e della stabulazione.

Negli ultimi cinquant'anni, la scienza genetica è molto progredita e le conoscenze e le tecniche di cui si dispone consentono oggi di programmare un'azione selettiva con un grado di previsione dei risultati molto elevato.

Le caratteristiche che si possono osservare in un animale, il suo fenotipo, dipendono da due fattori: i geni che esso eredita dai suoi genitori, cioè il suo genotipo, e gli effetti dell'ambiente nel quale l'animale è allevato (Peters e Ball, 1992).

I caratteri morfologici e funzionali di un individuo possono essere di tipo qualitativo o quantitativo. I caratteri qualitativi, come ad esempio il colore del mantello, sono discontinui, di norma controllati da uno o pochi geni e poco o per nulla influenzati dall'ambiente (clima, tecniche di allevamento, alimentazione, stato sanitario, ecc.); i caratteri quantitativi, come ad esempio la produzione di latte, sono, invece, ad ampia variabilità, controllati da numerosi geni aventi effetti simili e comportamento additivo, e sono facilmente influenzabili dalle condizioni ambientali.

Questi geni si possono raggruppare in combinazioni differenti, dando luogo a molti fenotipi, ma spesso è difficile stabilire se un fenotipo desiderabile sia il risultato dell'azione di geni vantaggiosi o di una buona conduzione dell'allevamento.

Mediamente il valore genotipico di un animale si trova a metà strada tra quello della madre e quello del padre, ma il valore genotipico di una progenie ha una distribuzione molto larga a causa della variabilità biologica che porta ad avere figli geneticamente molto diversi tra loro.

L'obiettivo della selezione è quello di produrre soggetti che posseggono combinazioni di geni, ereditati dai loro genitori, tali da influenzare i caratteri di produzione e di conformazione in modo desiderabile, traendone un utile economico.

La scienza della genetica applicata si basa molto sulle probabilità statistiche; questo significa che l'impiego di tori e di madri geneticamente superiori dovrebbe, di norma, produrre una progenie migliore di quella che si avrebbe con l'uso di riproduttori inferiori (Peters e Ball, 1992).

La selezione consiste, quindi, nella scelta degli animali geneticamente superiori da impiegare nel miglioramento genetico, il quale si ottiene aumentando nella popolazione la frequenza dei geni ad effetto additivo più favorevoli.

L'obiettivo di selezione della Frisone Italiana è molteplice: migliorare la qualità del latte, ossia il tenore in grasso e proteine adeguato al consumo fresco e adatto alla trasformazione casearia, aumentare la quantità di latte intesa come chili di proteina, ed aumentare la longevità funzionale dell'animale. Per longevità funzionale si intende la capacità di un animale di stare più a lungo in azienda, in buone condizioni di salute e senza problemi riproduttivi, a parità di valore genetico per la produzione di latte (Miglior, 1998).

I controlli funzionali ed il libro genealogico sono gli strumenti di base per iniziare la selezione. Con i controlli funzionali, istituiti dallo Stato ed affidati all'AIA, si rilevano sistematicamente le produzioni di latte, con il relativo contenuto in proteine e materia grassa, degli animali iscritti al libro genealogico.

La risposta alla selezione in una popolazione per un determinato carattere dipende da due fattori basilari: l'ereditabilità del carattere ed il differenziale di selezione.

L'ereditabilità espressa in termini percentuali è una misura del grado in cui un dato carattere può essere influenzato dalla genetica; tanto più è alta l'ereditabilità di un carattere, tanto più facile è migliorarlo per mezzo della selezione. Sfortunatamente, la fertilità ha ereditabilità bassa ed è molto influenzata dall'ambiente, pertanto è difficile migliorarla con la selezione.

Il differenziale selettivo, invece, è influenzato dall'intensità di selezione, dalla variabilità genetica e dal numero dei caratteri considerati da selezionare. Applicando un'elevata intensità di selezione, cioè utilizzando per la riproduzione solo pochi individui che presentano i più elevati valori produttivi, è possibile ottenere, per i caratteri con sufficiente grado di ereditabilità, elevate risposte alla selezione.

La selezione può essere fatta a "tandem", cioè si può migliorare progressivamente un singolo carattere fino ad un certo limite, dopodiché si sceglie un altro singolo carattere da migliorare e così via; in alternativa, si può usare un indice selettivo che permette una selezione contemporanea per una combinazione di caratteri, ponderati in modo differenziale a seconda della loro importanza. Tuttavia, quanto più aumenta il numero di caratteri selezionati contemporaneamente, tanto più diminuisce il risultato selettivo nei riguardi di ognuno di essi.

L'indice di selezione è un indice composto il cui obiettivo è quello di valorizzare il più possibile i soggetti portatori di "valore aggiunto" rispetto ad uno qualsiasi degli elementi che contraddistinguono l'indice (Bianconero, 2001).

Combinare assieme caratteri diversi, però, obbliga a fare i conti con le correlazioni genetiche che esistono fra i caratteri, e cioè con la quota di geni che codificano in comune, per esempio, sia per latte che per grasso e proteina. Le correlazioni più critiche sono quelle negative, quelle cioè in cui gli stessi geni che codificano per l'aumento di un determinato carattere codificano anche per la diminuzione dell'altro. Se l'obiettivo è migliorare contemporaneamente la quantità e la qualità del latte, per esempio, la correlazione genetica negativa fra latte e percentuale di grasso e proteina fa sì che non si possa ottenere qualità semplicemente mirando alla quantità, ma occorrerà studiare l'equilibrio più appropriato fra i caratteri per migliorare la popolazione nella direzione ottimale.

L'ANAFI nel 1993 ha adottato un indice composto (ILQM) derivante dall'ILQ (Indice Latte Qualità) più l'ICM (Indice Complessivo Mammella), con l'obiettivo di costruire una mammella funzionale.

Nel 2000 è stato prodotto l'indice composto per migliorare la funzionalità di arti e piedi (IAP) e nel 2001 è iniziato un percorso finalizzato alla longevità funzionale ed alle cellule somatiche. Ma è nel 2002 che viene elaborato il nuovo indice di selezione della razza Frisona Italiana, il PFT (Produttività, Funzionalità e Tipo), combinando in modo appropriato qualità del latte e funzionalità, con un rapporto tra produzione e funzionalità di 59:41.

Nel 2009 è stata apportata un'ulteriore novità all'indice di selezione nazionale, riducendo del 10% il peso della produzione a favore della fertilità, incrementando in tal modo i caratteri funzionali che rivestono una grande importanza per l'allevatore. In Italia, infatti, l'indice fertilità ha un peso del 10%, tra i più alti a livello internazionale e secondo solo alla Francia (Cassandro and Penasa, 2010).

Sulla base di questo indice, si calcolano la classifica ed il rank ufficiale che divide la popolazione indicizzata in percentili e va da 0 a 99. Il rank 99 identifica il miglior 1% dei tori e delle vacche. Dal dicembre 2011 il rank 98, cioè il miglior 2% della popolazione, è il limite ufficiale per l'autorizzazione dei tori all'utilizzo in fecondazione artificiale.

I sistemi di calcolo degli indici genetici si sono sempre più evoluti fino ad arrivare agli attuali modelli Test Day Model, che forniscono una grande quantità di informazioni dettagliate sulla produzione e sono in grado di stimare le curve per ogni singola lattazione.

Nel frattempo, si sono ampliati sempre più i caratteri oggetto di selezione, dalla sola quantità di latte ai contenuti in grasso e proteine, alla morfologia e, negli ultimi anni, ai caratteri funzionali.

Per accelerare il processo selettivo vengono oggi usati, sia la fecondazione artificiale con il congelamento del materiale spermatico che consente un ampio uso di tori provati miglioratori, sia il trapianto embrionale che rende possibile la diffusione ad un maggior numero di soggetti di caratteri positivi del patrimonio genetico delle migliori bovine.

Maggiore è il numero di figli di un riproduttore, maggiore è la sua possibilità di influire sul patrimonio genetico della popolazione; quindi, anche per caratteri che si manifestano solo nelle femmine, come ad esempio la produzione di latte, conviene realizzare il lavoro di selezione sulla linea maschile.

La scelta dei futuri riproduttori da destinare alla fecondazione artificiale è un momento importante in un programma di miglioramento genetico. Nel caso dei bovini da latte, tali scelte vengono effettuate sulla base dei risultati ottenuti attraverso le prove di progenie o progeny test.

Eeguire la prova di progenie dei tori da latte implica l'impiego, tramite la fecondazione artificiale, del toro in prova su di un certo numero di vacche distribuite in diversi allevamenti ed il controllo della produzione delle sue figlie alla loro prima lattazione. Le figlie primipare del toro da valutare vengono, quindi, sottoposte a valutazione morfologica e funzionale e messe a confronto con le figlie coetanee di altri tori dello stesso allevamento o di allevamenti in condizioni omogenee, al fine di ridurre l'incidenza della varianza ambientale.

Per effettuare correttamente le prove di progenie è necessario:

- avere a disposizione numerose aziende con un numero di capi consistente poiché si consiglia di utilizzare tori in prova per il 20-30% delle coperture;
- che le bovine da fecondare con i tori in prova rappresentino un campione assolutamente casuale della popolazione;
- controllare un numero sufficiente di figlie per ogni toro.

Un torello viene avviato alle prove di progenie sulla base di un indice Pedigree, cioè di una previsione basata sull'indice del padre e della madre; attraverso le prove di progenie si andrà, poi, a verificare la bontà di tale previsione.

Al raggiungimento della pubertà, i riproduttori che superano la preselezione vengono sottoposti al prelievo del seme, con frequenza gradualmente crescente e rapportata all'età dell'animale in modo da non pregiudicarne lo sviluppo. Generalmente, questa fase inizia dopo il primo anno di vita del torello.

Si definiscono "tori ufficialmente provati" quelli che hanno almeno 30 figlie effettive in 30 allevamenti, con 120 giorni di lattazione e l'80% di attendibilità.

Da quanto detto, è evidente che la distribuzione commerciale del seme di un toro ha inizio diversi anni dopo la sua nascita: nel primo anno il riproduttore è sottoposto alla preselezione, entro il 15° mese, le dosi di seme prelevate sono distribuite per l'inseminazione e le figlie nasceranno in media al secondo anno di vita del toro.

Considerata la precocità delle razze da latte, con un'età media di circa 30 mesi al primo parto, la raccolta dei dati inizierà dopo circa tre anni e mezzo di vita del toro, ma l'indice genetico sarà formulabile solo al completamento della prima lattazione. Il seme del toro sarà perciò commercializzato non prima dei cinque anni dalla sua nascita ed, in genere, si protrae anche dopo la sua morte, fino all'esaurimento delle scorte, quando l'indice di miglioramento si presenta particolarmente alto.

E' evidente che più soggetti si mettono in prova, maggiori saranno le probabilità di individuare il toro con la giusta "combinazione" genetica.

Nello scelta del toro, prima fondamentale attenzione da osservare è che esso sia miglioratore per la produzione di latte; se abbiamo più riproduttori equivalenti per questo carattere, daremo la preferenza al toro capace di migliorare la percentuale di grasso o di proteine del latte, o i tratti morfologici deboli della nostra bovina.

L'ANAFI già da parecchi anni mette a disposizione dei propri associati lo strumento del Piano di Accoppiamento che nel 2009 si è rinnovato con il nuovo programma WebPac. Tra gli obiettivi principali di WebPac, oltre all'utilizzo di tutti i dati genetici e fenotipici dell'azienda per la scelta dei tori e all'inserimento dei caratteri funzionali nei criteri di accoppiamento, c'è sicuramente quello di una verifica del corretto livello di consanguineità della mandria e delle azioni che permettano di poter fare miglioramento genetico senza aumentare il livello di inbreeding.

Il problema del progeny test è, però, quello dei costi e mettere in prova di progenie un toro può essere considerato un vero e proprio investimento.

Tuttavia, il sistema tradizionale delle “prove di progenie” rappresenta oggi un metodo di selezione sempre meno utilizzato; la percentuale di fecondazioni con tori in prova di progenie è, infatti, calata in Italia negli ultimi quattro anni dal 17% all' 8%.

La soluzione ideale sarebbe quella di conoscere esattamente quali geni sono presenti nel DNA di un determinato soggetto e, soprattutto, sapere che cosa regolano tali geni.

A tale scopo, da dicembre 2011, la genomica, branca della biologia molecolare che si occupa dello studio del genoma (patrimonio genetico) degli organismi viventi, è diventata uno degli strumenti selettivi al servizio degli allevatori di Frisone Italiana.

La selezione genomica consiste nella scelta degli animali miglioratori in base ad una misurazione del potenziale genetico basato su una quantificazione di ciò che sta scritto nel loro DNA. Oggi è, quindi, possibile estrarre il DNA e quantificare il valore genetico che il soggetto ha ereditato dal padre e dalla madre, con una accuratezza del 70%, a partire da campione di pelo, sangue o tessuto.

Questo strumento permette ai tecnici dei centri di fecondazione artificiale di selezionare con maggiore efficacia non solo i padri e le madri dei tori ma anche gli stessi vitelli nati dal loro accoppiamento, poiché è possibile scegliere quelli che davvero hanno ereditato dei geni “desiderabili” per la selezione.

Attualmente si eseguono ancora le classiche “prove di progenie”, sottoponendo però solo i tori valutati genomicamente, appartenenti ad un rank più basso (commercialmente meno interessanti). La genomica, dunque, permette di avere a disposizione, oltre ai tradizionali tori provati con molte figlie in tanti allevamenti, anche dei tori altamente selezionati, e dei “giovani tori genomici” che, non avendo figlie, sono valutati esclusivamente sulla base della caratterizzazione del

profilo dei marcatori genetici di cui sono portatori. La raccolta dati delle progenie dei tori "genomici" ha la funzione di validare i dati della lettura genomica dei padri, aumentandone l'attendibilità.

La conoscenza dei loci del genoma bovino e dei loro effetti è destinata ad aumentare nel corso dei prossimi anni, fino a prevedere la possibilità di conoscere l'effetto dell'intero genoma per tutte le razze bovine di interesse zootecnico (Cassandro and Penasa, 2010).

1.1.6 Caratteristiche Produttive

In tutta la storia della Frisona, è da tener presente un principio molto importante: il carattere pezzato nero è strettamente legato ad un corredo genetico particolarmente favorevole ad esprimere buone produzioni di latte. Questa particolare combinazione, una volta rilevata dagli allevatori olandesi, consentì di selezionare il bestiame in maniera semplicissima, anche in un'epoca in cui le conoscenze scientifiche erano ben lontane da quelle di oggi, in quanto era sufficiente imporre il carattere bianco-nero per avere automaticamente una migliore produzione di latte (Fusco, 1990).

Una vacca Frisona è una "macchina biologica", che trasforma i foraggi in latte, il cui potenziale genetico consente di esprimere produzioni medie molto alte rispetto ai potenziali genetici di altre razze bovine. E', però, nel contempo una "macchina" che esprime le sue migliori prestazioni in condizioni ambientali ottimali, utilizzando razioni alimentari poco rustiche, adeguatamente ricche e bilanciate.

Introdurre capi di razza Frisona in allevamenti caratterizzati da un'alimentazione a base di foraggi grossolani e di basso valore nutritivo porta la bovina ad esprimere quote di produzione di latte più basse, in alcuni casi più basse anche di quelle di capi di razze non pregiate ma buoni trasformatori di foraggi poveri (Fusco, 1990).

Si tratta di animali precoci, che raggiungono la maturità sessuale verso gli 8-10 mesi, con spiccato habitus respiratorio ed attitudine ad elevate produzioni di latte; producono in media 7.500 kg l'anno, con punte di oltre 19.000 kg, a buon titolo di grasso e proteine.

Dall'analisi dei dati statistici riguardanti la razza Frisona (Fig. 2), appaiono molto positivi i dati di produzione delle vacche iscritte nel 2014 in Italia. Il forte aumento della media di produzione di latte ha fatto registrare un +2% e quasi 180 kg in più rispetto al 2013 con una media per capo che si attesta a 9.472 kg (quasi 95 quintali per vacca).

Nonostante un così sensibile aumento della quantità di latte, è importante segnalare che questo incremento non ha avuto conseguenze sull'equilibrio complessivo dei dati fenotipici se non per piccole differenze nei contenuti di grasso e proteine, percentuali che peraltro sono molto influenzate dall'andamento stagionale.

Questi dati fenotipici dimostrano, quindi, ancora una volta, l'importanza che riveste il miglioramento genetico ed i risultati che si possono raggiungere attraverso l'utilizzo di obiettivi di selezione mirati a soddisfare le esigenze degli allevatori (ANAFI, 2016).

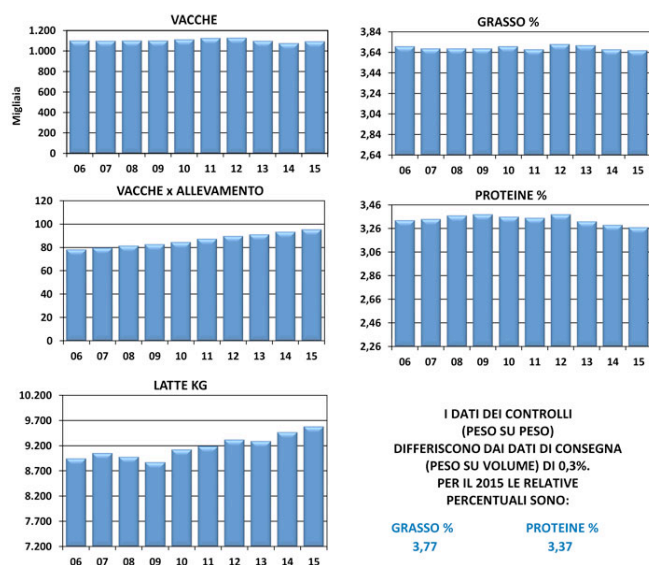


Fig. 2 Medie di Produzione di Latte/Grasso/Proteine in Vacche Frisone Controllate (ANAFI 2015)

1.1.7 Caratteristiche Riproductive

Così come in tutte le specie animali, anche le bovine, una volta raggiunta la maturità sessuale (attorno al 10° mese di vita), presentano un'attività riproduttiva di natura ciclica, con estri che si ripetono regolarmente, in condizioni ambientali ed alimentari ottimali, ad intervalli di 21 giorni circa, con oscillazioni fra 18 e 24 giorni.

L'estro nella vacca è di durata relativamente breve: dura in media 18 ore, con oscillazioni fra 4 e 24 ore. L'ovulazione avviene circa 30 ore dopo l'inizio dell'estro, ossia dopo che l'estro ha avuto termine. La fecondazione dell'ovulo ha luogo nell'ovidutto; la blastocisti giunge nell'utero al quinto giorno circa e la gravidanza dura circa 283 giorni.

L'intervallo fra il parto e la prima ovulazione varia enormemente in relazione alla razza della bovina, all'alimentazione, alla produzione di latte ed alla stagione. La prima ovulazione dopo il parto spesso non è accompagnata da manifestazioni comportamentali tipiche dell'estro, perciò si ha un calore silente.

Per avere una produzione ottimale sia di latte che di vitelli, l'obiettivo dovrebbe essere quello che ogni bovina producesse un vitello vivo e vitale ogni anno per avere un periodo interparto di 365 giorni.

Per raggiungere questo scopo il periodo più critico è quello del post parto. La rapida e fisiologica involuzione dell'utero e la ripresa della normale attività ovarica devono verificarsi in breve tempo.

A ciò deve seguire un accurato riconoscimento dell'estro, quando viene utilizzata la fecondazione artificiale o la monta controllata, ed un alto tasso di concepimento. Tutto ciò è possibile solo in presenza di ottimali condizioni di salute e conduzione degli animali.

Nelle aziende di bovine da latte con numero di capi maggiore a 50-70 vacche, i livelli di fertilità media sono spesso ben lontani da quanto viene normalmente ritenuto fisiologico. Nonostante l'interparto dovrebbe essere di 380 giorni (circa 12-13 mesi), l'intervallo parto-1° fecondazione di 70 giorni, l'intervallo parto-concepimento di 90 giorni ed il tasso medio di concepimento del 70-80% (Weaver, 1986; 1992; Williamson, 1987; Fetrow et al., 1990; Sali, 1996), si è riscontrato che tali valori risultano molto inferiori alla norma degli attuali allevamenti, nonostante gli sforzi degli operatori del settore.

Infatti, già circa 35-40 anni fa, valori di interparto maggiori a 13 mesi, parto-concepimento di 120-130 giorni, fertilità al 1° servizio del 46-47% ed efficienza del rilevamento degli estri del 43% erano riportati da ricercatori americani (Tong et al., 1979; Spalding et al., 1975; Fetrow et al., 1988).

Nell'ultimo quarto di secolo le cose non sono molto cambiate: Washburn e colleghi (2000) riportano che, a fronte di un aumento della consistenza media di capi/azienda e della produzione di latte/vacca, l'intervallo parto-concepimento è passato da 127 a 161 giorni ed il tasso di concepimento si è abbassato dal 54% al 32%. Questo progressivo calo della performance riproduttiva è dovuto a molti fattori, e sicuramente l'aumento del numero medio di animali/azienda e l'aumento della produzione/capo creano delle condizioni ambientali, manageriali ed organiche per cui le bovine sono maggiormente sensibili agli agenti stressanti, e la riproduzione è resa più complicata o inibita, come risultato dello stress (Romagnoli, 2003).

Inoltre, bovine selezionate per l'alta produzione manifestano caratteristiche di crescita follicolare e di produzione endocrina inferiori alla norma (Nebel e McGilliard, 1993). Washburn e coll. (2000) suggeriscono anche che, a prescindere dalle correlazioni genetiche tra la produzione latte e la fertilità, il modo in cui viene assegnato il punteggio per la produzione latte ai tori in produzione può in maniera indiretta favorire le bovine con minor fertilità. Infatti, nelle bovine che concepiscono più tardi, la produzione latte tende ad essere più elevata, il che favorisce la selezione della bovina stessa e del toro, di fatto privilegiando vacche che potrebbero essere potenzialmente predisposte ad un interparto prolungato e, quindi, ad una minore efficienza riproduttiva.

Secondo quanto pubblicato da una delle banche dati della Dairy Herd Improvement Association degli Stati Uniti, il DHI-Provo, su di un totale di 2.325 allevamenti di Frisone con produzioni medie comprese tra 7.200 e 10.600 kg, il giorno medio in latte è compreso tra 199 e 208 giorni, l'intervallo parto-1° fecondazione è di 79-95 giorni, l'intervallo parto-concepimento 144-

155 giorni, il tasso di concepimento al 1° servizio è 42-54%, il numero di inseminazioni/concepimento per le vacche gravide è 1,9-2,4, la percentuale dei calori rilevati è 43-52%, l'interparto è 13.9-14.1 mesi e l'età media al parto è di 26-28 mesi (Romagnoli, 2003).

Come si può notare, la maggior parte di questi dati si discosta molto da quanto normalmente ritenuto fisiologico per aziende di bovine da latte ad alta produzione.

1.2 Importanza dell'Efficienza Riproduttiva

Tra i diversi fattori che concorrono a determinare l'efficienza economica di un'azienda zootecnica da latte, l'aspetto riproduttivo gioca un ruolo fondamentale.

Nel migliore dei casi, una vacca è in grado di produrre un solo vitello all'anno, pertanto la riproduzione nei bovini dà risultati inferiori rispetto ad altre specie di interesse zootecnico, come ad esempio suini ed ovini.

L'efficienza riproduttiva, intesa come capacità di una bovina di rimanere gravida e di produrre il maggior numero di vitelli vivi e vitali nel più breve tempo possibile, è un parametro di eccezionale interesse tecnico-economico e dipende da numerosi fattori; tra questi, le condizioni igienico-sanitarie degli animali, il livello nutritivo, la razza, l'età e le tecniche riproduttive adottate (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990).

In particolare, la fertilità determina la produzione di latte, il numero di vitelli nati e quello degli animali da riproduzione venduti; influenza, inoltre, i costi di alimentazione, condizionando l'efficienza alimentare degli animali in produzione e la destinazione delle risorse per la rimonta.

La fertilità degli allevamenti ha anche effetti sul sistema di selezione ed influisce sulla velocità di miglioramento genetico della popolazione (Pirlo e Speroni, 1999).

L'efficienza riproduttiva può essere quantificata attraverso semplici calcoli con indici o parametri diversi, per mezzo dei quali è possibile istituire confronti e formulare giudizi. Per calcolare questi parametri, però, è indispensabile basarsi su precise registrazioni degli eventi riproduttivi delle bovine.

Gli indici che consentono di monitorare l'andamento della fertilità sono molti, ma non tutti rivestono la stessa importanza ai fini della gestione. Non esiste l'indice ideale, né si può pensare di controllare l'andamento della fertilità con un solo parametro, in quanto esistono indici che consentono di monitorare unicamente o principalmente la fertilità globale, indici per l'efficienza dell'inseminazione artificiale e indici per l'efficienza del rilevamento degli estri (Tab. 1).

Dal punto di vista biologico, il numero dei parti rappresenta forse la misura più valida della fertilità; quest'ultima ha come parametro il numero di vitelli nati per 100 interventi fecondativi, ma

a livello economico viene di norma stimata in base all'intervallo *interparto*, cioè al periodo che intercorre tra due parti successivi.

Questo parametro può variare a seconda della produzione di latte ed è inversamente correlato con essa: se l'interparto aumenta, la produzione lattea cala.

Efficienza Riproduttiva Complessiva	Interparto Parto-Concepimento % di bovine gravide Stato riproduttivo dell'allevamento % di bovine vuote da + di 150 gg % di bovine eliminate per ipofertilità % della mandria che partorisce nell'anno % di concepimento Giorno Medio in Latte
Efficienza dell'Inseminazione	% di bovine gravide al 1° servizio N° di IA/gravidanza Probabilità media di gravidanza Grafico cumulativo % di "Repeat Breeders" Fertilità del toro Abilità del tecnico di IA
Efficienza del Rilevamento degli Estri	Parto -> 1° Calore Parto -> 1° Servizio % di bovine gravide alla diagnosi Calori inseminabili effettivamente rilevati N° di 1° IA entro 24 gg dalla fine dell'AV Media degli interventi interestrili Distribuzione degli interventi interestrili

Tabella 1 *Suddivisione dei principali indici riproduttivi per il monitoraggio della fertilità in aziende di bovine da latte a seconda del parametro controllato (Romagnoli, 2003)*

Per bovine con una produzione di latte molto alta può essere accettabile un intervallo interparto più lungo di 12 mesi. Infatti, è stato dimostrato che, in aziende di bovine ad alta produzione, un interparto di 13 mesi può consentire guadagni maggiori di un interparto di 12 mesi (Farin e Slenning, 2001); se, però, l'interparto aziendale è molto superiore a 13 mesi, l'investimento necessario per riportarlo ad un valore comunemente ritenuto accettabile può incidere molto negativamente sul bilancio, al punto che può essere consigliabile mirare ad un risultato di compromesso (Farin e Slenning, 2001).

La perdita in denaro è causata da fattori quali le minori entrate per la produzione di latte, la diminuzione nella vendita di vitelli per bovina ed un aumento dei costi di ammortamento dell'allevamento.

Nonostante ciò, è opportuno sottolineare che un'azienda che riesca a mantenere un interparto di 12,5 o 13 mesi è molto spesso un'azienda ben gestita, il cui bilancio economico è largamente

positivo, per cui l'efficienza riproduttiva si configura sicuramente come un segnale di gestione accurata ed efficiente (Romagnoli, 2003).

L'interparto può essere diviso in due periodi: l'intervallo parto-concepimento ed il periodo di gravidanza. Poiché la gravidanza ha una durata pressoché costante, da 280 a 285 giorni (la variazione è dovuta soprattutto a fattori genetici sia della madre che del padre), l'intervallo parto-concepimento ha un'influenza determinante sulla lunghezza dell'interparto.

L'*intervallo parto-concepimento* rappresenta il periodo che va dal parto fino all'instaurarsi di una nuova gravidanza, perciò equivale al numero di giorni necessari per ingravidare una bovina dopo il parto. Nelle bovine da latte in genere si attende il 2° calore per la prima inseminazione, a 60 giorni circa dal parto; in pratica, però, le diverse forme patologiche che possono colpire la sfera genitale dopo il parto e la mancata rilevazione dei calori aumentano l'intervallo ad almeno 85-90 giorni. Per ottenere un interparto di 365 giorni, l'intervallo parto-concepimento non deve comunque oltrepassare gli 80-85 giorni. Inoltre, entro certi limiti, le pluripare presentano un intervallo parto-concepimento più breve rispetto alle primipare.

In Italia, il declino dell'efficienza riproduttiva bovina è dimostrato dal fatto che ormai si sono superati i 160 giorni di intervallo parto-concepimento per la razza Frisona (AIA, 2009), con un incremento annuo previsto di +2,5 giorni.

Al fine di tenere nota della performance riproduttiva dell'azienda, l'intervallo parto-concepimento è, a sua volta, suddiviso in due periodi: l'intervallo parto-primario intervento fecondativo e l'intervallo primario intervento fecondativo-concepimento; il primo dipende, come già detto, dalla ripresa dei cicli ovarici dopo il parto, dal verificarsi dell'estro e dal suo riconoscimento, mentre il secondo dalla capacità di concepire e di portare avanti la gravidanza dopo l'intervento fecondativo, dalla continuazione dei cicli ovarici e dal corretto riconoscimento dell'estro in quelle vacche che non restano gravide al primo intervento (Peters e Ball, 1992). Naturalmente, la capacità di concepire dipende anche dalla qualità del seme impiegato nell'inseminazione e dalla tecnica usata.

In riferimento a quanto detto, si deduce che individuare le cause di un prolungamento dell'intervallo interparto può essere estremamente difficile.

Un altro importante parametro aziendale di fertilità è il *conception rate* (numero di servizi/concepimento), che si ottiene dividendo il numero di interventi di inseminazione realizzati sulle bovine dell'allevamento in un certo periodo per il numero di gravidanze accertate in seguito a tali servizi. Si tratta di un parametro importante perché influenza direttamente l'intervallo parto-concepimento e, quindi, l'interparto. Valori ottimali sono quelli attorno a 1,3 servizi per

concepimento, mentre valori superiori a 1,6 richiedono un esame critico della situazione riproduttiva dell'allevamento.

Un parametro simile è il *calving rate*, cioè il numero di servizi/vitello nato vivo, che tiene conto anche della mortalità embrionale e fetale intervenuta dopo l'accertamento della gravidanza. La mortalità prenatale fa aumentare questo indice rispetto al precedente: un valore pari a 1,6 indica, in questo caso, una situazione ottima, ma spesso nella pratica sono necessari ben 2 servizi per ogni vitello nato vivo (Peters e Ball, 1992).

La *% di concepimento* è esattamente il reciproco del conception rate, vale a dire il rapporto fra il numero di gravidanze accertate a 40-60 giorni, ed il corrispondente numero di interventi, espresso in percentuale; valori buoni sono attorno al 75%. Bisogna tener conto che, nelle inseminazioni successive alla prima, la percentuale di concepimento si riduce sensibilmente (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990).

La *% di non ritorno*, invece, indica il numero di bovine, su 100 inseminate, che non ritorna in calore dopo 21 giorni o entro 45 giorni. Il parametro può essere utile per valutare la capacità fecondante dei tori aziendali o del seme congelato, soprattutto per confronti nell'ambito dell'allevamento. Percentuali di non ritorno attorno all'80% sono da considerarsi ottime, mentre sono insufficienti valori pari o inferiori al 50%.

Anche in condizioni ideali, quando il 100% delle bovine è "normale" e gli estri vengono rilevati al 100%, non è detto che si abbia il 100% dei parti. Nel migliore dei casi, solo il 60-70% delle fecondazioni si conclude con la nascita del vitello e la grande maggioranza delle cause di insuccesso si ha prima del secondo trimestre di gravidanza. Questo è dovuto in parte al mancato concepimento ma in parte anche alla mortalità embrionale o a quella fetale (Peters e Ball, 1992).

Un altro parametro interessante è, quindi, l'*incidenza degli aborti tardivi* (oltre il 7° mese di gravidanza) sul totale dei parti, normali e prematuri. Se in un allevamento si rilevano valori maggiori rispetto a quelli medi di razza (Frisona circa 40%), è necessario intervenire, poiché gli aborti sono sempre svantaggiosi; infatti, non sempre la bovina inizia una regolare lattazione ed, inoltre, bisogna riprendere con le inseminazioni che spesso forniscono risultati, in termini di concepimento, inferiori alla norma.

Per concludere, negli ultimi decenni vi è stato un grandissimo aumento della produzione di latte per vacca ed è opinione assai diffusa che vi sia un'associazione tra l'incremento della produttività ed il peggioramento dei parametri riproduttivi; i parametri che esprimono la fertilità hanno un'ereditabilità piuttosto bassa (Martin, 1992) e, di conseguenza, la selezione non sembra possa essere utilizzata per ottenere miglioramenti significativi dell'efficienza riproduttiva.

Laben et al. (1982) hanno mostrato che un buon management nella rilevazione dei calori, nella tempestività degli interventi fecondativi ed un'alimentazione adeguata possono promuovere un miglioramento sia degli indici di fertilità che di produttività.

1.3 L'Inseminazione Artificiale

Per "inseminazione" si intende l'immissione del materiale seminale nelle vie genitali femminili; ciò può verificarsi attraverso l'inseminazione naturale (salto o monta) o l'inseminazione artificiale (o strumentale), in cui l'operatore deposita il contenuto di una paillette in cervice o appena all'interno dell'utero (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990).

1.3.1 Cenni storici e generalità

Con il diffondersi delle monte naturali pubbliche, nel XVIII secolo, gli allevatori, convinti di poter utilizzare dei buoni riproduttori di maggior valore rispetto a quelli dei quali potevano disporre in stalla, adottarono con maggior frequenza questo tipo di monta, abbandonando sempre più l'uso del toro in stalla. Questo fenomeno fu anche favorito dal fatto che l'utilizzazione della monta pubblica consentiva all'allevatore di non dover sopportare i costi dell'allevamento del toro.

L'aumento della popolazione bovina che faceva capo alle stazioni di monta comportò, però, un maggior diffondersi di patologie legate alla sfera genitale, come tricomoniasi, campilobatteriosi, vibriosi, leptospirosi e brucellosi. Bastava, infatti, che una vacca ammalata infettasse un toro operante in monta pubblica perché questo diffondesse la malattia in tutte le vacche che successivamente venivano portate al salto, con un espandersi della patologia a macchia di leopardo che, dopo poco tempo, diveniva generale sul territorio.

Dato il livello delle conoscenze veterinarie che non consentiva di diagnosticare precocemente lo stato di malattia di un toro e la mancanza di cure efficaci, il fenomeno assunse aspetti di gravità notevole ed il danno per gli allevatori era praticamente senza rimedio. Una vacca ammalata, infatti, specie se la malattia aveva come effetto l'aborto, se non era curabile andava abbattuta, con un notevole aumento dei costi di stalla (Fusco, 1990).

Contro il diffondersi di malattie della sfera genitale cominciò, dunque, ad affermarsi la pratica della fecondazione artificiale, che consisteva nell'eliminazione del rapporto fisico tra vacca e toro e, quindi, nell'impossibilità di contagio per i due soggetti.

Oggi solo in pochi casi si può avere una trasmissione dell'agente patogeno tramite lo sperma; questo inconveniente può essere ovviato utilizzando tori esenti da malattie e sottoposti ad uno

scrupoloso controllo dello stato sanitario, e mediante l'aggiunta di antibiotici al materiale spermatico.

Le prime prove di fecondazione artificiale risalgono al 1777 con Malpighi, ma il primo esperimento documentato e verificato scientificamente fu attuato nel 1783 dal celebre studioso naturalista Abate Lazzaro Spallanzani, che dimostrò per la prima volta come fosse possibile ottenere la fecondazione e la gravidanza di una cagna in calore senza l'intervento diretto del maschio, iniettandole direttamente in vagina il liquido spermatico raccolto dal maschio.

Dopo quasi un secolo, altri studiosi ripeterono l'esperimento dello Spallanzani, applicandolo ad altre specie. La tecnica di fecondazione artificiale assunse, però, interesse zootecnico soltanto all'inizio del secolo scorso, ad opera dei ricercatori sovietici capeggiati da Ilia Ivanovič Ivanov, che, mettendo a punto la vagina artificiale per i più importanti animali domestici, ha dato il via alla grande diffusione della fecondazione artificiale (F.A.).

In Italia, invece, la F.A. venne introdotta negli anni '30, soprattutto ad opera del professore Telesforo Bonadonna, che organizzò il primo centro per la fecondazione artificiale per le specie di maggior interesse zootecnico, presso la Cascina Cravino di Pavia.

Nel 1949 a Cambridge, Polge e collaboratori provarono la congelabilità del materiale spermatico a -79°C con CO_2 solida ed alcool. Il fattore fondamentale è stato la scoperta che il glicerolo può essere usato per proteggere gli spermatozoi bovini dai danni da congelamento.

A partire dal 1963 si è poi sperimentato l'uso dell'azoto liquido per una conservazione a temperatura ancora più bassa, contribuendo al definitivo progresso del metodo. Questo significa che, con trattamenti accurati, il seme può essere conservato per periodi di tempo molto lunghi.

Il seme congelato, in origine, è stato conservato in ampolle di vetro o talvolta in pastiglie; un perfezionamento nella conservazione del seme congelato è stato messo a punto in Belgio e si è diffuso grazie al francese Cassou, che, durante il V Congresso Internazionale sulla riproduzione animale, svoltosi a Trento nel 1964, ha presentato un nuovo metodo di confezionamento del materiale spermatico in paillettes. Nel medesimo congresso, i giapponesi H. Nagase e T. Neiwa proposero anche l'originale metodo di confezionamento in pellets.

Attualmente la maggior parte del materiale seminale è confezionato in paillettes e conservato in azoto liquido, poiché queste per la loro praticità hanno incontrato e incontrano tuttora molto successo ed ampia diffusione (Spelta e Corbella, 2015).

Oggi, l'utilizzo della fecondazione artificiale ha raggiunto nei Paesi a zootecnia avanzata una percentuale particolarmente elevata (Tab. 2), mentre nei paesi in via di sviluppo, il basso livello della tecnologia e la scarsità delle comunicazioni hanno ridotto la diffusione dei servizi di F.A.. Ciò, comunque, permette a questi Paesi di avere un enorme potenzialità di sviluppo della pratica; nei

Paesi asiatici, ad esempio, il numero di vacche fecondate artificialmente è passato da meno di 2 milioni a 8 milioni nel giro di dieci anni.

La progressiva crescita degli interventi di F.A. conseguente anche all'entrata in servizio degli operatori pratici e la contemporanea diminuzione del numero delle vacche hanno portato al raddoppio dal 1974 al 1994 del numero totale delle bovine inseminate artificialmente.

Israele	99%
Finlandia	99%
Giappone	96%
Repubblica Ceca	94%
Bulgaria	92%
Danimarca	90%
Nuova Zelanda	90%
Norvegia	90%
Polonia	87%
Francia	75%
Germania	70%
Russia	70%
Olanda	70%
Australia	70%
Gran Bretagna	65%
Canada	60%
Usa	60%
Irlanda	55%

Tabella 2 *Percentuale di utilizzo della F.A. sul totale degli animali fecondati (National Association of Animal Breeders, 1992)*

Per la razza Frisone Italiana, dal 1974 al 1994, il tasso di applicazione della F.A. è passato dal 35% al 93% (Spelta e Corbella, 2015).

Nata come misura profilattica per evitare il diffondersi di patologie della sfera genitale, la fecondazione artificiale ha anche molti altri vantaggi da offrire all'allevatore.

Oggi l'aspetto di assoluta rilevanza per la fecondazione artificiale risulta essere la sua applicazione ai fini del miglioramento selettivo che ha portato ad elevati incrementi produttivi. Riproduttori provati di alto valore genetico possono essere impiegati estesamente in ogni parte del mondo, grazie anche alle attuali tecniche di conservazione.

La possibilità, infatti, di utilizzare il seme di un ottimo toro provato, sicuro miglioratore, del quale si conosce la capacità di miglioramento produttivo e morfologico, su un alto numero di bovine, comporta la possibilità di operare un miglioramento massale della produzione con una

velocità impensabile se si usasse la monta naturale; ciò permette anche di attuare un corretto accoppiamento e la riduzione delle difficoltà al parto.

Inoltre, la possibilità di conservare per anni migliaia di dosi di un toro, anche dopo la sua morte, consente di creare delle banche di seme alle quali attingere solo dopo che il valore genetico del toro è stato verificato sulla discendenza e se ne è potuta stabilire la capacità di trasmettere determinati caratteri, per particolari piani di selezione o per la conservazione di particolari razze di scarsa consistenza.

Generalmente l'allevatore, nella speranza di ottenere un buon materiale da rimonta, cerca di accoppiare le sue vacche, usando tori che siano complementari alle sue esigenze. E' ovviamente impensabile allevare tori in numero sufficiente a coprire tutte le possibili esigenze, perciò la F.A. risponde bene anche a questo problema.

Tra gli altri vantaggi della fecondazione artificiale vi sono una più sicura identificazione degli animali ed una migliore gestione dell'allevamento con registrazioni più accurate sulle operazioni di fecondazione e di parto, nonché un maggiore controllo della fertilità e della situazione ginecologica e sanitaria delle bovine.

Non è da trascurare, infine, il vantaggio pratico di eliminare il pericolo di incidenti mortali causati dai tori aziendali ed il costo di mantenimento di un toro in azienda. In quest'ultimo caso, anche se un allevatore non è interessato al miglioramento potenziale che si ha con l'uso di soggetti geneticamente superiori mediante l'impiego della fecondazione artificiale, egli può comunque trovare vantaggioso l'uso del servizio per il suo tornaconto economico.

Un toro può essere di costo elevato sia che lo si acquisti sia che lo si allevi e c'è sempre il rischio che esso risulti insoddisfacente e debba essere eliminato anzitempo; inoltre, un allevatore può non accorgersi che un toro non è fertile o è ipofertile fino a che non è stato testato per alcuni mesi con un gruppo di bovine, perciò mantenerlo sarebbe comunque un costo per il proprietario e, nella maggior parte dei casi, quel denaro sarebbe meglio spenderlo nell'acquisto di una bovina più produttiva.

1.3.2 Metodo Tradizionale di preparazione del seme

La diffusione della fecondazione artificiale ha imposto la presenza sul territorio di una struttura tecnica ben organizzata e costituita da:

- un centro di produzione del materiale seminale (centro tori), con annessi laboratori per il controllo e la preparazione delle dosi;

- una struttura per la distribuzione delle dosi di materiale seminale costituita da un centro di stoccaggio, uno o più centri di fecondazione artificiale e recapiti, ed una rete di distribuzione;
- strutture di stoccaggio aziendali o mobili in dotazione ai tecnici inseminatori;
- operatori pratici appositamente formati.

Con l'utilizzo del seme fresco, dato il suo limitato periodo di conservazione, l'organizzazione doveva essere particolarmente ramificata sul territorio ed i centri di produzione coprivano necessariamente una zona delimitata; l'affermazione del seme congelato ha permesso una semplificazione della struttura organizzativa svincolandola dal rapido trasferimento delle dosi prodotte dal centro di produzione al luogo dove queste devono essere utilizzate.

Schematicamente si possono distinguere cinque fasi di manipolazione del seme: raccolta, valutazione, diluizione, conservazione ed inseminazione.

1.3.2.1 Regime igienico, alimentare e sessuale del toro

Per realizzare un uso razionale del riproduttore è necessario scegliere un regime igienico ed alimentare che consenta di mantenere uno stato sanitario e nutrizionale più che soddisfacente, adattare il regime sessuale all'età ed al vigore dell'animale, ed infine eseguire correttamente la pratica della monta.

Nel nostro Paese dal 1985 i tori da adibire alla fecondazione artificiale devono obbligatoriamente uscire dai centri genetici gestiti dalle associazioni di razza. In questi centri i torelli permangono per circa 6 mesi e vengono sottoposti a numerosi controlli ed addestrati al prelievamento del seme.

Per quanto riguarda il regime igienico, il toro non deve essere tenuto alla posta, ma a stabulazione libera in un box di almeno 6-8 m², con lettiera pulita ed asciutta. Specie in età avanzata deve potersi muovere in un recinto o, se necessario, eseguire una sufficiente ginnastica funzionale, mediante il ricorso, ad esempio, ad apposite giostre (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990).

E' molto importante che la dieta sia equilibrata ed adeguata ai fabbisogni energetici, minerali e vitaminici, poiché gli squilibri alimentari e/o le carenze energetiche riducono lo sviluppo e l'accrescimento dei giovani animali e possono, quindi, causare un ritardo della pubertà. Inoltre, l'accrescimento deve apparire graduale, e quindi il livello nutritivo non dovrà mai essere elevato per evitare la tendenza all'ingrassamento, e la dieta non deve risultare troppo voluminosa per evitare la dilatazione dell'addome.

In genere, verso i 7-10 mesi di età il torello presenta l'istinto genesico e la produzione di seme è qualitativamente soddisfacente, anche se quantitativamente scarsa. Solo verso i 12-13 mesi di età

il seme possiede caratteristiche quali-quantitative adeguate, e può essere considerato normalmente fecondante; è, però, buona norma attendere ancora qualche mese prima di iniziare uno sfruttamento sessuale sistematico, per non correre il rischio di provocare fenomeni di frigidità o altri vizi.

Dai 12-13 mesi fino ai 2 anni è opportuno non superare i tre salti alla settimana, iniziando con gradualità, e solo intorno ai 3 anni si può arrivare ad un salto al giorno, avendo però cura di concedere ogni 2-3 settimane brevi periodi di riposo (3-4 giorni) per non compromettere la qualità del seme.

In molti casi, infatti, un regime sessuale molto intenso tende a provocare una diluizione dell'ejaculato, causando anche una riduzione della sua capacità fecondante (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990).

Tuttavia, queste indicazioni non hanno un valore assoluto, dato che l'energia sessuale può subire gravi variazioni individuali, ed è marcatamente influenzata dall'ambiente e dall'alimentazione. Nella pratica è, pertanto, opportuno regolarsi sul vigore dell'animale, concedendo al toro brevi periodi di riposo quando si constata che il salto non si compie con la normale rapidità ed energia, oppure si riscontra una caduta di fertilità del seme.

Va ricordato che sono negativi anche i lunghi periodi di inattività, poiché il materiale seminale che si accumula nell'epididimo può andare incontro a processi degenerativi.

1.3.2.2 Raccolta del seme

La raccolta di routine del seme di un toro di razza da latte comincia dopo che esso è stato provato nel lavoro di selezione, e può essere effettuata con quattro diverse tecniche: il metodo vaginale, il massaggio delle vescicole seminali, l'elettroeiaculazione ed il metodo parafisiologico.

Il metodo vaginale ha ormai solo un'importanza storica; agli albori della tecnica di inseminazione artificiale si faceva coprire la femmina e quindi si procedeva al prelievo dell'ejaculato dal fondo della vagina con vari sistemi. Fra gli svantaggi si possono ricordare le difficoltà pratiche connesse con il recupero, la contaminazione del materiale seminale da parte di microrganismi sempre presenti nel muco vaginale, ed infine la possibilità di trasmissione di malattie veneree durante il coito.

Il massaggio delle vescicole seminali è un metodo di prelievo normalmente poco usato, ed a cui si ricorre nel caso di tori che per diversi motivi, come l'età avanzata o zoppie, non sono in grado di saltare. L'operatore introduce la mano nel retto, lo svuota, individua inferiormente le vescicole seminali e le ampolle del dotto deferente e, mediante un opportuno massaggio, ne provoca lo svuotamento assieme alla fuoriuscita del materiale seminale dalla verga.

L'ejaculato così ottenuto presenta una concentrazione spermatica inferiore a quella del seme prodotto con il coito o prelevato con la vagina artificiale, ed il materiale seminale può risultare inquinato nonostante i lavaggi preliminari del prepuzio. Inoltre, il massaggio della flessura sigmoidea, sempre per via rettale, può a volte stimolare la protrusione del pene, ma esiste una notevole variabilità individuale fra i diversi tori.

Anche il metodo dell'elettroeiaculazione, così come il massaggio delle vescicole seminali, viene impiegato solo nel caso di tori che non sono in grado di saltare. L'eiaculazione viene stimolata per via rettale mediante una serie di scariche elettriche a basso voltaggio ed alto amperaggio; l'operatore, dopo aver svuotato il retto, vi introduce un elettrodo e pone l'altro elettrodo in corrispondenza della 4^a vertebra lombare. In genere, si ottiene l'erezione e, dunque, il seme non viene contaminato, ma presenta un maggior volume ed una minore concentrazione spermatica.

La maggior parte dei prelievi di seme oggi vengono eseguiti con il metodo parafisiologico, che consiste in una simulazione del coito in cui il toro è costretto ad eiaculare in una vagina artificiale, la quale riproduce le condizioni fisiologiche del coito naturale (calore, attrito tra il pene e la parete interna della vagina, compressione).

La vagina artificiale più comunemente utilizzata è costituita da un manicotto rigido al cui interno è inserita una camicia di lattice di gomma rivoltata alle due estremità e fissata in modo tale da formare un'intercapedine che viene riempita con acqua calda a circa 38°C; questa aiuta a dare la sensazione giusta ai tori, alcuni dei quali hanno preferenze molto precise da questo punto di vista.

L'imboccatura della vagina artificiale viene spalmata con materiale lubrificante per favorire lo scorrimento del pene e quindi protetta da un triangolo di gommapiuma a perdere, che ha la funzione di evitare inquinamenti. All'altra estremità, invece, si applica, tramite un cono di gomma, il bicchierino destinato a raccogliere il materiale spermatico eiaculato dal toro; anche il bicchierino è provvisto di una doppia parete contenente acqua a 38°C, per evitare che il seme subisca sbalzi o shock termici durante la raccolta.

L'isolamento attorno alla provetta la protegge dai danni e mantiene il seme appena al di sotto della temperatura corporea fino a che esso raggiunge il laboratorio per essere sottoposto ai vari trattamenti. Tutta la vagina artificiale viene, infine, ricoperta con una custodia che ha la funzione di proteggere lo strumento dalle radiazioni e dagli urti.

Per ciascun prelievo si usa una vagina artificiale sterile appena preparata e posta in un termostato sino al momento dell'uso. I particolari di una tipica vagina artificiale sono mostrati nella Fig. 3.

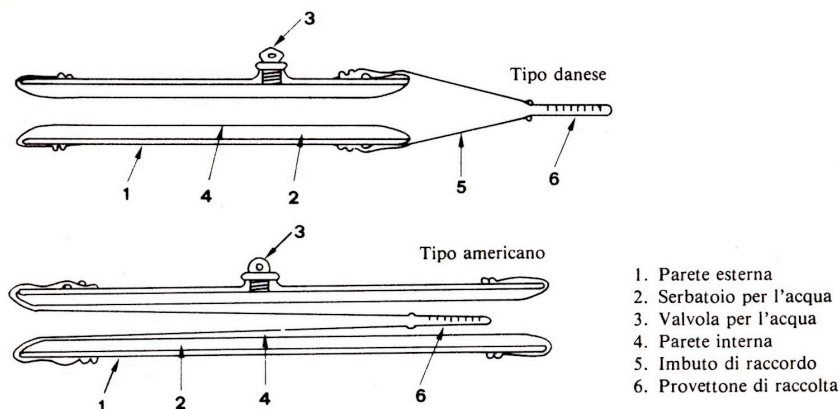


Fig. 3 *Tipi di vagina artificiale (Laing, 1979)*

Dopo aver effettuato, prima del prelievo, alcune stimolazioni, consistenti nell'esecuzione di 3-5 false monte con contenimento del soggetto, al toro è permesso di montare un animale "teaser", cioè un altro toro legato, o un manichino meccanico con la possibilità di un movimento autonomo di avanzamento, indietreggiamento ed innalzamento che simuli l'animale reale.

Quando il toro raggiunge la stimolazione sufficiente viene lasciato impennare e si procede alla raccolta. Essendo l'eiaculazione molto rapida, l'operatore deve fare attenzione al momento in cui il toro inizia il cavalcamento per inserire tempestivamente la vagina artificiale; una volta indirizzato il pene nella vagina artificiale, questa viene tenuta parallelamente al fianco dell'animale ed il toro eiacula immediatamente a contatto con la superficie calda.

Normalmente nei centri tori viene effettuato per ogni toro, durante la sua vita produttiva, che di norma dura circa 5-6 anni in funzione alla sua vita commerciale, un doppio prelievo alla settimana, intervallato di almeno 30 minuti; nelle fasi più intense, per riproduttori adulti il ritmo di prelievo arriva anche a 3 giorni a settimana, con 1/2 salti al giorno, intervallati sempre di 30 minuti. Se la raccolta di seme è troppo frequente, il volume e la qualità ottenute da ciascun eiaculato si ridurranno, perciò deve esserci un compromesso fra produzione massima totale ed una quantità ragionevole ad ogni raccolta.

La tracciabilità del materiale seminale raccolto è garantita da un sistema di identificazione elettronica dell'animale, attraverso un microchip auricolare ed un rilevatore ad infrarossi che legge il codice dell'animale il cui seme è stato appena prelevato. Il prelevatore rileva il codice all'orecchio dell'animale e lo trasmette al ricevitore; immediatamente viene stampata un'etichetta da applicare alle provette ed al flacone del materiale seminale in lavorazione. Questi dati verranno poi stampati sulle paillettes che conterranno il materiale seminale congelato.

1.3.2.3 Valutazione del seme e parametri di qualità

Per le operazioni successive di lavorazione e di controllo del materiale seminale, l'operatore consegna il bicchierino di raccolta al tecnico di laboratorio, il quale lo etichetta immediatamente con matricola del toro, data e ora del prelievo e nominativo del prelevatore, e procede alla valutazione del seme mediante osservazione diretta e per mezzo del microscopio. In attesa di essere processato, il materiale seminale viene mantenuto a 32°C.

L'osservazione diretta consente di determinare il volume e l'aspetto del seme. Il volume dell'eiaculato si può misurare con la stessa provetta graduata utilizzata per la raccolta, e normalmente si aggira sui 5-8 cm³; esso dipende dall'età e dal peso vivo del toro, dalla frequenza dei prelievi e dal livello tecnico raggiunto nelle operazioni di raccolta. Un volume scarso, comunque, non deve preoccupare perché esistono notevoli variazioni fra individui e fra raccolte.

Per quanto riguarda l'aspetto del seme, va ricordato che i campioni più densi, uniformi ed opachi presentano, in genere, una concentrazione spermatica maggiore, mentre se il seme appare discretamente chiaro, la concentrazione di spermatozoi sarà troppo bassa per essere accettabile. Normalmente il colore è biancastro, ma alcuni tori producono seme di colore giallo per la presenza di particolari pigmenti, come la riboflavina. L'eiaculato, inoltre, deve presentarsi esente da contaminazioni con sangue, pus, urine, feci e materiali estranei.

Successivamente, si procede con il controllo della concentrazione, che viene effettuato in maniera indiretta tramite un apposito fotometro che valuta il numero di spermatozoi per centimetro cubico di eiaculato. Attualmente esistono anche altri metodi di conta degli spermatozoi, come i contatori elettronici di particelle, la citometria di flusso con colorazione fluorescente e le analisi quantitative del DNA.

Un eiaculato medio ha un volume di 7 ml, una concentrazione di spermatozoi per ml di 1,6 miliardi ed un numero di spermatozoi totali di 11,2 miliardi.

Anche la verifica del pH dello sperma è importante, poiché il passaggio da valori acidi (pH 6,5-6,8 per sperma di buona qualità) a valori alcalini indica una diminuzione della concentrazione e della motilità.

Dopo il controllo della concentrazione, il materiale seminale viene posto a bagnomaria tarato a 36°C e si procede all'esame microscopico a basso ingrandimento, per determinare la percentuale di cellule vitali e la loro motilità, il tipo di movimento degli spermatozoi e l'incidenza di anomalie, se queste fossero presenti. Poiché la motilità è influenzata anche dalla temperatura, si utilizzano vetrini mantenuti a 39°C su un tavolinetto riscaldabile, al fine di stimare la percentuale di spermatozoi vivi.

La percentuale di cellule mobili dovrebbe raggiungere e/o superare il 75% se il seme è di buona qualità (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990) ed almeno il 60% degli spermatozoi deve nuotare con un normale moto ad onde spermatiche (Peters e Ball, 1992); questo tipo di moto, che deve essere rettilineo e progressivo avanzante, è assai importante poiché più frequenti sono le onde, più vitale è lo sperma. Se, invece, gli spermatozoi nuotano a ritroso o in circolo, possono essere stati danneggiati dal freddo, dal caldo o da shock osmotico.

Le anomalie morfologiche sono correlate alla fertilità degli animali da reddito. Lo stress termico può provocare un elevato numero di spermatozoi danneggiati; elevate temperature ambientali, abbinate ad un'elevata umidità, possono rendere un maschio sterile per un periodo anche di sei settimane, al termine del quale si riscontra nell'eiaculato un elevato numero di spermatozoi anormali.

La presenza di anomalie spermatiche e la loro incidenza si verificano mediante l'esame microscopico ad elevato ingrandimento, con o senza tecniche di colorazione. La percentuale di spermatozoi normali deve risultare superiore all'80% (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990); quando le cellule anormali superano il 20%, la fertilità declina.

Uno spermatozoo normale ha forma caratteristica e può essere schematicamente suddiviso in due parti: la testa che garantisce il potere fecondante ed il flagello che garantisce la mobilità (Fig. 4). La testa è costituita essenzialmente dal nucleo, contenente l'informazione genetica, ricoperto dall'acrosoma, che è una struttura a doppia membrana, che interviene nella fase di penetrazione della cellula uovo. Il flagello, invece, presenta una parte di maggior diametro, il collo, da cui si origina il movimento, ed una parte molto lunga e sottile, la coda, che muovendosi fa avanzare tutto lo spermatozoo.

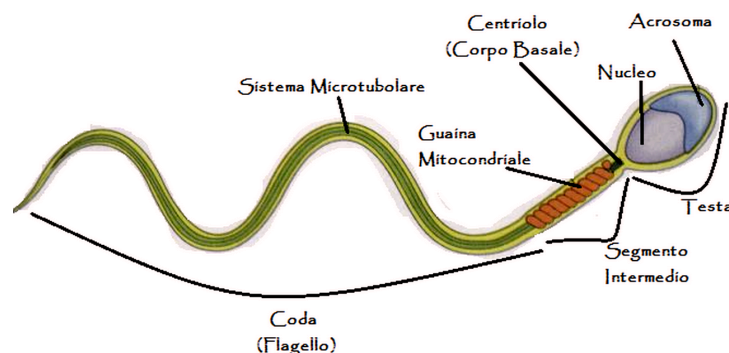


Fig. 4 *Rappresentazione schematica di uno spermatozoo*

Le anomalie vengono classificate in primarie, secondarie e terziarie; le primarie riguardano la testa e l'acrosoma, le secondarie si caratterizzano per la presenza della goccia citoplasmatica nel tratto intermedio della coda, mentre le anomalie terziarie si riferiscono a tutte le altre anomalie

presenti nella coda. Fra le anomalie principali si ricordano la testa senza flagello, il flagello senza testa, l'assenza di acrosoma, alterazioni dell'acrosoma, l'assenza di collo, la presenza di due flagelli o due teste, ecc.

Oltre all'esame microscopico, esiste anche la possibilità di effettuare prove biologiche; la prova più in uso è il test di decolorazione con blu di metilene. Il seme viene immerso in una soluzione di blu di metilene e quindi in termostato per un tempo standard; poiché questa sostanza è ricca di ossigeno ed i nemasperi vitali ne consumano una certa quantità nell'unità di tempo, il grado di decolorazione è proporzionale alla densità del seme vitale.

Il test di densità ottica, invece, consiste nella determinazione della concentrazione spermatica attraverso la misurazione dell'assorbimento della luce da parte del materiale seminale mediante un colorimetro.

1.3.2.4 Diluizione, Congelamento, Conservazione e Distribuzione del seme

Agli inizi della tecnica di inseminazione artificiale, il materiale seminale veniva utilizzato tal quale, semplicemente frazionando ogni eiaculato in 4-8 dosi a seconda del volume. Oggi i centri di inseminazione artificiale dispongono di tori miglioratori, il cui seme va diffuso su molte bovine, e quindi si ricorre alle tecniche di diluizione con opportune soluzioni, denominate mestruai.

Considerando che in una dose devono essere presenti almeno 20-22 milioni di spermatozoi precongelo, grazie ai parametri quantità e concentrazione, viene calcolata la quota di diluizione ed il numero di dosi producibili.

I mestruai diluitori possiedono diverse funzioni e proprietà, allo scopo di favorire la vitalità delle cellule spermatiche:

- forniscono sostanze nutritive agli spermatozoi, ed in particolare sostanze energetiche, in genere mediante l'aggiunta di uno zucchero semplice come il fruttosio;
- possiedono un'azione tamponante per mantenere stabile l'acidità e contrastare la caduta di pH che si verifica in seguito alla produzione di acido lattico, dovuta all'attività metabolica degli spermatozoi; si usano comunemente tamponi a base di citrato, fosfato e Tris, benché essi non siano necessari quando si fa uso di un diluente a base di lattosio;
- mantengono un'adeguata pressione osmotica ed un bilancio elettrolitico idoneo alla sopravvivenza degli spermatozoi; la concentrazione di componenti nella soluzione, quali gli zuccheri, deve essere tale da evitare che essa sia ipo-osmotica per gli spermatozoi, i quali in caso contrario si possono rompere;
- inibiscono la moltiplicazione di germi e batteri, perciò hanno una funzione antibiotica;

- aumentano il volume del singolo eiaculato, che può perciò essere impiegato per più interventi d'inseminazione;
- proteggono gli spermatozoi dai possibili effetti negativi di refrigerazione, congelamento e scongelamento, fungendo quindi da crioprotettivi, mediante l'aggiunta di glicerolo che ne impedisce la cristallizzazione.

Sono state sperimentate formulazioni assai diverse, ma i mestruai più diffusi sono a base di tuorlo d'uovo e latte magro; negli ultimi anni, si sono diffusi i diluitori commerciali, prodotti da ditte specializzate e venduti già pronti per l'uso o da reidratare, composti essenzialmente da latte scremato in polvere, colesterolo e/o lecitina, sali minerali, glucosio, alcuni amminoacidi ed antibiotici.

Un eiaculato tipico di circa 8 ml può contenere 10×10^9 spermatozoi; questo è sufficiente per preparare 500 unità di 20×10^6 spermatozoi. Per ottenere unità di 0,25 ml, il seme eiaculato deve essere diluito di circa 15 volte (Peters e Ball, 1992). Il rapporto di diluizione varia in genere da 1:20 a 1:30 e, quindi da un eiaculato di 5 cc si possono ricavare circa 100-150 dosi da 1 cc (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990).

Se conservato a temperatura ambiente (18°C), il seme deve essere utilizzato entro poche ore. La refrigerazione può prolungarne la durata fino ad un massimo di 4-5 giorni; in questo caso si parla di seme fresco. Oggi però si ricorre alle tecniche di congelamento del seme in azoto liquido, che consentono di prolungarne la capacità fecondante.

Dopo un ulteriore controllo al microscopio, il materiale diluito viene, quindi, portato nel reparto confezionamento; le dosi di seme, a questo punto, possono essere confezionate in fiale, pellets, minitubes o paillettes.

Le fiale sono piccoli flaconi di vetro di diversa capacità, da 1 cc, oggi difficilmente trovabili, e da 0,5 cc; sono montate in serie da 6/8 su stecche metalliche portafila. Su ogni fiala sono stampati il codice del centro di produzione, la sigla ed il codice del toro ed il numero di partita, mentre sulla parte superiore di ciascuna stecca è riportato il codice del toro.

I pellets sono dei preparati dello sperma in forma di pastiglie del volume di 0,10-0,15 cc, congelati su ghiaccio secco e conservati senza nessuna protezione direttamente nell'azoto liquido. L'identificazione dei pellets si ottiene sia per mezzo di un piccolo dischetto di carta conglobata, sia per mezzo di un anello di plastica stampata. La diluizione viene fatta con una soluzione fisiologica o isotonica, oppure con del latte, dopo lo scongelamento dei pellets. Esiste anche un metodo che prevede l'inserimento del pellet direttamente in cervice.

I minitubes sono tubicini di plastica del diametro uniforme di 2,7 mm e di lunghezza variabile, in genere, fra i 65 ed i 90 mm, con le due estremità identiche e chiuse con delle sferette di

plastica o di metallo; su ogni minitube sono stampati i dati di riconoscimento della dose. I minitube vengono stoccati su più piani in custodie di plastica con appositi estrattori, sempre in materiale plastico.

Al giorno d'oggi, però, la forma di confezionamento più diffusa è la paillette, rappresentata da un sottile tubo in cloruro di polivinile, lungo 133 mm e chiuso ad un'estremità con due tappini di cotone che trattengono in posizione un disco di polvere di alcool polivinilico. Sono disponibili due versioni: la paillette media con capacità di 0,5 ml e la paillette fine con capacità di 0,25 ml, entrambe contenenti 6-8 milioni di spermatozoi.

Il riempimento avviene per aspirazione ed il liquido, raggiunto il primo tappo di cotone, lo inumidisce provocando così la solidificazione per la polimerizzazione dell'alcool polivinilico. L'estremità aperta, invece, viene chiusa manualmente con polvere di alcool polivinilico, oppure mediante ultrasuoni con macchine riempitrici automatiche (Fig. 5).

Le paillettes offrono un'eccezionale rapporto superficie/volume, economicità e, dato l'ingombro ridotto, un vantaggioso sfruttamento dello spazio disponibile, aumentando di 3-4 volte la capacità di stoccaggio rispetto alle fiale, oltre ad una maggior praticità, consentendo a tutto il materiale seminale di defluire, e ad una minor possibilità di contaminazione del seme durante l'uso.

Le paillettes così preparate, dopo essere state stampigliate con i dati di identificazione del toro e del centro di F.A., vengono inserite in un frigorifero tarato a 5°C dove rimarranno per 5 ore; solamente dopo questo tempo si passerà al congelamento vero e proprio, mettendo le rampe contenenti le paillettes in un contenitore a bocca larga, dove in alcuni minuti quest'ultime passano da 5°C a -140°C.

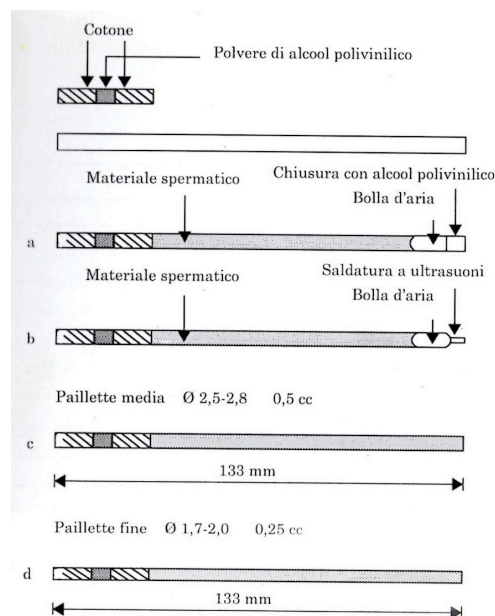


Fig. 5 Descrizione di una paillette. A - chiusura con alcool polivinilico; B - chiusura con ultrasuoni; C - paillette media; D - paillette fine.

Raggiunta questa temperatura, le dosi vengono trasferite in azoto liquido a -196°C . Un raffreddamento troppo rapido può causare uno shock termico, mentre un raffreddamento troppo lento può comportare un aumento della pressione osmotica nel corso del congelamento; tutto ciò può provocare un danno irreparabile agli spermatozoi. Oggi esistono macchine controllate dal computer per seguire automaticamente l'abbassamento graduale della temperatura.

Tuttavia, per controllare che il seme non abbia subito delle variazioni durante il congelamento, si effettua un ulteriore controllo scongelando l'1% delle dosi; se la motilità è sufficiente il seme va in stoccaggio, altrimenti verrà distrutto. Normalmente, con il congelamento vengono danneggiati il 10-40% degli spermatozoi.

Una ricerca svolta da J.J. Sullivan nel 1970 ha evidenziato che il massimo di fertilità, espressa in percentuale di non ritorni a 60-90 giorni, si è ottenuto con un numero di 10 milioni di spermatozoi per dose dopo congelamento e l'ulteriore aumento del numero di spermatozoi per dose ha un effetto positivo per i tori a bassa fertilità, mentre ha un effetto nullo o addirittura negativo per quelli ad alta fertilità.

Purché il seme sia mantenuto costante alla temperatura dell'azoto liquido (-196°C), esso ha una durata di immagazzinamento infinita, poiché con il congelamento viene fermato l'invecchiamento delle cellule, che possono quindi essere conservate per un tempo indeterminato.

Il seme, opportunamente diluito e confezionato, viene conservato in un contenitore di stoccaggio provvisorio in attesa dell'esito delle prove sanitarie effettuate mensilmente sui riproduttori. Dopo aver superato questo periodo di quarantena, il seme può essere venduto oppure trasferito in un locale apposito dove avverrà lo stoccaggio definitivo.

1.3.3 La Tecnica di Inseminazione Artificiale

Quest'ultima fase, ormai nota nella pratica aziendale, consiste nell'introduzione della dose di seme nell'apparato genitale della femmina in calore.

Una volta la pratica dell'inseminazione strumentale in Italia poteva essere eseguita esclusivamente dai veterinari, ma la legge n° 74 dell'11.3.1974 ne consente oggi la realizzazione anche da parte di tecnici inseminatori, i cosiddetti "fecondatori laici", previa frequenza di un corso di alcuni mesi. Ciò ha consentito una maggior diffusione di questa tecnica e, dato il maggior numero di operatori, un servizio più efficiente.

1.3.3.1 Strumenti per l'Inseminazione Artificiale

Lo stoccaggio del materiale spermatico attualmente viene fatto in azoto liquido. L'azoto liquido è un gas liquefatto, incolore, inodore, chimicamente inattivo. La sua temperatura di ebollizione è di -196°C ; questa bassa temperatura può provocare delle lesioni simili alle scottature.

L'azoto liquido viene prodotto attraverso un sistema detto "a freddo", attraverso la compressione ed il trattamento dell'aria atmosferica che, dopo essere stata depurata, viene raffreddata in uno scambiatore, in controcorrente con l'azoto prodotto in uscita, entrando poi nella colonna di distillazione, dove avviene la separazione criogenica tra l'ossigeno e l'azoto.

Una volta prodotto per compressione, l'azoto deve essere mantenuto allo stato liquido alla temperatura di -196°C in appositi contenitori criobiologici pressurizzati, che in genere vengono sistemati nei pressi delle attività che ne richiedono l'impiego.

L'azoto liquido vaporizzando crea un gas freddo, più pesante dell'aria, che si accumula nei punti bassi condensando una densa nebbia. L'azoto evapora più o meno velocemente a seconda del grado di isolamento del recipiente entro il quale si trova; l'azoto evaporato deve, dunque, poter evacuare liberamente dal contenitore senza creare pressioni, che potrebbero procurarne lo scoppio. A tale scopo, il tappo del contenitore, di materiale isolante, non è a tenuta stagna.

Il contenitore criobiologico (Fig. 6) è destinato esclusivamente a conservare l'azoto liquido ed è costruito in modo da limitare lo scambio di calore tra l'esterno e l'interno, che si mantiene refrigerato, permettendo così la conservazione del materiale spermatico congelato.

Dovendo ridurre lo scambio termico, si utilizzano vasi di alluminio o di acciaio a doppia parete, nella cui intercapedine sono collocati degli strati multipli di sostanze altamente termoisolanti e riflettenti, che producono il vuoto; un ulteriore elemento che aiuta a mantenere il vuoto fra i due vasi è la presenza nell'intercapedine, in prossimità del collo del contenitore, di un assorbente molecolare, in grado di catturare eventuali particelle d'aria.

Il collo del contenitore è l'unico punto di contatto tra i due vasi; costruito con idoneo materiale sintetico in fibra di vetro per il massimo isolamento, è l'unica apertura del contenitore verso l'esterno, ma è anche l'unica struttura che sorregge il vaso interno e, quindi, anche il peso del contenuto, e per questo motivo è il punto più facilmente soggetto a rotture, in seguito a manipolazioni scorrette o ad urti.

Un tappo, costituito da un cilindro di materiale plastico normalmente poroso ed isolante, chiude, poi, il contenitore per limitare la dispersione dei vapori di azoto; questo cilindro presenta delle scanalature longitudinali in numero pari al numero dei cestelli.

Per lo stoccaggio delle dosi all'interno del contenitore sono, infatti, previsti dei cestelli in acciaio, i canisters, agganciati con un'asta di materiale isolante al collo del contenitore ed

identificabili da un numero progressivo o da un diverso colore. Ciascun cestello, inoltre, può essere equipaggiato con bicchieri di plastica, chiamati globelets, che facilitano la manipolazione del seme e possono trattenere parte dell'azoto liquido durante lo spostamento del seme.

Così come i cestelli, anche i globelets possono avere differenti colori per poter individuare più facilmente il materiale spermatico di un toro rispetto ad un altro.

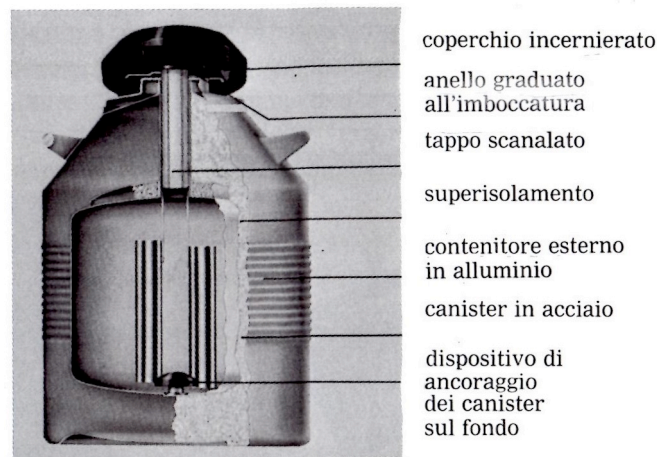


Fig. 6 *Rappresentazione schematica della sezione di un moderno contenitore criobiologico*

Il livello di azoto nel contenitore deve essere controllato il più frequentemente possibile, in rapporto all'autonomia, mediante una pesatura o con l'ausilio di un'asta di materiale isolante. Per garantire un'ottimale conservabilità, la ricarica deve essere effettuata con un livello di azoto non inferiore a 5 cm, anche perché l'evaporazione è tanto più rapida quanto minore è il livello di azoto liquido.

Nel collo del contenitore le dosi sono mal protette, perciò, nel caso di trasferimento di dosi, si consiglia di avvicinare il più possibile i contenitori e, se possibile, trasferire cestelli interi. Per evitare di estrarre inutilmente le dosi dal contenitore si consiglia di predisporre una mappa delle dosi per ogni canister, poiché dosi di materiale seminale scongelate e non utilizzate non possono essere più ricongelate.

Al fine di migliorare questa fase, i francesi utilizzano delle false paillettes più alte delle normali e, quindi, di facile individuazione, chiamate joncs, che hanno la medesima colorazione e la stessa stampigliatura delle dosi in paillettes; con questa tecnica è possibile estrarre in tutta tranquillità la dose corrispondente al toro da utilizzare.

Per quanto riguarda l'introduzione della dose di seme nell'apparato riproduttore della bovina, si utilizzano delle apposite siringhe per l'inseminazione.

Le pipette monouso per aspirazione (tipo americano), della lunghezza approssimativa di 30 cm, di materiale plastico, trasparente e semirigido, sono delle cannule terminanti con una vescichetta, schiacciando e rilasciando la quale si creano rispettivamente l'aspirazione e

l'espulsione del materiale seminale. Le pipette vengono utilizzate per le fiale e per i pellets, ma il loro impiego va sempre più riducendosi.

Oggi, nella quasi totalità dei casi, si utilizzano i pistolets; questi possono essere di tre tipi: il pistolet per le paillettes mini, quello per le paillettes medie, ed il pistolet universale usabile sia per paillettes mini o medie, che per le fiale o per i pellets.

I pistolets (Fig. 7), della lunghezza di 45 cm, costruiti in acciaio, sono costituiti da un corpo tubolare, terminante con un rilievo conico, da un pistone e da una rondella di materiale plastico, per il fissaggio delle guaine.

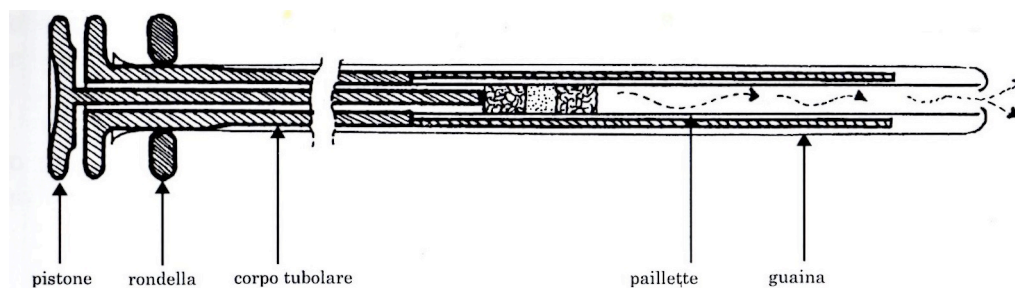


Fig. 7 *Rappresentazione schematica di un pistolet*

Per i pistolets universali, la parte terminale conica è staccata dal corpo tubolare e scorre su di esso, tramite le apposite guaine, quando vengono usati per l'aspirazione del materiale seminale delle fiale o dei pellets. Inoltre, con il pistolet universale, il corpo tubolare può essere utilizzato da ambo le parti, presentando due diametri interni diversi, a seconda che si tratti di paillettes mini o medie.

I pistolets, subito dopo l'utilizzo, devono essere smontati e puliti con un idoneo disinfettante, evitando in ogni modo di bagnare l'interno del corpo tubolare che risulta difficilmente asciugabile. Particolare cura dovrà essere riservata anche alla pulizia dell'estremità che porta il rilievo conico del pistolet ed alla rondella di plastica, poiché questi entrano a contatto con la vulva durante l'inseminazione.

Recentemente è stato prodotto un nuovo modello di pistolet che assicura il bloccaggio della guaina per avvvitamento su un rilievo a spirale posto sul fondo del pistolet; questo pistolet a spirale risulta più pratico nell'uso ed elimina l'inconveniente della perdita e della fastidiosa pulizia della rondella.

Le guaine, monouso, fabbricate in cloruro di polivinile, assicurano la protezione sanitaria del pistolet durante l'inseminazione; per una maggiore sicurezza igienica vengono commercializzate guaine confezionate singolarmente. Le guaine, nel caso di pistolet a rondella, sono munite di un taglio longitudinale sul fondo per sormontare il cono terminale del corpo del pistolet, mentre il modello di guaina senza taglio serve per il pistolet a bloccaggio con spirale.

Infine, al momento dell'intervento di fecondazione, l'operatore, per poter svolgere correttamente la sua attività, deve essere dotato di un recipiente che mantenga per più tempo possibile la temperatura dell'acqua a 35-37°C e di un termometro per il controllo del bagno di scongelamento, oltre a fazzoletti di carta assorbente, un paio di forbici pulite ed affilate per un netto taglio della paillette, e pinzette di acciaio o di plastica con apposita scanalatura per l'estrazione delle paillettes dal contenitore.

1.3.3.2 L'intervento di Fecondazione Artificiale

Perché avvenga il concepimento, l'inseminazione deve avere luogo nel momento giusto del ciclo estrale della bovina; sebbene il meccanismo di capacitazione degli spermatozoi non sia chiaro, essi devono sicuramente trascorrere un certo numero di ore nell'apparato riproduttore femminile per essere in grado di fecondare (Asdell, 1964).

Il periodo ottimale per la fecondazione artificiale è legato al momento dell'ovulazione in relazione alla vita dell'ovulo e dei nemasperi. La fertilità degli spermatozoi dura, secondo la maggior parte degli autori, da 18 a 24 ore (secondo Bishop, 1961, da 24 a 48 ore), pur conservando la motilità per un tempo maggiore, mentre la sopravvivenza dell'ovulo nella bovina è di 6-12 ore (Spelta e Corbella, 2015).

E' perciò più facile che l'ovulo venga fecondato se viene in contatto con spermatozoi vitali entro 6 ore circa dall'ovulazione e, quindi, il momento ottimale per fecondare è 12-24 ore dopo l'inizio dell'estro. In questo modo, ci si assicura che lo spermatozoo arrivi là dove avverrà la fecondazione poche ore prima dell'ovulazione, la quale di norma avviene circa 30 ore dopo l'inizio dell'estro (Peters e Ball, 1992).

Un tempo, la deposizione del seme veniva effettuata in vagina (inseminazione vaginale), ma questa tecnica richiedeva una dose di notevole volume per avere buoni successi.

In seguito, si è diffuso il metodo dell'inseminazione cervicale, secondo cui, con l'aiuto di un divaricatore vaginale, il contenuto della paillette, inserita all'estremità della siringa, veniva iniettato direttamente in cervice. Dal momento che la sollecitazione meccanica provocata dal divaricatore poteva influire negativamente sul successo dell'intervento, oggi ha preso il sopravvento il metodo di inseminazione retto-vaginale, di semplice manualità e che fornisce ottimi risultati in termini di fertilità.

Schematicamente, le varie fasi per procedere ad un corretto intervento di fecondazione artificiale sono:

- il controllo del registro di stalla: prima di ogni altra operazione è utile sapere se e quando la bovina in questione è stata fecondata;

- l'esplorazione rettale: va effettuata dopo lo svuotamento del retto dalle feci, per accertarsi del turgore dell'utero, che manifesta il reale stato di calore, e dall'assenza di anomalie che possono determinare la non fecondabilità della bovina;
- la scelta del toro da usare, in base alle caratteristiche morfologiche e produttive della bovina da fecondare ed in relazione agli indirizzi selettivi;
- l'individuazione ed estrazione dal contenitore della dose di seme: per evitare di mantenere per lungo tempo il materiale seminale all'imboccatura del contenitore, occorre procedere ad una veloce operazione di individuazione.

A questo punto si prosegue con lo scongelamento della dose e la preparazione del pistolet. Buona norma è tenere il contenitore vicino all'acqua di scongelamento per ridurre il tempo che intercorre dal prelievo del materiale all'immersione in acqua e, prima di quest'ultima, scuotere la paillette per eliminare eventuali gocce di azoto che ne potrebbero determinare lo scoppio.

Lo scongelamento delle paillettes va effettuato con acqua a 35-37°C almeno per 10-15 secondi. Il livello dell'acqua e le dimensioni del recipiente dovranno essere tali da consentire l'immersione pressoché totale della paillette in posizione verticale, per evitare che, nel caso di scoppio del tappo, non vi sia il contatto dell'acqua con il materiale seminale, dato il potere spermicida di quest'ultima.

Per il montaggio della dose sul pistolet occorre assicurarsi che durante il taglio della paillette non venga persa una se pur minima quantità di materiale seminale; perciò, se la bolla d'aria presente nella paillette non fosse vicina al lato dell'apertura, occorrerebbe provvedere, riportandola al giusto posto mediante un leggero colpo di polso.

Verificato ciò, si procede con l'inserimento della paillette, dalla parte dei due tappi di cotone, nella canna del pistolet, spingendola fin quando non si arresta contro l'apposito fermo. Nel periodo invernale, prima di essere messo a contatto con la paillette, il pistolet dovrà essere preventivamente riscaldato strofinandolo vigorosamente, per evitare dannosi sbalzi di temperatura.

Una volta inserita la paillette, va effettuato un taglio ad incisione netta ed orizzontale, ad un centimetro circa dall'estremità della paillette che fuoriesce dalla canna del pistolet; il taglio deve risultare sotto la saldatura ad ultrasuoni ed in corrispondenza della bolla d'aria.

Un taglio obliquo della paillette è controproducente, in quanto premendo sullo stantuffo si potrebbe verificare un reflusso del liquido seminale lungo la guaina, con la riduzione anche consistente del materiale deposto nell'utero dell'animale da inseminare.

A questo punto, va infilata la guaina sul pistolet, assicurandosi che la paillette sia ben compressa contro di essa, per evitare che la spinta del pistone possa sganciare la guaina.

Dopo aver predisposto la strumentazione, si procede alla fecondazione della bovina, infilando un guanto impalpabile monouso e penetrando con la mano guantata nel retto della bovina in questione; lo svuotamento del retto con un'azione di va e vieni può favorire la fuoriuscita del muco cervicale, sul quale è opportuno un controllo qualitativo.

L'operatore, con la mano dentro il retto, afferra la cervice, la tira verso di sé e la alza in modo che il pistolet possa venire introdotto attraverso la vagina nell'orifizio della stessa; la punta del pistolet viene, poi, fatta passare attraverso la cervice, in modo da iniettare il seme nel corpo dell'utero. Se il pistolet viene introdotto troppo in avanti, tutto il seme può finire in un solo corno uterino, sfavorendo l'efficienza dell'intervento.

Terminata l'inseminazione si retrae il pistolet con delicatezza e si concludono le operazioni di fecondazione con la pulizia della strumentazione.

1.4 Fattori che influiscono sulla fertilità

Molteplici sono le cause che, con diversa incidenza, riducono la fertilità; solo in pochissimi casi esse agiscono isolatamente, mentre nella maggior parte dei casi sono interdipendenti.

I problemi di fertilità di una mandria possono essere classificati in due gruppi principali: quelli che riguardano la fertilità della bovina e quelli che interessano la fertilità del seme.

Il requisito di base della fertilità, uguale per entrambi i sessi, è la produzione di gameti vitali. Per una buona fertilità sono, però, necessari anche un normale istinto sessuale, l'attitudine materna, e la capacità dei figli di sopravvivere ed essere a loro volta fertili.

Per cercare di risolvere i problemi di scarsa efficienza riproduttiva insorti in un allevamento, è necessario innanzitutto identificare le cause predisponenti e quelle scatenanti; in seguito, il tecnico dovrà cercare di migliorare la conduzione aziendale, stimolando un più attento controllo delle bovine, lavorando a contatto con l'allevatore o con il personale di stalla e richiedendo la collaborazione del veterinario ogni qualvolta vi sia il sospetto di possibili fatti patologici.

Per ipofertilità si considera la riduzione delle capacità riproduttive; essa si pone tra la fertilità normale e la sterilità, che rappresenta l'assoluta impossibilità di riprodursi.

In genere, la sterilità vera e propria è dovuta a processi patologici o a malformazioni congenite dell'apparato genitale, oppure ad affezioni morbose a carattere generale, che compromettono l'integrità dell'apparato riproduttore.

L'ipofertilità è, invece, spesso da attribuire a cause diverse, che agiscono al di fuori della sfera genitale e talora in concomitanza con altri fattori predisponenti. L'ipofertilità è, quindi, un fenomeno complesso in cui intervengono fattori genetici e fattori ambientali. Non è, però, facile definire l'importanza relativa del patrimonio genetico e dell'ambiente, innanzitutto perché non

sempre è agevole misurare il grado di fertilità, ed inoltre perché le variazioni ambientali sono ampie e di tipo diverso.

Tutti i caratteri strettamente legati al fenomeno della riproduzione hanno un'ereditabilità, cioè una variabilità dovuta a cause genetiche, assai ridotta (Tab. 3); il miglioramento di questi parametri è dunque assai difficile attraverso la selezione, e maggiori probabilità di successo si possono avere soltanto cercando di migliorare le tecniche di allevamento e l'ambiente in senso lato.

Carattere	h²
Quantità e qualità dello sperma	0,3-0,5
Cisti ovariche	0,2-0,4
Regolarità del ciclo sessuale	0,2
% di non ritorni a 60-90 giorni (manze)	0,17
Età al terzo parto	0,2
% di non ritorni (vacche adulte), n° servizi/concepimento, interparto	0,0

Tabella 3 *Ereditabilità di alcune componenti della fertilità (Sartore, 1979)*

I sistemi di riproduzione da applicare in una popolazione vanno attentamente valutati e correttamente applicati; ad esempio, la consanguineità è molto rischiosa perché aumenta il tasso di omozigosi e mette in evidenza che ogni animale è portatore di un carico di geni, in genere recessivi, che abbassano la resistenza alle malattie o riducono la fertilità.

Alcuni autori pretendono ad attribuire a fattori genetici la mortalità embrionale, soprattutto quando si ricorre ad una stretta consanguineità. L'efficienza riproduttiva viene, infatti, peggiorata con gli accoppiamenti in purezza, mentre viene migliorata dagli incroci interraziali, poiché si riduce il rischio di accumulare geni letali allo stato di omozigosi. Hanno, quindi, maggiore influenza sulla fertilità cause di ordine ambientale, che non di ordine genetico, per cui, salvo eccezioni, è estremamente difficile ottenere buoni risultati nelle mandrie selezionando per questo carattere.

Vi sono, tuttavia, alcuni casi in cui è evidente la causa genetica dell'ipofertilità o della sterilità, come anomalie dei cromosomi, degli spermatozoi, dell'apparato riproduttore maschile o femminile ed anomalie a carico del prodotto del concepimento. Siccome alcune di queste anomalie sono causate da singoli geni, nella maggior parte dei casi recessivi, è relativamente facile la selezione per eliminare questi fattori negativi.

Le principali malformazioni degli organi genitali maschili per le quali si riconosce una base genetica sono l'ipoplasia dei testicoli, l'aplasia dell'epididimo e delle vescicole seminali, la spermioasi, la contrattura dei muscoli retrattori del pene ed un'anormale posizione del pene.

Le principali malformazioni degli organi genitali femminili, invece, riguardano l'ipoplasia delle ovaie, l'aplasia della vagina e dell'utero (White Heifer Disease) e la presenza di doppia cervice.

La sterilità gametica, invece, si verifica quando i gameti prodotti non sono in grado di fecondare o di essere fecondati. Il fenomeno è stato studiato soprattutto nei tori, ma verosimilmente si verifica in entrambi i sessi; le cause possono essere ricondotte, ad esempio, ad anomalie dell'acrosoma, anomalie del fuso mitotico durante la meiosi o anomalie cromosomiche.

Inoltre, è un fatto dimostrato che con l'aumentare dell'età dei riproduttori diminuisce la loro fertilità; il fenomeno può essere dovuto ad una maggiore incidenza di disturbi durante la meiosi, come si verifica, per esempio, nella specie umana nel caso della trisomia 21 (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990).

Tra i fattori ambientali di maggior importanza ricordiamo il clima e la stagione, l'alimentazione, infezioni e parassiti, le tecniche di allevamento e la gestione riproduttiva.

Per quanto riguarda il clima e la stagione, normalmente le influenze dell'ambiente sono di tipo indiretto, in quanto agiscono sugli organi della riproduzione attraverso una serie di stimoli recepiti dal sistema nervoso centrale.

Va tenuto conto che i risultati della fecondazione variano da mese a mese con percentuali di gravidanza al primo intervento fecondativo mediamente migliori nel periodo primaverile, poiché vi è un maggior numero di ore di luce ed una maggior manifestazione degli estri.

Solo in alcuni casi si può parlare di azione diretta, come ad esempio per le elevate temperature ambientali, che possono influenzare sfavorevolmente la funzionalità dei testicoli, e quindi la spermatogenesi, e dell'utero, provocando la morte embrionale.

Le elevate temperature estive possono ridurre la percentuale di concepimento, modificare la durata del ciclo estrale e l'intensità e la durata delle manifestazioni esterne del calore. Molti di questi effetti sono mediati dalle influenze stressanti del caldo sulle bovine, che in genere riducono il consumo di alimenti. E' stato anche dimostrato che le alte temperature, associate ad elevati valori di umidità relativa nei due giorni precedenti l'inseminazione, sono negativamente correlate con la percentuale di concepimento (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990).

Fino ad alcuni anni fa, era riconosciuto che i problemi di ipofertilità nelle bovine dipendevano almeno per il 50% da errori di natura alimentare, relativi all'apporto di energia, fibra grezza, proteine, minerali e vitamine, all'equilibrio tra i vari costituenti della razione oppure alla somministrazione degli alimenti contenenti sostanze tossiche o potenzialmente pericolose. Ora gli studiosi che si occupano del fenomeno sono propensi ad un certo ridimensionamento dell'importanza di questa causa, pur ritenendo che gli animali alimentati razionalmente siano in

grado di reagire meglio agli interventi correttivi effettuati per migliorare il tasso di fertilità (Spelta e Corbella, 2015).

La diminuzione della fertilità può essere immediata conseguenza di un'alimentazione errata, ma anche il risultato di uno stato patologico a sua volta imputabile a cause di natura alimentare. Ad esempio, le malattie metaboliche (collasso puerperale, chetosi, alterazioni epatiche, ecc.), a cui conseguono condizioni di ipofertilità, sono favorite soprattutto da un'alimentazione squilibrata, nonché da malattie infettive che insorgono più facilmente con un'alimentazione non adeguata.

In alcuni casi, infatti, in cui la performance riproduttiva dell'allevamento è bassa, ciò può essere dovuto ad una causa infettiva; tuttavia, le principali malattie dell'apparato riproduttore, come la brucellosi o la campilobatteriosi, sono state quasi completamente eliminate dagli allevamenti in molti Paesi, in seguito a programmi di eradicazione delle malattie e all'uso della fecondazione artificiale.

L'alimentazione ha grande importanza soprattutto nei tre mesi che precedono la prima fecondazione. Una manza che cresce troppo poco ritarda la maturità sessuale, mentre una manza troppo grassa può non andare in estro per l'eccessiva infiltrazione di grasso nelle ovaie.

In genere, per le vacche in lattazione con alte produzioni sono, invece, da temere le carenze di energia e gli eccessi proteici, in particolare tra il parto e l'inseminazione. Per la vacca da latte, infatti, il carico metabolico è sinonimo di deficit energetico (Cassandro, 1997), ovvero di uno squilibrio tra la quantità di energia contenuta nel latte ed accumulata nelle proprie riserve corporee (output) e la quantità di energia ingerita con la dieta (input). E' noto che, nella prima fase di lattazione, si verifica un inevitabile deficit energetico che può essere contenuto da un'ottima capacità gestionale e dalle riserve corporee dell'animale, mentre nella seconda fase della lattazione, la maggior capacità d'ingestione della bovina e ed il minore livello produttivo determinano un bilancio energetico positivo, che favorisce il recupero della condizione dell'animale (Cassandro and Penasa, 2010).

Vi è, inoltre, da considerare che la fertilità delle bovine può essere influenzata anche dalla somministrazione di alimenti inquinati da sostanze tossiche o che favoriscono il formarsi di queste nella fase di metabolizzazione, come i fitoestrogeni in dosi elevate o le micotossine, in grado di provocare alterazioni del ciclo ovarico e sterilità.

Va, dunque, ricordato che non risultano banali i controlli sulla razione e sulla relativa ingestione in termini di sostanza secca, nonché lo stato di condizione corporea (Bcs, Body condition score) nella fase di transizione e nei primi 100 giorni di lattazione. In particolare, valori di interparto più bassi e, quindi, positivi si hanno in corrispondenza di condizioni corporee (riserve di grasso sottocutaneo) adeguate e non troppo scarse (Cassandro and Penasa, 2010).

Per quanto riguarda le tecniche di allevamento e la gestione della riproduzione, il tipo di stabulazione influenza la fertilità, poiché nella stabulazione libera la maggior mobilità e la possibilità di maggiore esposizione alla luce, portano ad un aumento dell'intensità delle manifestazioni estrali e ad un più precoce inizio dell'attività ovarica dopo il parto.

L'ambiente sociale spesso produce effetti marcati sul comportamento sessuale; notevole importanza riveste, ad esempio, la densità degli animali, anche perché un ambiente sovraffollato, oltre a costituire di per sé un fattore stressante, rende difficoltosa, anche in questo caso, l'individuazione dei calori.

La corretta individuazione del calore della bovina è una delle condizioni basilari per raggiungere uno stato di fertilità ottimale negli allevamenti; infatti, una cattiva rilevazione delle manifestazioni estrali porta ad un prolungamento del periodo interparto con una riduzione della produzione di latte riferita all'anno, nonché ad una maggiore incidenza dei problemi di patologia della sfera riproduttiva.

Il mancato riconoscimento dell'estro può essere dovuto al fatto che la vacca non manifesta l'estro, in seguito ad una mancanza di attività ovarica o ad un'ovulazione silente, cioè non accompagnata dalla manifestazione estrale, oppure al fatto che l'operatore di stalla non rileva l'estro. Analogamente, se una bovina che è stata fecondata torna in estro, questo può essere causato dal mancato rilevamento di un avvenuto ciclo estrale, da un'anormale lunghezza del ciclo, dalla perdita del prodotto del concepimento o da un estro che si verifica durante la gravidanza.

Gli errori di omissione e di diagnosi sono la causa principale di ripetuti ritorni in calore in quanto determinano o mancate inseminazioni o inseminazioni effettuate fuori tempo.

Per un'ottimale efficacia dell'intervento fecondativo è indispensabile individuare con tempestività l'inizio del calore per procedere all'inseminazione nel momento ideale, considerando il tempo di capacitazione dei nemaspermi e la vita fertile dell'ovocellula.

Investire in programmi di controllo della prima inseminazione, con la possibilità di raggiungere un tasso di rilevamento dei calori (Trc) maggiore del 70% per tutte le inseminazioni, ovvero maggiore dell'86% in prima inseminazione e maggiore del 60% per le inseminazioni ripetute, consentirebbe di risolvere molti problemi di riproduzione presenti in allevamento (Cassandro and Penasa, 2010).

Per ovviare al problema della mancata individuazione dei calori, spesso si ricorre alla pratica della sincronizzazione degli estri, che permette di razionalizzare l'allevamento con una programmazione degli accoppiamenti e delle nascite e di risolvere quei casi di assenza dell'estro dopo il parto o di estri silenti determinati da diverse cause.

Un altro fattore da considerare è che al momento del parto, l'apertura del canale cervicale, lo stress della bovina e la presenza degli annessi fetali, possono far insorgere processi infiammatori, come metriti ed endometriti, in grado di incidere sul tasso di fertilità riducendolo del 5-10%; risulta perciò opportuno far partorire le bovine in luoghi idonei dal punto di vista igienico e con le dovute precauzioni sanitarie nella manualità.

Inoltre, nel caso di parti difficili, sono maggiori le probabilità di provocare lesioni, specie se si effettuano manovre poco corrette, che possono avere delle ripercussioni sull'efficienza riproduttiva dell'animale.

Il completamento dell'involuzione dell'utero, pertanto, non avviene prima dei 30-35 giorni dal parto. Le fecondazioni eseguite prima del 40° giorno dal parto hanno dato una percentuale di gravidanza pari al 30% (Valpreda, 1983), in quanto gli spermatozoi e l'ovulo non trovano ancora l'apparato genitale in condizioni adatte alla loro sopravvivenza.

Considerando che la curva della fertilità sale progressivamente allontanandosi dalla data del parto, conseguentemente all'involuzione dell'utero ed alla diminuzione delle anomalie del tratto riproduttivo, si può ritenere efficace l'intervento praticato al primo calore dopo il 50° giorno dal parto. Un eccessivo prolungamento dell'intervallo parto-prima fecondazione, però, può accrescere le possibilità che si instaurino processi patologici soprattutto a livello ovarico.

Una riduzione della fertilità può anche essere conseguente alla noncuranza nella fase di conservazione, manipolazione, scongelamento del materiale seminale o alla non corretta scelta del luogo di deposizione del seme nell'apparato genitale della bovina.

La manipolazione corretta del seme congelato è un fattore della massima importanza per mantenere inalterato nel tempo il potere fecondante delle cellule spermatiche. Possiamo essere sicuri che non si verifichi alcun danno alle cellule solo al di sotto di temperature di -75°C ; se all'interno delle paillettes si verificano temperature comprese tra -75°C e -35°C , gli spermatozoi possono subire danni strutturali dovuti al formarsi di cristalli di ghiaccio, mentre con temperature superiori a -35°C , si possono riscontrare danni veramente irreparabili, che compromettono il numero di spermatozoi in grado di sopravvivere allo scongelamento e, quindi, la fertilità del seme.

Inoltre, prolungando i tempi di scongelamento non si hanno conseguenze negative, purché non si superino i 15 minuti, e non è mai conveniente scongelare le paillettes all'aria, fra le mani, in tasca o direttamente dentro la vagina della vacca, perché, anche in questo caso, si riduce la sopravvivenza e la fertilità delle cellule spermatiche.

Tuttavia, anche in condizioni ideali, quando il 100% delle bovine è "normale" e gli estri vengono rilevati al 100%, non è detto che si abbia il 100% dei parti. Nel migliore dei casi, solo il 60-70% delle fecondazioni si concludono con la nascita del vitello e la grande maggioranza delle

cause di insuccesso si ha prima del secondo trimestre di gravidanza. Questo è dovuto in parte al mancato concepimento ed in parte alla mortalità embrionale o a quella fetale.

Bishop (1964) ha ipotizzato che la maggior parte della mortalità embrionale e fetale sia dovuta ad anomalie genetiche dell'embrione che causano la sua eliminazione ad un basso costo biologico. Ne deriverebbe che tali perdite sono inevitabili anche in bovine di normale fertilità e che ogni tentativo di prevenire le perdite sarebbe inefficace e persino indesiderabile.

1.5 Il Seme Sessato

Il sessaggio del materiale seminale risulta molto importante dal punto di vista economico, in quanto rappresenta una tecnica potenzialmente efficiente di pre-selezione del sesso, i cui benefici possono riguardare gli allevatori interessati sia al latte che alla carne, potendo aumentare la pressione di selezione sulla linea femminile, incrementando il numero di femmine per la rimonta, e potendo controllare e ridurre i difetti genetici legati al sesso (Galli et al., 2003).

Numerose tecnologie si susseguirono nel corso degli anni per il raggiungimento di tale scopo, ma, attualmente, la citofluorimetria a flusso per separare i cromosomi X e Y è considerata la sola tecnica affidabile che è stata usata con successo per la commercializzazione di seme sessato (Frijters et al., 2009).

Nei Mammiferi, i soggetti maschili possiedono un cromosoma X ed uno Y, mentre quelli femminili possiedono due cromosomi X. Dall' unione casuale di gameti maschili e femminili deriverà quindi una prole maschile e/o femminile.

La pre-selezione del sesso non può, infatti, prescindere dal meccanismo di determinazione dei sessi nei mammiferi, legato alla presenza di due cromosomi sessuali: XX per la femmina e XY per il maschio. Dal momento che gli oociti dei mammiferi non possono che essere portatori del cromosoma X, sono gli spermatozoi a determinare il sesso dei nascituri: se lo spermatozoo che feconda l'ovocellula porta il cromosoma X nascerà una femmina, se porta il cromosoma Y nascerà un maschio.

Il citofluorimetro a flusso è un sistema che consiste di uno o più raggi laser, di un complesso fluidico che immette le cellule da analizzare in un flusso di liquido isosmotico, di una serie di rilevatori di luce (fotodiodi e/o fotomoltiplicatori) e di un computer per l'analisi dei dati in tempo reale. L'analisi si basa sulla valutazione della luce emessa dalle cellule in esame una volta che incontrano sul loro percorso il raggio laser (Galli et al., 2003).

Il primo passaggio di questa procedura è diluire lo sperma fino a concentrazioni molto basse e colorare gli spermatozoi con una tintura fluorescente (Thorbahn, 2008), usando dei coloranti che non nuocano alla vitalità cellulare né al potere fecondante degli spermatozoi.

Il campione viene, poi, fatto passare attraverso il citofluorimetro a flusso; a causa della maggior grandezza dei cromosomi X, gli spermatozoi femminili emettono una fluorescenza leggermente maggiore rispetto a quelli maschili, che possiedono il cromosoma Y, più piccolo e che contiene circa il 3,8% in meno di DNA (Fig. 8).

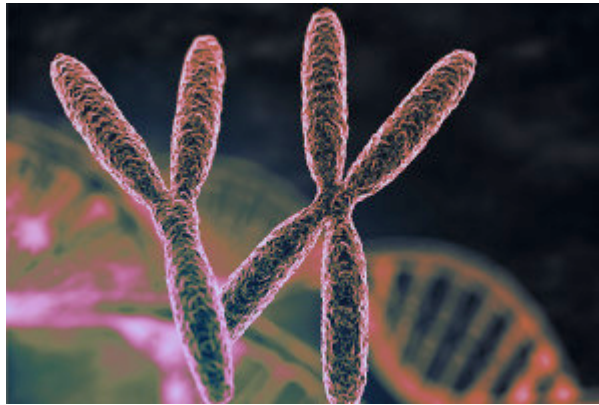


Fig. 8 *Differenze tra un cromosoma X ed un cromosoma Y*

A questo punto, un raggio laser colpisce la sostanza colorata ed assegna una carica positiva alla X ed una carica negativa alla Y. Successivamente, placche elettricamente cariche dividono il singolo flusso in tre flussi differenti (Fig. 9): le particelle con carica positiva, contenenti il sesso femminile, vengono deviate da una parte del congegno e andranno poi a costituire il seme sessato, le particelle con carica negativa, contenenti l'altro sesso, vanno nella direzione opposta, mentre le gocce senza cariche, contenenti spermatozoi misti o non identificati, passano dritte attraverso la macchina (Thorbahn, 2008).

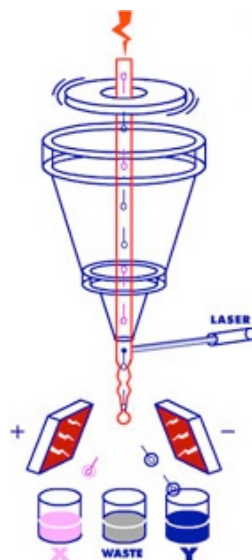


Fig. 9 *Schema di funzionamento di un citofluorimetro a flusso*

Questa procedura, comunque, ha ancora diversi limiti, tra cui un livello di purezza del 90%, che lascia quindi il 10% di sesso indesiderato disponibile a competere per la fecondazione (Sandionigi e Praderio, 2001-2003).

Inoltre, il numero di nemaspermi presenti in una dose fecondante è notevolmente ridotto rispetto a quello mediamente contenuto in una dose di sperma non sessato: 2 milioni di spermatozoi nel seme sessato rispetto a 10-20 milioni in quello convenzionale (Garner, 2006).

Quest'aspetto da solo è già in grado di condizionare la fertilità di tale sperma, senza considerare eventuali alterazioni morfo-funzionali che possono avvenire durante i delicati processi che sottintendono alla normale capacità fecondante degli spermatozoi, quali reazione acrosomiale e metabolismo mitocondriale, che potrebbero venire alterati dal processo di sessaggio e congelamento (Sandionigi e Praderio, 2001-2003).

Oltre a questo, una ridotta percentuale di concepimento è l'ostacolo principale alla diffusione del seme sessato. Il sessaggio del seme, infatti, è un procedura particolarmente invasiva che impatta negativamente sulla vitalità degli spermatozoi e sulla longevità, rispetto alla normale crioconservazione del seme.

A causa della forma piatta delle teste degli spermatozoi bovini, solo circa il 30% di essi sono correttamente orientati nel flusso e metà di loro sono femmine. Ne consegue che solo il 15% degli spermatozoi messi nella macchina sono recuperati come prodotto sessato vendibile.

I tori selezionati per il sessaggio devono, quindi, essere molto fertili. Non tutti i tori reagiscono bene alle manipolazioni del processo di sessaggio, perciò è necessario avere un'ampia scelta di riproduttori in modo da indirizzare al sessaggio solo quelli a fertilità elevata.

Poiché il processo ha dei tempi di lavorazione piuttosto lunghi, la commercializzazione del seme sessato è possibile solo con un numero molto basso di spermatozoi per dose; inoltre, anche l'elevato costo del macchinario per la citofluorimetria a flusso e la necessità di laboratori altamente specializzati per il sessaggio implicano una spesa notevole e lunghi tempi di ammortizzamento, che si traducono inevitabilmente in un aumento del costo delle dosi di seme sessato di circa tre volte rispetto al seme convenzionale (Sandionigi e Praderio, 2001-2003; Thorbahn, 2008).

1.6 La Diagnosi di Gravidanza

Un'accurata diagnosi di gravidanza è di fondamentale importanza per conseguire e mantenere una performance riproduttiva ottimale. È, infatti, desiderabile per l'allevatore sapere il più presto possibile se una bovina fecondata non è gravida, così che possa essere fecondata di nuovo con il minimo ritardo.

Il ritorno o non ritorno in estro 21 giorni dopo la fecondazione è naturalmente il primo metodo di distinzione fra bovine non gravide e bovine gravide. Durante la gravidanza il prodotto del concepimento ha, difatti, la capacità di inibire la regressione del corpo luteo, impedendo il ritorno in calore della bovina.

L'assenza delle manifestazioni estrali, dopo l'intervento di fecondazione, è largamente utilizzata dagli allevatori quale indice di gravidanza, ma l'attendibilità del metodo dipende dall'accuratezza del riconoscimento dell'estro, e spesso la bovina può non andare in calore anche a causa di disturbi ovarici, come cisti, per effetto di un riassorbimento embrionale che ha sfalsato il ciclo, oppure perché è maturato un altro follicolo ma non si notano segni esterni (calore silente).

I metodi clinici si basano sulla capacità di evidenziare l'embrione, il feto, le membrane fetali ed i fluidi fetali, e comprendono l'ispezione per via rettale e le tecniche ecografiche.

L'ispezione rettale è un metodo correntemente utilizzato per la diagnosi di gravidanza nella bovina. La tecnica prevede la palpazione dell'utero, attraverso la parete del retto, per apprezzare la dilatazione delle strutture e la presenza del feto e delle membrane fetali.

Questo metodo è accurato e fornisce un risultato immediato, ma nell'animale all'inizio della gravidanza, le corna uterine possono essere percepite di dimensione e diametro all'incirca uguali; è possibile rilevare una differenza solo a partire dal 40° giorno di gravidanza.

Se a partire dal 30° giorno si solleva una piega della parete uterina e poi la si lascia andare, si può percepire la sensazione di due strati di tessuto che scivolano tra le dita; questo cosiddetto scivolamento della membrana è dovuto alla presenza del corion-allantoide all'interno del corno. La prima ispezione rettale viene, perciò, eseguita generalmente a 35-42 giorni dall'inseminazione.

Se la bovina è gravida, alla fine della quinta settimana è possibile riconoscere, nel corno uterino corrispondente all'ovaio con il corpo luteo gravidico, il piccolo sacco amniotico; dalle sei alle otto settimane, poi, la differenza nella misura delle corna si fa molto marcata, e a dieci settimane (Fig. 10) il diametro del corno gravido diventa fino a sei volte maggiore di quello del corno non gravido. A partire dalla dodicesima settimana il diametro del corno gravido può essere di 10 cm o più ed è facilmente palpabile.

Man mano che l'utero gravido diventa più grosso e più pesante, comincia ad affondare al di sotto del margine pelvico e, a partire dal quinto mese, può non essere più palpabile; solo quando il feto è ulteriormente cresciuto, fino al settimo mese, può essere possibile sentirlo di nuovo (Peters e Ball, 1992).

Recentemente, tra i metodi di diagnosi precoce di gravidanza, si è diffuso l'uso dell'ecografia ad ultrasuoni. Due fenomeni legati agli ultrasuoni trovano largo impiego in campo sia umano che veterinario: l'effetto Doppler ed il principio dell'impulso-eco.

L'effetto Doppler si basa sul principio che, quando le onde sonore, emesse da una sorgente, colpiscono degli oggetti in movimento, queste vengono riflesse verso la sorgente stessa. Il dispositivo per la rilevazione della pulsatilità fetale, basato sull'effetto Doppler, è costituito da un trasduttore e da un amplificatore di segnale. Il trasduttore (sonda ecografica) viene appoggiato sulla parete addominale o inserito nel retto ed emette una serie di impulsi ad alta frequenza, gli ultrasuoni; i movimenti del cuore fetale, il flusso sanguigno del feto (vasi ombelicali) e quello materno (arterie uterine) modificano la frequenza delle onde ultrasonore riflesse verso la sonda, che li amplifica in suoni udibili e luminosi.

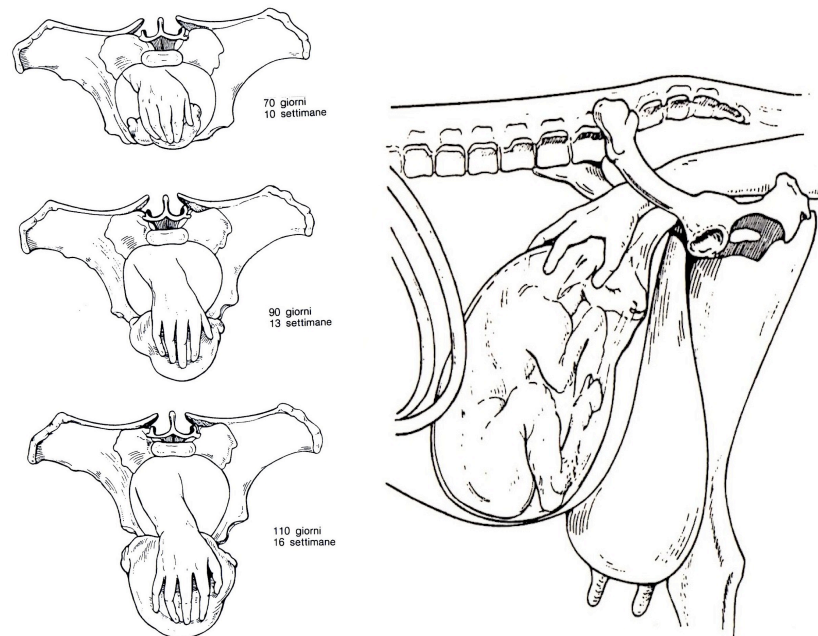


Fig. 10 Diagnosi di gravidanza mediante palpazione rettale a 10, 13, 16 settimane e verso il termine della gravidanza. Ridisegnato da Arthur, Noakes e Pearson (1982)

Nell'ecografia pulsatile, invece, gli impulsi di ultrasuoni, generati da un cristallo piezoelettrico all'interno della sonda, quando incidono sui tessuti con diverse impedenze (resistenza acustica alla trasmissione) vengono in parte riflessi, con un effetto eco, ed in parte trasmessi verso la sonda trasduttrice, dove vengono convertiti in segnale elettrico, che viene successivamente visualizzato da un oscilloscopio attraverso varie metodiche. La procedura maggiormente usata negli ecografi è l'ecografia B Mode in tempo reale (o ultrasonografia), che produce una precisa immagine bidimensionale della sezione dei tessuti molli; con questo metodo è possibile evidenziare ogni movimento del tessuto in esame.

Per effettuare l'ultrasonografia dell'utero, la sonda è posta sulla parete ventrolaterale dell'addome o nel retto del soggetto da esaminare; le immagini dei tessuti vengono riprodotte su un monitor sia come immagini scure (non ecogene), sia con variazioni di grigio (ecogene). La vescica

urinaria, la vescicola embrionale ed i fluidi fetali appaiono neri; la struttura scheletrica del feto bianca, mentre le membrane fetali ed i tessuti materni appaiono con variazioni di grigio.

Tra i molti servizi che la tecnica ultrasonografica può offrire, vi è anche la determinazione del sesso fetale. La tecnica attualmente in uso è quella descritta da Sandra Curran nel 1989, che si basa sulla determinazione della posizione del tubercolo genitale. È determinante conoscere l'anatomia fetale dei primi 3 mesi di gravidanza e avere tre riferimenti anatomici: la testa fetale, il battito cardiaco fetale e la posizione del cordone ombelicale.

Quando il feto è stato localizzato al centro del monitor, queste tre strutture debbono essere individuate. La valutazione deve iniziare dal cranio fetale e procedere caudalmente analizzando il tratto cervicale e toracico, dove viene valutata la presenza e l'entità del battito cardiaco, verificando se a livello retrombelicale è presente il tubercolo genitale maschile; se questo viene evidenziato, l'esame si interrompe, mentre se ciò non accade, bisogna spostare la sonda caudalmente per verificare la presenza del tubercolo genitale femminile sotto la coda.

La determinazione del sesso viene, pertanto, effettuata esclusivamente in funzione della posizione definitiva del tubercolo genitale: retrombelicale nel maschio (Fig. 11a), sotto la coda in regione perineale nella femmina (Fig. 11b).

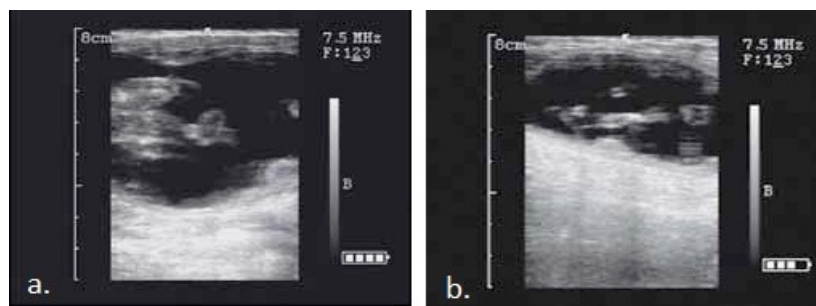


Fig. 11 a. *Tubercolo genitale nel maschio; b.* *Tubercolo genitale nella femmina*

Il tubercolo genitale inizia la sua migrazione intorno al 45° giorno di gravidanza, raggiungendo la posizione definitiva al 55° giorno; prima del 55° giorno di gravidanza è, perciò, sconsigliabile la determinazione del sesso, per la presenza di un tubercolo ancora in migrazione.

Nelle bovine da latte la migliore visione del tubercolo genitale si ha, quindi, tra i 60 ed i 95 giorni di gravidanza; oltre i 90 giorni, la dimensione del feto ed il suo spostamento ventrale rendono più difficile la determinazione del sesso.

In conclusione, l'accuratezza della tecnica è elevata (99,9 % per un veterinario esperto) ed il sessaggio fetale è un esame semplice e di grande utilità in qualunque condizione di allevamento.

2. Obiettivi

Questo lavoro di tesi fa parte del progetto “Heifer Plus”, nel quale il Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, dell’Università Degli Studi di Padova, collabora con Intermizoo (Istituto Interregionale per il Miglioramento del Patrimonio Zootecnico).

Intermizoo è da sempre molto attento a tutte le problematiche che riguardano la fertilità dei riproduttori, sia a livello di laboratorio, sia in campo ponendo molta attenzione alla qualità del materiale seminale prodotto. Tutto ciò, è frutto di un’accurata attenzione sul benessere dei tori in riproduzione, sui controlli di laboratorio, sulla garanzia della catena del freddo, e sul controllo della motilità e della vitalità degli spermatozoi raccolti.

Le motivazioni che hanno portato a questo lavoro di tesi sono state quelle legate ad un interesse di Intermizoo, che dopo essere stato contattato dalla Emlab Genetics, una azienda chimica statunitense, la quale ha brevettato il prodotto denominato “Heifer Plus”, ha deciso di sperimentare tale prodotto e verificarne in Europa, come negli Stati Uniti, l’effetto sulla fertilità e sulla purezza del materiale seminale trattato. Il prodotto, la cui composizione per motivi brevettuali non è nota, è un additivo per il seme in fase di lavorazione, il cui effetto, come dichiarato dalla ditta produttrice, aumenta del 10% il tasso di gravidanza e del 20% la percentuale di figlie femmine.

Sulla base di quanto detto, l’obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di organizzare una prova di campo di tipo sperimentale, tale da poter verificare la fertilità e la purezza del prodotto in aziende zootecniche specializzate da latte, del territorio del Nord Italia.

3. Materiale e Metodi

3.1 Organizzazione della prova

Secondo il protocollo studiato con i tecnici di Intermizoo, sono stati individuati 5 riproduttori di razza Frisona Italiana, di cui tre genomici (Brasileiro, Galactico, Panamero) e due provati con figlie (Milito e Savoia).

Avendo a disposizione per la prova 1000 dosi di seme, per ciascuno di essi sono state prodotte 100 dosi non trattate, con il metodo tradizionale, e 100 dosi trattate secondo il metodo "Plus", con concentrazione doppia rispetto alle precedenti.

Le dosi dello stesso toro, a seconda del tipo di lavorazione, sono state distinte per il diverso colore della paillette: mastice per le dosi non trattate e viola scuro per le dosi trattate, in modo tale da impedire all'allevatore di riuscire a distinguere la diversa lavorazione.

Nella stessa azienda il toro doveva essere utilizzato in egual numero di dosi, sia nella versione convenzionale, sia nella versione "Plus". Inoltre, è stato stabilito che il pacchetto minimo di dosi da distribuire per azienda doveva essere di 20 dosi per toro (10 non trattate + 10 trattate).

Per quanto riguarda la scelta delle aziende che hanno partecipato alla prova, sono stati individuati 12 agenti, ai quali è stato dato l'incarico di indicare una o due (massimo tre) aziende ciascuno. Requisito fondamentale era che gli allevatori coinvolti nel progetto fossero abbastanza tecnologici e precisi nella registrazione dei dati di fecondazione, delle diagnosi di gravidanza e di eventuali ritorni in calore, riassorbimenti, ecc, oltre che particolarmente accorti nel seguire le procedure del protocollo che gli veniva fornito.

Come altra prerogativa nella scelta delle aziende è stato stabilito che ciascuna di esse doveva gestire almeno 100 vacche Frisone in mungitura e possibilmente doveva far riferimento ad un veterinario in grado di eseguire la visita ecografica per la determinazione precoce del sesso del feto, in modo tale da ridurre i tempi della prova.

Detto ciò, ai fini di ridurre al minimo i possibili effetti ambientali, sono state selezionate 26 aziende del Nord Italia; di queste, 18 sono situate in Lombardia, di cui 8 in provincia di Mantova, 3 in provincia di Lodi, 3 in provincia di Milano, 2 in provincia di Brescia e 2 in provincia di Cremona, 7 sono localizzate in Veneto, suddivise tra le province di Verona, Treviso, Padova e Venezia, ed una sola azienda è ubicata in Emilia Romagna, precisamente in provincia di Parma.

A ciascuna di queste aziende è stato distribuito un fascicolo, contenente il protocollo delle procedure applicative e tante schede da compilare (Allegato 2) quante erano le dosi per toro acquistate dall'azienda.

Il protocollo applicativo specificava come utilizzare il seme e quali dati rilevare. In particolare, il seme doveva essere utilizzato preferibilmente solo nei primi interventi di fecondazione; qualora si fosse utilizzato il seme di una paillette mastice in una manza, parallelamente doveva essere utilizzato il seme di una paillette viola in un'altra manza, e analoga procedura doveva essere adottata per le vacche. Inoltre, si richiedeva di usare il seme possibilmente entro un mese dalla distribuzione.

La diagnosi ecografica precoce del sesso doveva rigorosamente essere effettuata in un periodo tra il 65° e l'85° (massimo 90°) giorno dalla fecondazione, poiché oltre il 90° giorno, la dimensione del feto ed il suo spostamento ventrale rendono quasi impossibile la determinazione del sesso.

Per quanto riguarda la registrazione dei dati, si faceva notare quanto fosse importante riportare con precisione, nelle apposite schede allegate al protocollo, i seguenti dati, facendo attenzione a trascriverli correttamente nella casella relativa al toro ed al colore della paillette usata:

- Manza/Vacca
- Numero aziendale dell'animale
- Data dell'intervento di fecondazione
- Numero dell'intervento di fecondazione
- Se l'intervento è avvenuto in seguito a calore naturale o sincronizzazione
- Eventuale data del ritorno in calore
- Data della 1^ diagnosi di gravidanza
- Data della 2^ diagnosi ecografica e sesso del vitello

3.2 Centro Tori e descrizione dei tori usati

Il centro tori di Intermizoo è situato nell'azienda Vallevicchia di Veneto Agricoltura a Brussa di Caorle (Venezia), dove dal 2002 sono state trasferite le stalle di attesa e da Agosto 2011 tutta l'attività di prelievo, lavorazione e stoccaggio del seme con la costruzione delle nuove stalle dei tori in produzione e del nuovo laboratorio.

Nelle due stalle di attesa sono allevati circa 300 riproduttori in attesa di valutazione. In queste stalle, gli animali vengono allevati per circa 4 anni dopo la distribuzione delle dosi per la prova di progenie; di questi riproduttori, solo una piccola parte, dal 2 al 5 %, ottiene la promozione a "toro miglioratore". In questa fase, gli animali vengono alimentati in modo da soddisfare i fabbisogni di crescita e maturazione ed una particolare attenzione viene posta al contenimento degli infortuni.

La nuovissima stalla di produzione è stata progettata per poter essere gestita in completo isolamento dall'esterno in caso di emergenza sanitaria, ed è condizionata nel periodo estivo, per garantire il massimo comfort dei tori (Fig. 12).



Fig. 12 *Interno della stalla di produzione del Centro Tori Intermizoo*

Nella stalla di produzione alloggiano tre distinte tipologie di tori:

- i torelli giovani, i quali rimangono il tempo necessario per produrre il seme per le prove di progenie, e per lo stoccaggio cautelativo (4000 dosi in tutto);
- i tori genomici, cioè tori giovani con un alto valore genetico testato attraverso il DNA;
- i tori Provati Miglioratori, i veri protagonisti di questa struttura; per loro sono disponibili 18 box singoli.

Attorno a questi soggetti “speciali” ruota tutta l’attività della struttura. Gli obiettivi perseguiti sono: l’altissima qualità del seme prodotto, un numero di dosi sufficiente a soddisfare le richieste del mercato e dei requisiti sanitari che rendano tutto il seme prodotto, disponibile in qualsiasi momento, per l’export in qualsiasi paese nel mondo.

La stalla di produzione è attrezzata per la fase di salto e per la raccolta del materiale seminale. Questa operazione è svolta attualmente tre giorni a settimana con circa 20 tori per ogni giorno di prelievo. Adiacente alla zona di prelievo c’è il laboratorio, in cui il seme viene analizzato, confezionato e stoccato prima della commercializzazione.

L’entrata dei torelli al Centro Genetico è fissata a 6-9 mesi di età. Nei 30 giorni precedenti l’introduzione nei locali di quarantena, il torcello deve essere stato obbligatoriamente sottoposto, ed essere quindi scortato dalla documentazione sanitaria ufficiale, a:

- intradermotubercolizzazione con esito negativo;
- prova sierologica negativa per Leucosi Bovina Enzootica;
- prova sierologica negativa per Brucellosi;

- prova sierologica negativa per il virus BHV1 (IBR, IPV) con metodo Elisa e con metodo sieroneutralizzazione;
- provenire da allevamento ove non siano in corso malattie contagiose e non sottoposto a provvedimenti di Polizia Veterinaria;
- non presentare sintomi di malattie cutanee infettive (rogna o tricofitosi);
- non presentare segni clinici di malattia il giorno del carico;
- pervenire al Centro Genetico su mezzo autorizzato, lavato e disinfettato.

All'arrivo, il veterinario esamina la documentazione sanitaria ed esegue la visita dei soggetti sull'automezzo. I torelli per prima cosa vengono pesati ed il peso dovrà essere almeno uguale o superiore alla media dei soggetti di pari età, diminuita di una deviazione standard; se il peso risulta inferiore, il torello non viene ammesso al Centro.

Dopodiché, i torelli vengono inviati in una stalla di isolamento, dove restano in gruppo per circa 35 giorni e, alla fine della quarantena, possono essere trasferiti al Centro Genetico.

Nel periodo di isolamento, il soggetto viene sottoposto ai controlli previsti dalle normative sanitarie:

- intradermotubercolizzazione;
- prova sierologica per Brucellosi;
- prova sierologica per Leucosi Bovina Enzoistica;
- prova sierologica per il virus BHV1 (IBR, IPV) con il metodo ELISA e con il metodo Sieroneutralizzazione;
- prova per isolamento virus BVD;
- prova colturale per *Compilobacter Faetus* su campione di lavaggio prepuziale;
- esame microscopico per *Tricomonas Faetus*;
- chemioprofilassi per leptospirosi.

Le prove sierologiche per Leucosi, Brucellosi ed IBR vengono ripetute a distanza di 21 giorni. Il soggetto che risulta positivo, anche in una sola delle prove previste, deve essere immediatamente allontanato dal Cento Genetico ed inviato al macello.

Recenti studi sul controllo del corredo cromosomico hanno permesso di riscontrare che bovine portatrici di anomalie cromosomiche presentavano una ridotta fertilità; da ciò è emersa l'importanza di non adibire alla riproduzione tori portatori di anomalie.

In particolare, tutti i tori appartenenti al Centro Genetico devono necessariamente non essere portatori di determinati geni recessivi relativi ad alcune importanti patologie.

Il BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) è una patologia congenita di origine genetica che porta i vitelli alla morte per la mancanza di un enzima, responsabile di far aderire gli anticorpi agli antigeni; i vitelli con BLAD sono in pratica senza anticorpi e muoiono per banali infezioni gastroenteriche e/o respiratorie. Tutti i tori che hanno tra i loro ascendenti animali portatori del BLAD (tori con il suffisso “BL”) devono essere testati perché, se portatori non possono essere adibiti alla fecondazione artificiale; al contrario, nel caso non fossero portatori, vengono classificati con il suffisso “TL”.

Il CVM (Complex Vertebral Malformation) è un difetto congenito recessivo di origine genetica che comporta la nascita di vitelli prematuri con colonna vertebrale deviata nel tratto cervicale e toracico, artrogrifosi, difetti alle articolazioni nella parte distale di tutti quattro gli arti, difetti cardiaci e difetti alla regione addominale. Ai soggetti testati portatori viene applicata la sigla "CV", mentre ai soggetti testati non portatori sarà applicata la sigla "TV".

La sindrome della Brachispina, invece, consiste in una malformazione caratterizzata dalla nascita di vitelli morti, che presentano uno sviluppo scheletrico anomalo, sia dal punto di vista della crescita che della proporzione di differenti parti anatomiche. Il peso è limitatissimo (da 6,4 a 13,6 kg) ed i soggetti mostrano ridottissima lunghezza del tronco, normale lunghezza degli arti e, a volte, la testa sembra incastonata fra le spalle. Come per tutti i caratteri indesiderati, per evitare la diffusione della malformazione nella razza, è importante applicare un piano di profilassi genetica, mediante individuazione dei portatori e divieto di nuove introduzioni in F.A., testando i tori in modo da evitare accoppiamenti a rischio. In questo caso, la sigla “BY” identifica i tori testati portatori del gene, mentre la sigla “TY” quelli testati non portatori del gene.

Infine, il Sindattilismo ereditario bovino, chiamato anche "piede di mulo" o "mule foot", è un carattere recessivo che colpisce i bovini. I soggetti con la malformazione hanno uno o più piedi con i due unghia fusi in un unico dito, da cui ne deriva il nome “piede di mulo”. Anche in questo caso, tutti i tori che hanno tra i loro ascendenti animali portatori del Sindattilismo devono essere testati: ai soggetti portatori del gene viene applicata al nome la sigla “MF”, mentre ai soggetti non portatori la sigla “TM”.

Per la prova del seguente lavoro di tesi, sono stati scelti cinque tori: Milito e Savoia, tra i tori provati, e Brasileiro, Galactico e Panamero, tra i tori genomici.

“Spinal Prince Milito TV TL TY”, noto più semplicemente come Milito (Fig. 13), è figlio di Prince con mamma Oman e nonna Skywalker, dai quali ha ereditato alcune caratteristiche peculiari quali la crescita costante in termini di produzione delle figlie nel passaggio da primipare a pluripare; è un forte miglioratore per tutti i caratteri funzionali ed un toro molto moderno (Allegato 3).

“Bas Farm Prince Savoia TM”, noto come Savoia (Fig. 14), altro figlio di Prince su mamma Ford e nonna Tugolo, è un ottimo fuorilinea molto bilanciato, anch' esso miglioratore dei caratteri funzionali (Allegato 4).

“Kns Brasileiro ET TV TL TY” (Fig. 15) è un toro genomico da Balisto x Epic x Man-Oman, particolarmente forte sui dati produttivi e con una morfologia ben bilanciata (Allegato 5).

“Galactico ET TV TL TY” (Fig. 16) è anch'esso un toro genomico da Galaxy x Bookem x Shottle, molto forte sulla morfologia e sui caratteri funzionali (Allegato 6).

“Panamero ET TV TL TY” (Fig. 17), toro genomico da Mardi Gras x Epic x Goldwyn, è molto forte sulla longevità e sulle cellule somatiche(Allegato 7).

Nel complesso, si è trattato di un gruppo di tori con ottime caratteristiche tecniche ed un buon consenso commerciale.



Fig. 13 *Milito*



Fig. 14 *Savoia*



Fig. 15 *Brasileiro*



Fig. 16 *Galactico*



Fig. 17 *Panamero*

3.3 Raccolta dei Dati

La distribuzione delle dosi alle aziende coinvolte nella prova sperimentale, con il relativo fascicolo, è iniziata verso la fine di Febbraio 2016.

Considerando che era stato richiesto agli allevatori di usare le dosi entro un mese dalla distribuzione e che la diagnosi ecografica del sesso doveva essere effettuata al massimo entro il 90° giorno dalla fecondazione, si era previsto di iniziare la raccolta dei dati verso la fine del mese di Giugno, ma poiché non tutti gli allevatori sono riusciti a rispettare tale scadenza, si è deciso di frazionare la raccolta dei dati in due parti.

Inizialmente è stata raccolta la maggior parte dei dati riguardanti la fertilità del seme, che comprendeva la prima diagnosi ecografica o eventuali ritorni in calore, mentre in un secondo momento sono stati conferiti i dati della seconda diagnosi di gravidanza, con relativo sessaggio del feto, ed eventuali dati che non erano ancora stati pervenuti.

Come si può osservare dalla Tabella 4, su 1000 dosi distribuite, soltanto 850 sono state utilizzate; delle restanti 150 dosi, 90 non sono state utilizzate per svariati motivi, tra cui la perdita, mentre le altre 60 dosi appartengono a due aziende che non hanno concesso alcun dato.

Sul totale delle bovine fecondate, 547 sono state diagnosticate, mentre 240 sono ritornate in calore prima della diagnosi; tra le bovine diagnosticate, 316 sono risultate gravide. Oltre a questo, si sono verificati 9 riassorbimenti e 9 aborti, 13 bovine sono state vendute, di cui 11 senza diagnosi di gravidanza e 2 con diagnosi, ed una bovina è morta.

Per quanto riguarda la diagnosi ecografica (Tab. 5), non tutte le aziende sono riuscite a distinguere il sesso del feto, perciò soltanto 221 sono andate a buon fine; tra queste, 5 sono gravidanze gemellari. Tuttavia, in totale sono emersi 108 maschi e 118 femmine.

Su 850 bovine inseminate, 649 erano vacche e 148 erano manze (Tab. 6); le restanti 53 non sono state identificate. Inoltre, 481 sono state fecondate in seguito a calore naturale e 299 mediante sincronizzazione, ed anche in questo caso, le restanti 70 fanno parte dei dati classificabili come mancanti (Tab. 7).

Soltanto 468 bovine sono state inseminate al 1° intervento fecondativo, come richiesto nel protocollo, mentre delle altre, 183 sono state inseminate al 2° intervento, 103 al 3° e 43 bovine oltre il 4° intervento (Tab. 8).

Inoltre, la Tabella 9 mostra come sono state usate le diverse dosi, sia per quanto riguarda il toro sia per quanto riguarda il tipo di dose (trattata o non trattata): 424 sono state le dosi color mastice, non trattate, e 415 quelle viola, trattate con il prodotto “Heifer Plus”.

Le Tabelle 10, 11, 12 e 13, invece, illustrano la frequenza d’uso delle dosi nelle varie aziende coinvolte nella prova, suddividendola per tipo di toro, tipo di dose e per categoria.

In particolare, la tabella 11, relativa all’utilizzo delle dosi in funzione del toro, mostra come siano state usate più dosi appartenenti a Milito (179 dosi) rispetto agli altri tori coinvolti nella prova, che si sono aggirati attorno a valori di 166-170 dosi.

3.4 Analisi Statistica dei dati

L’analisi statistica è stata effettuata utilizzando sia il Test del Chi-Quadrato, che la regressione logistica mediante il package statistico (SAS Institute. 2002–2010).

Il Test del Chi-Quadrato è stato usato per esaminare l’associazione tra variabili di tipo qualitativo (o categoriche) che nel nostro specifico caso erano rappresentate da: categoria a cui appartiene la bovina (vacca o manza), tipo di calore (naturale o sincronizzato), numero di intervento fecondativo (1°, 2°, $\geq 3^\circ$), toro (5 differenti tori), tipo di dose (“mastice” dose non trattata e “viola” dose trattata con protocollo Heifer Plus), diagnosi di gravidanza (positiva o negativa) e sesso fetale (maschio o femmina).

L’analisi logistica, invece, è stata usata per studiare l’effetto di diverse variabili indipendenti sulle due variabili dipendenti, obiettivi del presente lavoro, ovvero: tasso di gravidanza e rapporto tra i sessi. L’effetto delle variabili indipendenti è stato valutato utilizzando le stime e gli intervalli di confidenza degli *Odds Ratio* (OR), una misura moltiplicativa della probabilità che varia da 0 ad infinito.

I valori di OR superiori a 1 indicano una maggior probabilità di ottenere una diagnosi di gravidanza positiva o un parto con la nascita di una vitella, mentre valori di OR inferiori a 1

indicano una maggior probabilità di ottenere una diagnosi di gravidanza negativa o un parto con la nascita di un vitello maschio, in confronto ad un " riferimento", riassunto nell'intercetta del modello di regressione logistica.

Per stimare OR, è stata effettuata un'analisi di regressione logistica, utilizzando il seguente modello lineare:

$$\ln\left[\frac{\pi(x)}{1-\pi(x)}\right] = \mu + \sum_{i=1}^{24} b_{1i}HERD + \sum_{k=1}^2 b_{2k}DOSE_Type_k + \sum_{j=1}^3 b_{3j}N_FA_j + \sum_{l=1}^3 b_{4l}V_M_l + \sum_{m=1}^5 b_{5m}BULL_m$$

dove $\ln\left[\frac{\pi(x)}{1-\pi(x)}\right]$ è il logit di x ($x=1$ per diagnosi di gravidanza positive oppure per la nascita

di una vitella, $x=0$ per diagnosi di gravidanza negative o per la nascita di un vitello maschio) e $\pi(x)$ è la probabilità di ottenere una diagnosi di gravidanza positiva o la nascita di una vitella femmina; μ è l'intercetta del modello che esprime l'animale di riferimento.

Nell'intercetta del modello, quali riferimenti per ciascuno effetto sono stati considerati per l'allevamento (Azienda 17), per il tipo di dose (Viola), per il numero di interventi fecondativi (livello $\geq 3^\circ$), la categoria (Vacca) e il toro (Savoia).

4. Risultati e Discussione

Le statistiche descrittive riportate in Tabella 4 mostrano come su 850 bovine inseminate, ci siano state 547 diagnosi di gravidanza, di cui 316 positive e 534 negative, facendo così emergere, nel totale delle aziende coinvolte nella seguente prova sperimentale, un tasso di gravidanza medio del 37,18%.

Analizzando, la Tabella 14 si può, però, notare una differenza nel tasso di gravidanza ottenuto con l'uso di seme convenzionale non trattato (paillette color "mastice") rispetto a quello ottenuto con seme trattato mediante il prodotto "Heifer Plus" (paillette "viola"). Nel primo caso, su 500 dosi distribuite tra le varie aziende e 423 bovine inseminate, sono emerse 166 gravidanze, facendo così registrare un tasso di gravidanza del 39,24%; nel secondo caso, invece, su 500 dosi distribuite e 414 bovine inseminate, 150 sono state le diagnosi positive, perciò si è riscontrato un tasso di gravidanza del 36,23%.

L'ipotesi iniziale di un aumento del tasso di gravidanza del 10% in seguito all'utilizzo dell'additivo "Heifer Plus" dichiarato dall'azienda produttrice, non è pertanto stata confermata, bensì si è verificata una riduzione di fertilità del seme trattato rispetto a quello convenzionale, che è per di più apparsa mediamente significativa ($P < 0,01$) al Test del Chi-Quadrato.

La fertilità del seme sessato ottenuta nella prova condotta da Cerchiaro (2007) era considerevolmente più elevata (leggermente superiore al 50%) rispetto a quella ottenuta in questa prova con l'uso del prodotto "Heifer Plus". Valori del 48-57% sono stati riscontrati anche in altri studi sul seme sessato, presentati da Weigel (2004). Ciò può essere dovuto ad una diversa tecnologia di lavorazione del materiale seminale, ma può anche riflettere il calo della fertilità delle vacche da latte che si sta riscontrando da diversi anni a livello globale. Altri studi analizzati da Seidel e Schenk (2002), hanno, invece, riportato un tasso di gravidanza più simile al nostro, che variava dal 31 al 46%.

Nella Tabella 15, viene riportato il tasso di gravidanza ottenuto in funzione del numero di intervento fecondativo; come si può osservare, bovine inseminate al 1° intervento di fecondazione hanno registrato una percentuale di gravidanza superiore di circa il 10% a quella rilevata negli interventi successivi al primo.

In particolare, delle 467 bovine inseminate al 1° intervento, 200 sono risultate gravide, segnando un tasso di gravidanza del 42,83%, a differenza del 2° intervento fecondativo, in cui è apparso un tasso di gravidanza del 33,33% (su 180 bovine inseminate soltanto 60 sono risultate gravide). Per quanto riguarda gli interventi superiori al 3°, 146 bovine sono state inseminate; tra

queste 49 hanno avuto una diagnosi positiva, facendo così registrare un tasso di gravidanza del 33,56%, molto simile al precedente. Tuttavia, secondo il Test del Chi-Quadrato, le differenze riscontrate non sono apparse statisticamente significative ($P>0,05$), per quanto concerne il numero di intervento fecondativo.

Considerando, poi, il diverso tipo di trattamento del seme (Tab. 18), il tasso di gravidanza ottenuto al 1° intervento è risultato del 45,57% nelle bovine inseminate con dose “mastiche” non trattata, circa il 5% in più rispetto a quello riscontrato nelle dosi trattate con “Heifer Plus” (50%) ed anche al 2° intervento si è ottenuto un tasso maggiore nel seme convenzionale (34,83%) rispetto a quello trattato (31,87%); così non è stato per il 3° intervento, in cui si è avuto un tasso di gravidanza maggiore con il seme trattato (35,71%), rispetto al seme convenzionale (31,58%).

Esaminando, invece, il tasso di gravidanza per categoria di bovina (Tab. 16), le manze sono risultate notevolmente più fertili, manifestando un tasso di gravidanza medio del 64,86%, rispetto al 32,71% delle vacche; infatti, su 645 vacche inseminate 211 sono rimaste gravide, mentre su 148 manze inseminate ben 96 hanno dato una diagnosi di gravidanza positiva. Tale esito è apparso altamente significativo ($P<0,001$) al Test del Chi-Quadrato, perciò si può affermare che le manze siano state realmente più fertili rispetto alle vacche e che le differenze riscontrate non siano imputabili al caso.

Se si considera, invece, la diversa lavorazione del materiale seminale (Tab. 19), anche in questo caso si nota una maggior fertilità del seme convenzionale di circa il 10% rispetto a quello trattato con “Heifer Plus”, sia nelle vacche che nelle manze. Difatti, per quanto riguarda le vacche, 324 sono state inseminate con dose convenzionale, di cui 109 sono risultate gravide, facendo segnare un tasso di gravidanza del 33,64%, mentre 321 sono state inseminate con dose trattata, di cui 102 sono risultate gravide, con un tasso leggermente inferiore, del 31,78%; per quanto riguarda le manze, invece, 76 sono state inseminate con dose convenzionale, di cui 53 hanno avuto una diagnosi positiva, facendo registrare un tasso di gravidanza del 69,74%, mentre 72 sono state inseminate con dose trattata, di cui solo 43 sono rimaste gravide, con un tasso del 10% inferiore (59,72%).

Analizzando la Tabella 17, relativa ai tori usati per la prova, Panamero e Brasileiro sono apparsi come i più fertili, con un tasso di gravidanza medio del 43,45% il primo e del 41,76% il secondo, Milito e Savoia hanno registrato entrambi un tasso del 35% circa, mentre Galattico è risultato il meno fertile con il 33,5%. Anche in questo caso, le differenze riscontrate tra i diversi tori sono apparse mediamente significative ($P<0,01$) al Test del Chi-Quadrato.

Tuttavia, Galactico e Savoia sono stati gli unici tori a mostrare un maggior tasso di gravidanza con il seme trattato con “Heifer Plus”, rispetto a quello convenzionale. Infatti, come si può osservare nella Tabella 20, Galactico ha dato un tasso del 34,15% con seme trattato e del 32,94% con seme convenzionale, mentre Savoia ha avuto un tasso del 40% con seme trattato e del 30% con quello convenzionale; al contrario, Milito ha registrato un tasso di gravidanza del 10% superiore con seme convenzionale (40,45%) rispetto al seme trattato (29,55%), Panamero del 13% superiore (50% vs 36,9%) e Brasileiro ha mostrato soltanto una piccola differenza, anche se il seme convenzionale ha dato comunque un tasso di gravidanza superiore (42,35%) rispetto a quello trattato (41,18%).

Le differenze nel tasso di gravidanza tra tori sono ben documentate in letteratura, sia per il seme convenzionale (Donovan et al., 2003), che per il seme sessato (Seidel et al., 1997; Bodmer et al., 2005). Questi risultati suggeriscono, quindi, la necessità di un'attenta selezione dei tori sulla base di accurate analisi della fertilità del seme in condizioni di campo.

Inoltre, come risultato dell'analisi logistica (Tab. 21), facendo riferimento ai fattori considerati come fonte di variazione del tasso di gravidanza, si può affermare che soltanto la categoria e l'allevamento sono apparsi altamente significativo ($P < 0,001$) il primo e statisticamente significativo ($P = 0,0191$) il secondo; pertanto, il tipo di dose, il numero di intervento fecondativo ed il toro usato non hanno alcun effetto sull'esito finale della gravidanza.

L'efficienza riproduttiva, intesa come capacità di una bovina di rimanere gravida e di produrre il maggior numero di vitelli vivi e vitali nel più breve tempo possibile, dipende, infatti, da numerosi fattori, la maggior parte dei quali di tipo ambientale ed imputabili alla conduzione dell'allevamento; tra questi, le condizioni igienico-sanitarie degli animali, il livello nutritivo, la razza, l'età e le tecniche riproduttive adottate (Parigi Bini e Someda De Marco, 1990).

Altro obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di verificare la purezza del sessaggio femminile, in seguito all'utilizzo del prodotto “Heifer Plus”. Dalle statistiche descrittive riportate in Tabella 5, si può osservare come, su 850 inseminazioni e 316 gravidanze, è stato possibile ricavare soltanto 221 diagnosi ecografiche per la determinazione del sesso fetale; di queste 5 erano gravidanze gemellari, perciò è stato possibile sessare 226 feti. Nel totale dei feti, 102 erano maschi singoli, corrispondenti al 47,22% degli ecografati singoli e 114 erano femmine singole, corrispondenti al restante 52,78%, mentre tra le gravidanze gemellari, 4 erano rappresentate da un maschio ed una femmina, ed una sola presentava due maschi; sul totale degli ecografati gemellari, dunque, il 60% erano maschi ed il 40% erano femmine. Nel complesso sono risultati 108 maschi e 118 femmine, e si è riscontrata una purezza generale del sessaggio femminile del 52,21%.

Se si considerano i diversi tipi di dose usata (Tab. 14), si nota un modesto aumento dei feti di sesso femminile con l'utilizzo di "Heifer Plus" rispetto al seme convenzionale non trattato. Infatti, nel caso del seme convenzionale, ci sono state 119 gravidanze ecografate, dalle quali sono risultati 59 maschi singoli, 57 femmine singole e 3 gravidanze gemellari "Maschio+Femmina", per un totale di 122 feti, di cui 60 erano femmine, facendo così registrare un sessaggio femminile del 49,18%; nel caso del seme trattato, invece, ci sono state 102 gravidanze ecografate, dalle quali sono risultati 43 maschi singoli, 57 femmine singole e 2 gravidanze gemellari (una "Maschio+Femmina" ed una "Maschio+Maschio"), per un totale di 104 feti, di cui 58 erano femmine, facendo registrare un sessaggio femminile del 55,77%.

Ne consegue che, sebbene l'ipotesi di un aumento del 20% della percentuale di figlie femmine dichiarato dall'azienda produttrice di "Heifer Plus" non sia stata confermata ed anzi il tasso di purezza sia risultato molto basso rispetto a quello atteso, si è comunque ottenuto un effetto positivo, con un aumento di circa il 7%. Tuttavia, tale risultato non è apparso statisticamente significativo ($P > 0,05$) al Test del Chi-Quadrato, perciò la differenza riscontrata tra seme convenzionale e seme trattato con "Heifer Plus" è imputabile al caso e non c'è nessuna relazione tra il tipo di dose usata e la purezza del sessaggio femminile ottenuta.

In Tabella 15, viene riportata la purezza del sessaggio femminile ottenuta in funzione del numero di intervento fecondativo; come si può notare, si è riscontrata una maggior purezza con interventi di fecondazione uguali o superiori al 3° (66,67%), rispetto ad inseminazioni eseguite al 1° (50,68%) o al 2° (42,50%) intervento. Tale risultato, al Test del Chi-Quadrato, è apparso inaspettatamente statisticamente significativo ($P < 0,05$), anche se probabilmente ciò è dipeso dal fatto di aver avuto una scarsa quantità di informazioni riguardanti le diagnosi ecografiche e tra l'altro sbilanciate sulla prima inseminazione rispetto alle altre; infatti, sia per quanto riguarda il 2° intervento che per quanto riguarda il 3°, sono state raccolte soltanto 36 e 40 diagnosi, sulle rispettive 49 e 60 gravidanze riscontrate, rispetto alle 144 diagnosi ecografiche ottenute sulle 200 gravidanze relative al 1° intervento fecondativo.

Se si considera anche il diverso tipo di trattamento usato (Tab. 18), soltanto interventi uguali o superiori al 3° hanno dato una maggior purezza del sessaggio femminile con seme trattato mediante il prodotto "Heifer Plus" (78,95% vs 55% con seme convenzionale), mentre al 2° intervento si è riscontrato un aumento del 13% nella purezza del seme convenzionale rispetto a quello trattato, e al 1° intervento non si sono notate grandi differenze tra i diversi trattamenti.

Analizzando la Tabella 16, relativa alla purezza del sessaggio femminile in funzione della categoria, non emergono grandi differenze tra la purezza del sessaggio nelle vacche (53,74%), che

hanno avuto 79 femmine su 147 feti ecografati, e quella nelle manze (50%), con 39 femmine su 78 feti. A conferma di ciò, il Test del Chi-Quadrato non ha segnalato differenze statisticamente significative ($P > 0,05$) tra i due gruppi. Esaminando anche la Tabella 19, per quanto riguarda le vacche c'è stato un aumento del 12% della purezza con seme trattato (60,29%) rispetto a quello convenzionale (48,10%), mentre le manze hanno mostrato una minor purezza del sessaggio femminile con il seme trattato (48,57%) rispetto a quello convenzionale (51,16%), anche se la differenza non è apparsa sostanziale (circa un 2%).

Per quanto riguarda i tori usati nella prova (Tab. 17), Savoia, Galactico e Milito sono emersi come miglior tori con una purezza media del sessaggio rispettivamente del 60%, 58,54% e 58,33%, Panamero ha evidenziato una purezza leggermente inferiore (50%), mentre Brasileiro ha avuto una purezza media soltanto del 39%. Tali differenze non sono comunque risultate significative al Test del Chi-Quadrato, perciò si può sostenere che non vi sia una correlazione tra i tori usati e la purezza del sessaggio femminile.

Ciononostante, considerando la diversa lavorazione del materiale seminale (Tab. 20), Galactico e Savoia, a differenza degli altri tori, hanno avuto una maggior purezza con il seme convenzionale rispetto a quello trattato con "Heifer Plus", in contrasto con quanto ci si attendeva. Infatti, Galactico ha registrato una purezza del 59,09% con seme convenzionale, rispetto al 57,89% con seme trattato, e Savoia una purezza del 66,67% nel primo caso e del 54,17% nel secondo, mentre Brasileiro, Milito e Panamero hanno dato una maggior purezza con il seme trattato mediante "Heifer Plus", rispetto a quello convenzionale; tra quest'ultimi, Milito è stato quello che ha riscontrato una maggior differenza nel diverso tipo di dose (circa il 19% in più di purezza con seme trattato).

L'analisi logistica rappresentata in Tabella 22, però, ha confermato che nessun effetto incluso nel modello di regressione logistica ha influenzato in modo significativo la percentuale di figlie femmine, se non per il numero di intervento fecondativo che è risultato statisticamente significativo ($P = 0,0268$); tuttavia, come già dichiarato precedentemente, ciò può essere dovuto ad una limitata numerosità dei dati raccolti sulle diagnosi ecografiche (peraltro sbilanciata sui tre livelli della variabile N_FA), e molto probabilmente con una numerosità superiore tale esito non si sarebbe verificato.

5. Conclusioni

Nell'attuale sistema italiano di valutazione genetica dei riproduttori bovini da latte sono ancora presenti le cosiddette "prove di progenie" classiche, sottoponendo però solo i tori valutati genomicamente (l'indice pedigree usato in passato non viene più utilizzato) appartenenti ad un rank più basso e commercialmente meno interessanti. Pertanto, il metodo delle prove di progenie, quale metodo di selezione dei riproduttori, risulta sempre meno utilizzato e la dimostrazione di tale affermazione è suffragata dalla sensibile riduzione della percentuale di fecondazioni con tori in prova di progenie che è calata in Italia negli ultimi quattro anni dal 17% all' 8% (Intermizoo, comunicazione personale). Oggi, la raccolta dati delle progenie dei tori "genomici", anche per i caratteri legati alla fertilità, ha la funzione di validare i dati della lettura genomica dei padri, aumentandone l'attendibilità.

L'uso del prodotto "Heifer Plus", come additivo nella fase di lavorazione del materiale seminale, nella seguente prova di campo non ha confermato il risultato atteso, come dichiarato dall'azienda produttrice, che prevedeva un aumento del tasso di gravidanza del 10% e della percentuale di figlie femmine del 20%, bensì ha provocato una, seppur lieve, riduzione del 3% del tasso di gravidanza rispetto al seme convenzionale, che è apparsa mediamente significativa; pertanto, in seguito a quanto detto, si può affermare che il prodotto "Heifer Plus" influisca negativamente sul tasso di gravidanza in aziende appartenenti al territorio del Nord Italia.

Inoltre, tra gli effetti studiati, il fattore "allevamento" e, quindi, la gestione e la conduzione dello stesso, sono risultati statisticamente significativi per il tasso di gravidanza, così come la categoria di appartenenza delle bovine è apparsa altamente significativa. Da ciò si deduce che, per quanto riguarda il tasso di gravidanza, le manze sono molto più fertili rispetto alle vacche, indipendentemente dal tipo di trattamento del seme, e che una buona gestione dell'allevamento si ripercuote favorevolmente sulla fertilità della mandria.

A favore del prodotto "Heifer Plus", sebbene l'ipotesi di un aumento del 20% della percentuale di figlie femmine non sia stata confermata ed anzi il tasso di purezza sia risultato molto basso rispetto a quello atteso, si è riscontrato un aumento del 7% della percentuale di figlie femmine, rispetto a ciò che si è riscontrato con il seme convenzionale.

Tuttavia, tale risultato non è apparso statisticamente significativo, quindi si può sostenere che in questa indagine non si è evidenziata nessuna relazione tra il tipo di dose usata e la purezza del saggio femminile. Detto ciò, da quanto emerso nella seguente prova sperimentale, non si può affermare, come nel caso degli studi riguardanti il seme sessato svolti da Seidel e Garner (2002) e

da Cerchiaro (2007), che il prodotto “Heifer Plus” sia un metodo affidabile per la preselezione del sesso nei bovini.

Per quanto riguarda i tori usati, quelli che hanno dato risultati migliori in seguito alla lavorazione con “Heifer Plus” sono stati Galactico e Savoia per quanto riguarda la fertilità del seme, mentre per la purezza del sesso femminile si è distinto Milito, nonostante anche in questo caso non ci sia stata una significatività dei risultati ottenuti.

Inoltre, l’analisi logistica ha confermato che l’unico effetto incluso nel modello di regressione logistica che ha influenzato in modo significativo la percentuale di figlie femmine, è stato inaspettatamente il numero di intervento fecondativo, anche se appare dovuto ad una scarsità dei dati raccolti sulle diagnosi ecografiche.


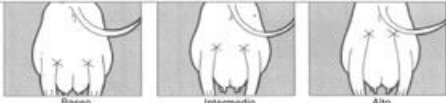

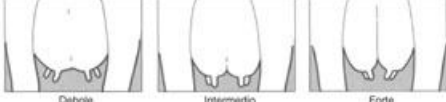

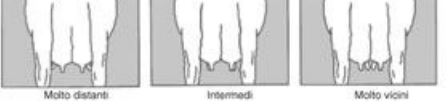
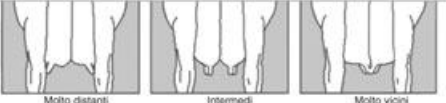

In conclusione, un fattore che può aver ridotto l’efficacia del protocollo “Heifer Plus”, può essere stato il non aver sempre garantito l’inseminazione entro le 16-24 ore dall’inizio del calore, come veniva richiesto dalla ditta produttrice.

A tale scopo, sarà interessante proseguire nella verifica dell’efficacia del protocollo “Heifer Plus” scegliendo aziende dotate di personale di stalla preciso nel riconoscimento degli estri o di podometri o altri sistemi di individuazione dei calori in grado di indicare con precisione l’inizio degli stessi.

6. Allegati e Tabelle

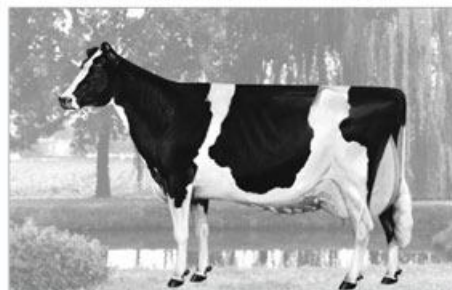
Allegato 1. Valutazione morfologica di una bovina di razza Frisona Italiana

STRUTTURA											
STATURA 5 Molto Bassa (cm 130) 15 Bassa 25 Media (cm 140) 35 Alta 45 Molto Alta (cm 150)										PUNTO PIÙ ALTO DELLA LINEA DORSALE TRA LE PUNTE ILIACHE	
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
FORZA ANTERIORE 5 Animale molto stretto e debole 15 Stretto e debole 25 Mediamente forte ed ampio 35 Molto forte 45 Estremamente forte ed ampio											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
PROFONDITÀ 5 Animale privo di profondità 15 Poco profondo 25 Profondità media 35 Profondo 45 Molto profondo											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
ANGOLOSITÀ 5 Costato chiuso e diritto con scheletro grossolano 15 Moderatamente chiuso e diritto 25 Aperto e angolato 35 Molto aperto e angolato 45 Molto aperto e angolato con molta qualità scheletrica											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
ANGOLO GROPPA 5 Ischi molto più alti degli ilei 15 Parallela al suolo 25 Leggera inclin. verso gli ischi 35 Media inclinazione 45 Forte inclinazione											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
LARGHEZZA GROPPA 5 Groppa molto stretta 15 Stretta 25 Mediamente larga (cm 22) 35 Larga 45 Molto larga											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
CONFORMAZIONE 5 Scorretto e fuori standard 15 Difetti poco marcati 25 Corretto e bilanciato 35 Armonico e bilanciato 45 Molto corretto - Armonico e bilanciato											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
ARTI e PIEDI											
VISTI DI LATO 5 Arto dritto, stangato 15 Quasi dritto al garretto 25 Media angolazione 35 Falciano 45 Molto falciano											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
ARTI VISTI DA DIETRO 5 Molto chiusi ai garretti (vaccini) 15 Chiusi ai garretti 25 Piedi leggermente divergenti 35 In appiombato 45 Appiombato con piedi dritti											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
LOCOMOZIONE 0 Non rilevabile 25 Passo medio e leggera abduzione 35 4 Passo lungo senza abduzione											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
ALTEZZA TALLONE 5 Molto basso 15 Basso 25 Medio (cm 3) 35 Alto 45 Molto alto											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
FUNZIONALITÀ ARTI E PIEDI 5 Poco funzionali 15 Sufficientemente funzionali 25 Intermedi 35 Funzionali 45 Molto funzionali											
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50

MAMMELLA						
FORZA ATTACCO ANTERIORE 5 Attacco completamente staccato 15 Attacco debole 25 Di media forza 35 Molto forte 45 Molto forte e armon.fuso addome		FORZA DELL'ATTACCO ALLA PARETE ADDOMINALE				
ALTEZZA ATTACCO POSTERIORE 5 Attacco molto basso 15 Basso 25 Mediamente alto 35 Alto 45 Molto alto		POSIZIONE RISPETTO AL PUNTO MEDIANO TRA ISCHIO E GARRETTO				
LARGHEZZA ATTACCO POSTERIORE 5 Attacco molto stretto 15 Stretto 25 Di media larghezza 35 Largo 45 Molto largo		LARGHEZZA DELLA PARTE SUPERIORE DELLA MAMMELLA				
LEGAMENTO 5 Rotto, senza solco mediano 10 Debole e poco definito 25 Solco definito 35 Forte, con solco marcato 45 Molto forte, con solco marcato		RIENTRANZA DEL SOLCO MEDIANO				
PROFONDITÀ 5 Piano molto al di sotto garretti 10 Piano all'altezza dei garretti 25 Piano sopra garretti 35 Piano molto al di sopra garretti 45 Piano molto alto e mamm.scarsa		DISTANZA DEL PIANO DELLA MAMMELLA DAL GARRETTO				
CAPEZZOLI ANTERIORI 5 Molto larghi 15 Ins.esterno dei quarti 25 Ins.centro dei quarti e perpendicolari 35 Ins.interno dei quarti 45 Ins.molto all'interno		POSIZIONE DEI CAPEZZOLI RISPETTO AL CENTRO DEI QUARTI				
CAPEZZOLI POSTERIORI 5 Molto esterni 15 Al centro del quarto 25 Leggermente interni 35 Interni ai quarti 45 Molto ravvicinati		POSIZIONE DEI CAPEZZOLI RISPETTO AL CENTRO DEI QUARTI				
DIMENSIONI CAPEZZOLI 5 Molto corti 15 Corti 25 Dimensioni medie (cm 6) 35 Lunghi 45 Molto lunghi		LUNGHEZZA DEI CAPEZZOLI ANTERIORI				

ATTRIBUZIONE DEL PUNTEGGIO

PESI DEI CARATTERI RIASSUNTIVI NEL PUNTEGGIO FINALE	
Struttura	20%
Forza da Latte	20%
Arti e Piedi	20%
Apparato Mammario	40%



QUALIFICHE DEL PUNTEGGIO FINALE		
E - Eccellente	90 - 100	punti
M - Molto Buono	85 - 89	punti
+ - Buono Più	80 - 84	punti
B - Buono	75 - 79	punti
S - Sufficiente	70 - 74	punti
I - Insufficiente	50 - 69	punti

Allegato 2. *Esempio di scheda appartenente al fascicolo consegnato agli allevatori*

DOSE 1		
BRASILEIRO MASTICE		
MANZA	<input type="text"/>	
VACCA	<input type="text"/>	
		EVENTUALE
N° AZIENDALE	DATA INTERVENTO	DATA RITORNO
_____	_____	_____
	<input type="text" value="1° int"/>	<input type="text" value="2° int"/>
	<input type="text" value="3° int"/>	
ECOGRAFIA		
	1^ DIAGNOSI – DATA	2^ DIAGNOSI – DATA
	_____	_____
MASCHIO	<input type="text"/>	
FEMMINA	<input type="text"/>	

DOSE 1
BRASILEIRO VIOLA

MANZA

VACCA

EVENTUALE

N° AZIENDALE

DATA INTERVENTO

DATA RITORNO

1° int

2° int

3° int

ECOGRAFIA

1^ DIAGNOSI – DATA

2^ DIAGNOSI – DATA

MASCHIO

FEMMINA

Allegato 3. Indice Genetico di Milito

SPINAL PRINCE MILITO TV TL TY

IT034990462594 - NAAB 198HO01724 - aAa: 432561

PRINCE x O-MAN x SKYWALKER

Valutazione Agosto 2016

Produzione		Morfologia		Dati gestionali	
GPFT	+2360	Tipo	+1,05	Facilità parto toro	111
IES	+899	ICM	+0,69	Facilità parto figlie	110
Latte	+868	Arti / piedi	+3,72	Velocità mungitura	102
Pr. %	+0,11	Attentibilità %	88	Cellule somatiche	105
Pr. kg	+41	Qualità del latte		Longevità	113
Gr. %	+0,09	K - caseina	AA	Fertilità figlie	108
Gr. kg	+42	Beta - caseina	A1A2	Fertilità seme toro	n/d
Figlie	136	Beta - lattoglobuline	BB	Indice BCS	107
Allevamenti	98	Beta - lattoglobuline	BB	Grazing	n/d
Attentibilità %	94	I. attitudine casearia	103		

VALUTAZIONE MORFOLOGICA



Allegato 4. Indice Genetico di Savoia

BAS FARM PRINCE SAVOIA TM

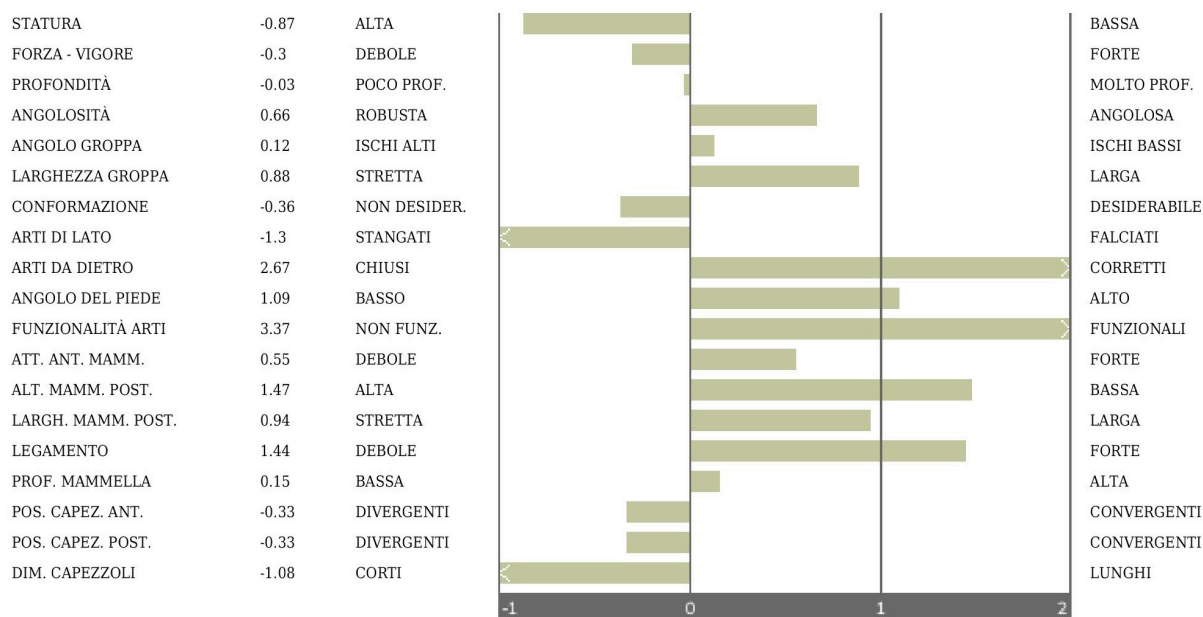
IT001990507394 - NAAB 198HO01798 - aAa: 342156

PRINCE x FORD x TUGOLO

Valutazione Agosto 2016

Produzione		Morfologia		Dati gestionali	
GPFT	+2092	Tipo	+0,82	Facilità parto toro	108
IES	+808	ICM	+0,64	Facilità parto figlie	111
Latte	+552	Arti / piedi	+2,97	Velocità mungitura	98
Pr. %	+0,11	Attentibilità %	90	Cellule somatiche	109
Pr. kg	+29	Qualità del latte		Longevità	113
Gr. %	+0,19			Fertilità figlie	107
Gr. kg	+40	K - caseina	AA	Fertilità seme toro	n/d
Figlie	171	Beta - caseina	A1A1	Indice BCS	97
Allevamenti	120	Beta - lattoglobuline	BB	Grazing	n/d
Attentibilità %	94	I. attitudine casearia	111		

VALUTAZIONE MORFOLOGICA



Allegato 5. Indice Genetico di Brasileiro

KNS BRASILEIRO ET TV TL TY

DE000357640631 - NAAB 198HO02012 - aAa: 423516

BALISTO x EPIC x MAN-OMAN

Valutazione Agosto 2016

Produzione		Morfologia		Dati gestionali	
GPFT	+3452	Tipo	+2,02	Facilità parto toro	107
IES	+1072	ICM	+1,64	Facilità parto figlie	112
Latte	+1601	Arti / piedi	+3,25	Velocità mungitura	n/d
Pr. %	+0,21	Attentibilità %	69	Cellule somatiche	107
Pr. kg	+79	Qualità del latte		Longevità	115
Gr. %	+0,22			Fertilità figlie	98
Gr. kg	+88	K - caseina	BB	Fertilità seme toro	n/d
Figlie	0	Beta - caseina	A1A2	Indice BCS	98
Allevamenti	0	Beta - lattoglobuline	AA	Grazing	n/d
Attentibilità %	75	I. attitudine casearia	n/d		

VALUTAZIONE MORFOLOGICA

STATURA	1.61	ALTA		BASSA
FORZA - VIGORE	1.54	DEBOLE		FORTE
PROFONDITÀ	1.68	POCO PROF.		MOLTO PROF.
ANGOLOSITÀ	1.92	ROBUSTA		ANGOLOSA
ANGOLO GROPPA	0.4	ISCHI ALTI		ISCHI BASSI
LARGHEZZA GROPPA	2.01	STRETTA		LARGA
CONFORMAZIONE	2.63	NON DESIDER.		DESIDERABILE
ARTI DI LATO	1.19	STANGATI		FALCIATI
ARTI DA DIETRO	3.13	CHIUSI		CORRETTI
ANGOLO DEL PIEDE	2.78	BASSO		ALTO
FUNZIONALITÀ ARTI	3.94	NON FUNZ.		FUNZIONALI
ATT. ANT. MAMM.	2.36	DEBOLE		FORTE
ALT. MAMM. POST.	2.15	ALTA		BASSA
LARGH. MAMM. POST.	3.42	STRETTA		LARGA
LEGAMENTO	1.5	DEBOLE		FORTE
PROF. MAMMELLA	1.18	BASSA		ALTA
POS. CAPEZ. ANT.	1.23	DIVERGENTI		CONVERGENTI
POS. CAPEZ. POST.	0.91	DIVERGENTI		CONVERGENTI
DIM. CAPEZZOLI	0.1	CORTI		LUNGHI

Allegato 6. Indice Genetico di Galactico

GALACTICO ET TV TL TY

DE000356670067 - NAAB 198HO00205 - aAa: **132564**

GALAXY x BOOKEM x SHOTTLE

Valutazione Agosto 2016

Produzione		Morfologia		Dati gestionali	
GPFT	+3003	Tipo	+2,05	Facilità parto toro	104
IES	+970	ICM	+2,34	Facilità parto figlie	117
Latte	+825	Arti / piedi	+4,54	Velocità mungitura	n/d
Pr. %	+0,11	Attentibilità %	69	Cellule somatiche	113
Pr. kg	+41	Qualità del latte		Longevità	116
Gr. %	+0,21			Fertilità figlie	105
Gr. kg	+52	K - caseina	BB	Fertilità seme toro	n/d
Figlie	0	Beta - caseina	A2A2	Indice BCS	96
Allevamenti	0	Beta - lattoglobuline	AB	Grazing	n/d
Attentibilità %	75	I. attitudine casearia	n/d		

VALUTAZIONE MORFOLOGICA



Allegato 7. Indice Genetico di Panamero

PANAMERO ET TV TL TY

DE000357104400 - NAAB 198HO02044 - aAa: 243165

MARDI GRAS x EPIC x GOLDWYN

Valutazione Agosto 2016

Produzione		Morfologia		Dati gestionali	
GPFT	+3178	Tipo	+2,21	Facilità parto toro	109
IES	+1090	ICM	+3,01	Facilità parto figlie	110
Latte	+1077	Arti / piedi	+2,89	Velocità mungitura	n/d
Pr. %	+0,07	Attentibilità %	69	Cellule somatiche	112
Pr. kg	+44	Qualità del latte		Longevità	121
Gr. %	+0,04			Fertilità figlie	108
Gr. kg	+45	K - caseina	AB	Fertilità seme toro	n/d
Figlie	0	Beta - caseina	A1A1	Indice BCS	99
Allevamenti	0	Beta - lattoglobuline	BB	Grazing	n/d
Attentibilità %	75	I. attitudine casearia	n/d		

VALUTAZIONE MORFOLOGICA



Tabella 4 *Statistiche descrittive generali dei dati raccolti*

Numero Aziende	26
Numero Tori	5
Dosi Distribuite	1000
Dosi Attuali	940
Numero Bovine inseminate	850
Dosi non usate	90
Numero Diagnosi	547
Numero Ritorni	240
Diagnosi+Ritorni	787
Diagnosi+Ritorni+Dosi non usate	877
Dati Mancanti	63
Errata FA	2
Doppia FA	1
Diagnosi mancanti	49
Vendute senza diagnosi	11
Totale	63
Numero Riassorbimenti	9
Numero Aborti	9
Numero Animali Venduti	13
Numero Animali Morti	1
Numero Ecografie	221
Numero ecografati singoli	216
Numero ecografati gemellari	5
Numero SESSO Ecografati	226
Numero Gravidanze	316
Tasso di Gravidanza	37,18%
Numero Maschi	108
Numero Femmine	118
Purezza del "sessaggio femminile"	52,21%

Tabella 5 *Statistiche descrittive generali sulle diagnosi ecografiche*

Dosi Distribuite	1000
Inseminazioni	850
Numero Ecografie	221
Numero Ecografati Gemellari	5
Numero Feti	226
Maschi singoli	102
Maschio+Maschio	1
Maschio+Femmina	4
Femmine singole	114
Totale Ecografie	221
Totale Maschi	108
Totale Femmine	118
Ecografati Singoli	216
% Maschi Singoli	47,22%
% Femmine Singole	52,78%
Totale Ecografati Gemellari	10
Maschi Gemellari	6
Femmine Gemellari	4
% Maschi Gemellari	60%
% Femmine Gemellari	40%
% Maschi Totali	47,79%
% Femmine Totali	52,21%

Tabella 6 *Suddivisione delle bovine inseminate per categoria (vacche o manze), in funzione del toro usato*

Toro	Categoria			Totale
	Vacche	Manze	?	
Brasileiro	110	59	1	170
Galactico	110	27	30	167
Milito	177	2	0	179
Panamero	117	49	2	168
Savoia	135	11	20	166
Totale	649	148	53	850

Tabella 7 *Suddivisione delle bovine inseminate per tipologia di calore (naturale o sincronizzato), in funzione del toro usato*

Toro	Calore			Totale
	Naturale	Sincronizzato	?	
Brasileiro	133	36	1	170
Galactico	101	28	38	167
Milito	85	94	0	179
Panamero	108	53	7	168
Savoia	54	88	24	166
Totale	481	299	70	850

Tabella 8 *Suddivisione delle bovine inseminate per numero di intervento di fecondazione, in funzione del toro usato*

Toro	Numero Intervento di Inseminazione					Totale
	1	2	3	4+	?	
Brasileiro	105	37	16	10	2	170
Galactico	69	32	22	13	31	167
Milito	106	41	23	9	0	179
Panamero	104	43	19	2	0	168
Savoia	84	30	23	9	20	166
Totale	468	183	103	43	53	850

Tabella 9 *Suddivisione delle bovine inseminate per tipo di dose usata, in funzione del toro usato*

Toro	Tipo di Dose			Totale
	Mastice	Viola	?	
Brasileiro	85	85	0	170
Galactico	85	82	0	167
Milito	90	89	0	179
Panamero	84	84	0	168
Savoia	80	75	11	166
Totale	424	415	11	850

Tabella 10 *Numero di dosi distribuite per azienda*

Toro (Dosi Distribuite)						
Azienda*	Brasileiro	Galactico	Milito	Panamero	Savoia	Totale
1		40				40
2					20	20
3	20			20		40
4	20			20		40
5		20				20
6				40		40
7				20		20
8	20			20	20	60
9					30	30
10		20				20
11			20			20
12		40	40			80
13	20	20				40
14			20			20
15		20				20
16			30		30	60
17			60		80	140
18			30			30
19					20	20
20	20			20		40
21	20					20
22	20					20
23	20			20		40
24	20	20				40
25		20		20		40
26	20			20		40
Totale	200	200	200	200	200	1000

Tabella 11 *Numero di dosi utilizzate per azienda*

Azienda*	Toro (Dosi Utilizzate)					Totale
	Brasileiro	Galactico	Milito	Panamero	Savoia	
1		29				29
2					20	20
3	20			20		40
4	12			12		24
5		20				20
6				36		36
7				20		20
8	20			20	20	60
9					30	30
10		20				20
11			20			20
12		38	39			77
13	20	20				40
14			20			20
15		20				20
16			18		5	23
17			58		72	130
18			24			24
19					19	19
20	19			20		39
21						0
22	20					20
23	20			20		40
24	20	20				40
25						0
26	19			20		39
Totale	170	167	179	168	166	850

Tabella 12 *Numero di bovine inseminate per azienda e per tipo di dose*

Azienda*	Tipo di Dose			Totale
	Mastice	Viola	?	
1	15	14		29
2	6	5	9	20
3	20	20		40
4	12	12		24
5	10	10		20
6	18	18		36
7	10	10		20
8	30	30		60
9	14	14	2	30
10	10	10		20
11	10	10		20
12	40	37		77
13	20	20		40
14	10	10		20
15	10	10		20
16	12	11		23
17	66	64		130
18	12	12		24
19	10	9		19
20	19	20		39
21				0
22	10	10		20
23	20	20		40
24	20	20		40
25				0
26	20	19		39
Totale	424	415	11	850

Tabella 13 *Distribuzione delle bovine inseminate per azienda e per categoria*

Azienda*	Categoria			Totale
	Vacche	Manze	?	
1			29	29
2			20	20
3	37		3	40
4	24			24
5	19	1		20
6	35	1		36
7	14	6		20
8	47	13		60
9	22	8		30
10	20			20
11	18	2		20
12	56	20	1	77
13	38	2		40
14	20			20
15	20			20
16	23			23
17	130			130
18	24			24
19	19			19
20	8	31		39
21				0
22	15	5		20
23	17	23		40
24	29	11		40
25				0
26	14	25		39
Totale	649	148	53	850

*** Azienda**

- 1** Az. Agr. Borga (TV)
- 2** Az. Agr. Brugnera (TV)
- 3** Az. Agr. Brunelli (VR)
- 4** Az. Agr. Canili (MN)
- 5** Az. Agr. Cortazza (LO)
- 6** Az. Agr. Fenarola (BS)
- 7** Az. Agr. Franciosi (LO)
- 8** Az. Agr. Frigè (MI)
- 9** Az. Agr. Gandolfi F., L. e P. (MN)
- 10** Az. Agr. Gandolfi M. (MN)
- 11** Az. Agr. La Contea (MN)
- 12** Az. Agr. Le Prese (VE)
- 13** Az. Agr. Martelli (MN)
- 14** Az. Agr. Pacchioni (LO)
- 15** Az. Agr. Soldi (MI)
- 16** Az. Agr. Trestae (PD)
- 17** Az. Agr. Zilio (PD)
- 18** Soc. Agr. Biagi (MN)
- 19** Soc. Agr. Calderini (MN)
- 20** Soc. Agr. Cascina Sei Ore (BS)
- 21** Soc. Agr. Fratelli Boldini (PR)
- 22** Soc. Agr. Gestione Aziende Bianchini (MI)
- 23** Soc. Agr. La Serenissima (CR)
- 24** Soc. Agr. Nordera (VR)
- 25** Soc. Agr. Roldi (CR)
- 26** Soc. Agr. Sacchina (MN)

Tabella 14 Analisi sul tasso di gravidanza e sulla purezza del sessaggio femminile ottenuti con materiale seminale convenzionale (mastice) e con materiale seminale trattato con il prodotto “Heifer Plus” (viola) e relativo Test del Chi-Quadro

Gravidanza+Sessaggio	MASTICE (non trattato)	VIOLA (trattato)	CHI-QUADRO Masitce vs Viola (P)
Dosi Distribuite	500	500	
Dosi Usate	424	415	
Bovine Inseminate	423	414	
Gravidanze	166	150	
Tasso di Gravidanza	39,24%	36,23%	**
Gravidanze Ecografate	119	102	
Maschi Singoli	59	43	
Femmine Singole	57	57	
Maschio+Femmina	3	1	
Maschio+Maschio	0	1	
Totale Feti	122	104	
Totale Femmine	60	58	
Sessaggio Femminile	49,18%	55,77%	ns

*ns = non significativo; *: P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001*

Tabella 15 Test del Chi-Quadro sul tasso di gravidanza e sulla purezza del sessaggio femminile, in funzione del numero di intervento fecondativo

Gravidanza+Sessaggio	N_FA=1	N_FA=2	N_FA≥3	CHI-QUADRO Number of FA (P)
Totale	468	183	146	
Bovine Inseminate	467	180	146	
Gravidanze	200	60	49	
Tasso di Gravidanza	42,83%	33,33%	33,56%	ns
Gravidanze Ecografate	144	40	36	
Maschi Singoli	69	23	10	
Femmine Singole	73	17	23	
Maschio+Femmina	1		3	
Maschio+Maschio	1			
Totale Feti	146	40	39	
Totale Femmine	74	17	26	
Sessaggio Femminile	50,68%	42,50%	66,67%	*

*ns = non significativo; *: P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001*

Tabella 16 Test del Chi-Quadro sul tasso di gravidanza e sulla purezza del sessaggio femminile, in funzione della categoria

Gravidanza+Sessaggio	Vacche	Manze	CHI-QUADRO
			V vs M (P)
Totale	649	148	
Bovine Inseminate	645	148	
Gravidanze	211	96	
Tasso di Gravidanza	32,71%	64,86%	***
Gravidanze Ecografate	142	78	
Maschi Singoli	62	39	
Femmine Singole	75	39	
Maschio+Femmina	4		
Maschio+Maschio	1		
Totale Feti	147	78	
Totale Femmine	79	39	
Sessaggio Femminile	53,74%	50%	ns

*ns = non significativo; *: P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001*

Tabella 17 Test del Chi-Quadro sul tasso di gravidanza e sulla purezza del sessaggio femminile, in funzione dei tori usati per la prova

Gravidanza+Sessaggio	Brasileiro	Galactico	Milito	Panamero	Savoia	CHI-QUADRO
						Bull (P)
Totale	170	167	179	168	166	
Bovine Inseminate	170	167	177	168	155	
Gravidanze	71	56	62	73	54	
Tasso di Gravidanza	41,76%	33,53%	35,03%	43,45%	34,84%	**
Gravidanze Ecografate	56	41	34	46	44	
Maschi Singoli	34	17	12	22	17	
Femmine Singole	22	24	20	22	26	
Maschio+Femmina			1	2	1	
Maschio+Maschio			1			
Totale Feti	56	41	36	48	45	
Totale Femmine	22	24	21	24	27	
Sessaggio Femminile	39,29%	58,54%	58,33%	50%	60,0%	ns

*ns = non significativo; *: P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001*

Tabella 18 *Influenza del diverso tipo di trattamento del materiale seminale sul tasso di gravidanza e sulla purezza del sessaggio femminile, in riferimento al numero di intervento fecondativo*

Gravidanza+Sessaggio	N_FA=1	MASTICE	VIOLA	N_FA=2	MASTICE	VIOLA
Totale	468	238	230	183	90	93
Bovine Inseminate	467	237	230	180	89	91
Gravidanze	200	108	92	60	31	29
Tasso di Gravidanza	42,83%	45,57%	40%	33,33%	34,83%	31,87%
Gravidanze Ecografate	144	79	65	40	22	18
Maschi Singoli	69	38	31	23	14	9
Femmine Singole	73	40	33	17	8	9
Maschio+Femmina	1	1				
Maschio+Maschio	1		1			
Totale Feti	146	80	66	40	22	18
Totale Femmine	74	41	33	17	14	9
Sessaggio Femminile	50,68%	51,25%	50%	42,50%	63,64%	50%

Gravidanza+Sessaggio	N_FA≥3	MASTICE	VIOLA
Totale	146	76	70
Bovine Inseminate	146	76	70
Gravidanze	49	24	25
Tasso di Gravidanza	33,56%	31,58%	35,71%
Gravidanze Ecografate	36	18	18
Maschi Singoli	10	7	3
Femmine Singole	23	9	14
Maschio+Femmina	3	2	1
Maschio+Maschio			
Totale Feti	39	20	19
Totale Femmine	26	11	15
Sessaggio Femminile	66,67%	55%	78,95%

Tabella 19 *Influenza del diverso tipo di trattamento del materiale seminale sul tasso di gravidanza e sulla purezza del sessaggio femminile, in riferimento alla categoria (Vacca/Manza)*

Gravidanza+Sessaggio	Vacche	MASTICE	VIOLA	Manze	MASTICE	VIOLA
Totale	649	325	322	148	76	72
Bovine Inseminate	645	324	321	148	76	72
Gravidanze	211	109	102	96	53	43
Tasso di Gravidanza	32,71%	33,64%	31,78%	64,86%	69,74%	59,72%
Gravidanze Ecografate	142	76	66	78	43	35
Maschi Singoli	62	38	24	39	21	18
Femmine Singole	75	35	40	39	22	17
Maschio+Femmina	4	3	1			
Maschio+Maschio	1		1			
Totale Feti	147	79	68	78	43	35
Totale Femmine	79	38	41	39	22	17
Sessaggio Femminile	53,74%	48,10%	60,29%	50%	51,16%	48,57%

Tabella 20 *Influenza del diverso tipo di trattamento del materiale seminale sul tasso di gravidanza e sulla purezza del sessaggio femminile, in riferimento ai tori usati per la prova*

Gravidanza+Sessaggio	Brasileiro	MASTICE	VIOLA	Galactico	MASTICE	VIOLA
Totale	170	85	85	167	85	82
Bovine Inseminate	170	85	85	167	85	82
Gravidanze	71	36	35	56	28	28
Tasso di Gravidanza	41,76%	42,35%	41,18%	33,53%	32,94%	34,15%
Gravidanze Ecografate	56	29	27	41	22	19
Maschi Singoli	34	20	14	17	9	8
Femmine Singole	22	9	13	24	13	11
Maschio+Femmina						
Maschio+Maschio						
Totale Feti	56	29	27	41	22	19
Totale Femmine	22	9	13	24	13	11
Sessaggio Femminile	39,29%	31,03%	48,15%	58,54%	59,09%	57,89%

Gravidanza+Sessaggio	Milito	MASTICE	VIOLA	Panamero	MASTICE	VIOLA
Totale	179	90	89	168	84	84
Bovine Inseminate	177	89	88	168	84	84
Gravidanze	62	36	26	73	42	31
Tasso di Gravidanza	35,03%	40,45%	29,55%	43,45%	50%	36,90%
Gravidanze Ecografate	34	19	15	46	28	18
Maschi Singoli	12	9	3	22	14	8
Femmine Singole	20	9	11	22	12	10
Maschio+Femmina	1	1		2	2	
Maschio+Maschio	1		1			
Totale Feti	36	20	16	48	30	18
Totale Femmine	21	10	11	24	14	10
Sessaggio Femminile	58,33%	50%	68,75%	50%	46,67%	55,56%

Gravidanza+Sessaggio	Savoia	MASTICE	VIOLA
Totale	166	80	75
Bovine Inseminate	155	80	75
Gravidanze	54	24	30
Tasso di Gravidanza	34,84%	30,0%	40,0%
Gravidanze Ecografate	44	21	23
Maschi Singoli	17	7	10
Femmine Singole	26	14	12
Maschio+Femmina	1		1
Maschio+Maschio			
Totale Feti	45	21	24
Totale Femmine	27	14	13
Sessaggio Femminile	60,0%	66,67%	54,17%

Tabella 21 Analisi logistica e stima degli Odds Ratio per fattori legati ad una diagnosi di gravidanza positiva

Type 3 Analysis of Effects			
Effect	DF	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square
Herd	21	36,5188	(*) 0,0191
Dose Type	1	0,5265	0,4681
Number of FA	2	1,4569	0,4827
Category	2	19,1618	(***) <0,0001
Bull	4	3,4228	0,4897

*ns = non significativo; *: P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001*

Variable	n	Odds Ratio	95% CI ¹
Herd	22		
Herd 18 vs 17		0,149	0,017 - 1,329
Herd 22 vs 17		<0,001	<0,001 - >999,999
Herd 3 vs 17		1,680	0,356 - 7,933
Herd 19 vs 17		0,310	0,093 - 1,032
Herd 4 vs 17		<0,001	<0,001 - >999,999
Herd 20 vs 17		1,580	0,366 - 6,817
Herd 5 vs 17		<0,001	<0,001 - >999,999
Herd 6 vs 17		0,104	0,009 - 1,176
Herd 7 vs 17		0,126	0,011 - 1,424
Herd 8 vs 17		0,789	0,257 - 2,426
Herd 9 vs 17		0,234	0,067 - 0,816
Herd 10 vs 17		0,266	0,033 - 2,115
Herd 11 vs 17		<0,001	<0,001 - >999,999
Herd 12 vs 17		0,890	0,361 - 2,197
Herd 13 vs 17		0,485	0,125 - 1,884
Herd 24 vs 17		0,511	0,136 - 1,923
Herd 14 vs 17		0,419	0,093 - 1,877
Herd 26 vs 17		1,346	0,321 - 5,654
Herd 23 vs 17		3,370	0,837 - 13,570
Herd 15 vs 17		0,118	0,010 - 1,363
Herd 16 vs 17		1,306	0,381 - 4,477
Dose Type	2		
Dose Type Mastice vs Viola		0,862	0,576 - 1,288
Number of FA	3		
n_FA 1 vs 3		0,825	0,473 - 1,440
n_FA 2 vs 3		1,108	0,569 - 2,157
Category	3		
? vs V		<0,001	<0,001 - >999,999
M vs V		0,222	0,113 - 0,436
Bull	5		
Bull Brasileiro vs Savoia		0,628	0,190 - 2,076
Bull Galactico vs Savoia		1,146	0,342 - 3,837
Bull Milito vs Savoia		0,647	0,294 - 1,422
Bull Panamero vs Savoia		0,545	0,153 - 1,940

¹CI = Confidence Interval.

Tabella 22 *Analisi logistica e stima degli Odds Ratio per fattori legati alla nascita di una vitella femmina*

Type 3 Analysis of Effects			
Effect	DF	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square
Herd	18	12,7521	0,8061
Dose Type	1	2,3076	0,1287
Number of FA	2	7,2416	(*) 0,0268
Category	2	0,1127	0,9452
Bull	4	4,4013	0,3544

*ns = non significativo; *: P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001*

Variable	n	Odds Ratio	95% CI ¹
Herd	19		
Herd 18 vs 17		<0,001	<0,001 - >999,999
Herd 22 vs 17		1,535	0,108 - 21,723
Herd 19 vs 17		0,483	0,084 - 2,798
Herd 4 vs 17		4,879	0,161 - 147,635
Herd 20 vs 17		2,003	0,194 - 20,687
Herd 5 vs 17		3,089	0,217 - 43,895
Herd 7 vs 17		2,301	0,179 - 29,528
Herd 8 vs 17		2,171	0,249 - 18,955
Herd 9 vs 17		0,147	0,028 - 0,780
Herd 10 vs 17		0,831	0,041 - 17,038
Herd 12 vs 17		1,892	0,389 - 9,207
Herd 13 vs 17		4,343	0,318 - 59,359
Herd 24 vs 17		0,979	0,126 - 7,600
Herd 14 vs 17		1,067	0,099 - 11,494
Herd 26 vs 17		0,543	0,047 - 6,351
Herd 23 vs 17		1,954	0,184 - 20,761
Herd 15 vs 17		1,662	0,115 - 23,930
Herd 16 vs 17		<0,001	<0,001 - >999,999
Dose Type	2		
Dose Type Mastice vs Viola		1,599	0,873 - 2,929
Number of FA	3		
n_FA 1 vs 3		3,088	1,250 - 7,631
n_FA 2 vs 3		4,200	1,358 - 12,988
Category	3		
? vs V		>999,999	<0,001 - >999,999
M vs V		1,165	0,474 - 2,865
Bull	5		
Bull Brasileiro vs Savoia		0,845	0,103 - 6,946
Bull Galactico vs Savoia		0,386	0,056 - 2,651
Bull Milito vs Savoia		0,624	0,140 - 2,770
Bull Panamero vs Savoia		0,369	0,039 - 3,507

¹CI = Confidence Interval.

7. Bibliografia e Sitografia

- ANABORAPI. 2016. www.anaborapi.it.
- ANAFI. 2016. www.anafi.it.
- APA Modena. 2016. http://www.farmit.com/apa/asl/Frisona_Italiana.htm.
- Asdell, S. A. 1968. Cattle fertility and sterility. Boston: Little Brown and Co.
- Balasini, D. 1993. Zootecnica speciale. Bologna: Edagricole.
- Ball, P. J. H. and A. R. Peters. 2004. Reproduction in cattle. Oxford: Blackwell.
- Bonadonna, T. 1964. La fecondazione artificiale nei bovini. Roma: Ramo editoriale degli agricoltori.
- Borgioli, E. 1964. Problemi tecnici dell'allevamento bovino. Firenze: Editrice Universitaria.
- Bortolami, R., E. Callegari, P. Clavenzani and V. Beghelli. 2010. Anatomia e fisiologia degli animali domestici. Bologna: Edagricole.
- BovineVet. 2016. <http://www.bovinevet.it/it/cosa-facciamo/ultrasonografia/sessaggio-fetale/>.
- Brand, A., J. P. T. M. Noordhuizen and Y. H. Schukken. 1996. Herd health and production management in dairy practice. Wageningen: Wageningen pers.
- Canavesi, F. 2001. Ipotesi di variazione degli indici selettivi per il lungo periodo. *Bianconero* (Maggio): 5-7.
- Cassandro, M. 2014. Genetic Aspects of Fertility Traits in Dairy Cattle: A Review. In *Proceedings of the 22th International Symposium Animal Science Days, Keszthely, Hungary, 16-19 September*.
- Cassandro, M. and M. Penasa. 2010. La fertilità bovina oltre la genetica. *Informatore Agrario* (19): 47-49.
- Cerchiaro, I., M. Cassandro, R. Dal Zotto, P. Carnier, and L. Gallo. 2007. A Field Study on Fertility and Purity of Sex-Sorted Cattle Sperm. *Journal of dairy science* 90: 2538–2542.
- Consiglio nazionale delle ricerche Progetto finalizzato difesa delle risorse genetiche delle popolazioni animali. 1983. Atlante etnografico delle popolazioni bovine allevate in Italia. \S.I.!: CNR.
- De Luca, A. and O. Repetti. 2010. Fertilità della bovina, non è solo una questione genetica. *Informatore Zootecnico* (4): 52-55.

- Emlab Genetics. 2016. <http://www.emlabgenetics.com/Pages/HEIFERPLUS.aspx>.
- Ente Nazionale Tre Venezie Ente di sviluppo, in agricoltura. 1970. Tecniche allevamento bovini. Venezia-Mestre: <ENTV>.
- Esslemont, R. J., J. H. Bailie and M. J. Cooper. 1985. Fertility management in dairy cattle. London: Collins.
- Ferrarese, A. 2013. Selezione genomica di tori di razza Frisona mediante un panel di marcatori SNP. Relatore Cassandro, M. Correlatore Maretto, F. Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Padova, Legnaro.
- Fusco, R. o. n. i. 1990. La frisona italiana. Bologna: Edizioni agricole.
- Galli, A., M. Basetti, V. Bornaghi and L. Paloschi. 1988. Qualità del materiale seminale bovino usato in Italia. Atti della Società Italiana di Buiatria (Vol. XX): 259-265.
- Gnemmi, G. and C. Maraboli. 2008. Il sessaggio fetale. Formazione: 3-6.
- Gordon, I. 1996. 1: Controlled reproduction in cattle and buffaloes. Wallingford: CAB International.
- Greppi, G. F., P. V. Beccaro and Convegno Profilo metabolico e fertilita nella bovina da latte, Cremona 1988. 1988. Atti del convegno: Profilo metabolico e fertilita nella bovina da latte. \S.l.: s.n.
- Hafez, B. and E. S. E. Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animals. Hoboken: Wiley.
- Hammond, J. 1949. The artificial insemination of cattle. Cambridge: W. Heffer & Sons.
- Informatore Zootecnico. 2016. <http://www.informatorezootecnico.it/bovini-da-latte-le-tendenze-del-miglioramento-genetico/>.
- Informatore Zootecnico. 2016. <http://www.informatorezootecnico.it/fecondazione-linseminazione-si-fa-cosi/>.
- Intermizoo. 2016. www.intermizoo.it.
- La valutazione morfologica della frisona italiana e la metodica applicativa. 1994.\S. I.!: Associazione nazionale frisona italiana.
- Mackle, N. 1975. Il comportamento sessuale dei bovini. Bologna: Edizioni agricole.
- Mari, G., S. Belluzzi, D. Zambelli and A. Matteuzzi. 1996. Effetti della metodica di congelamento del seme bovino sulla motilità post scongelamento. Atti della Società Italiana di Buiatria (Vol. XXVIII): 347-351.

- Marusi, A., E. Cabassi, P. G. Bracchi and E. Pellerzi. 1983. Sul comportamento sessuale del toro in relazione alle condizioni di allevamento: esami seminologici ed osservazioni istologiche sui testicoli. *Ann. Fac. Med. Vet. Univ. Parma*: 593-600.
- Miglior, F., F. Canavesi, A. Samorè and E. Olzi. 1998. Il miglioramento genetico nella Frisone Italiana. *Atti della Società Italiana di Buiatria (Vol. XXX)*: 151-157.
- Monetti, P. G. 2001. *Allevamento dei bovini e dei suini*. Ozzano Emilia: Giraldi.
- Monetti, P. G. *Appunti di bovinicoltura*. Ozzano Emilia: Cristiano Giraldi.
- Norman, H. D., J. L. Hutchison and P. M. VanRaden. 2011. Evaluations for service-sire conception rate for heifer and cow inseminations with conventional and sexed semen. *Journal of dairy science* 94(12): 6135-6142.
- Parigi Bini, R. and S. D. Marco. 1986. *Zootecnica speciale dei bovini*. Bologna: Patron.
- Peters, A. R., P. J. H. Ball, V. Cappa and G. Vecchiotti Antaldi. 1992. *La riproduzione dei bovini*. Bologna: Edagricole.
- Pirlo, G. and M. Speroni. 1999. Parametri riproduttivi nelle bovine da latte italiane. *Bianconero (Settembre)*: 55-57.
- Raphalalani, Z. C., K. A. Nephawe, M. L. Mphaphathi, F. V. Ramukhithi, M. M. Seshoka, M. Nkadimeng, A. Maqhashu, M. A. Bopape, L. F. Seolwana, M. H. Mapeka, N. L. Kanuya and T. L. Nedambale. 2016. 8 Response of communal cows to oestrus synchronization and timed artificial insemination. *Reproduction, fertility and development* 28(2): 133-134.
- *Reproduction in domestic animals*. 1990. Berlin \etc.!: P.Parey.
- Richter, J. M. H., H. Tillmann and G. Borrelli. 1957. *La diagnosi della gravidanza nella bovina*. Milano: Ed. Ist. sieroterapeutico milanese S. Belfanti.
- Romagnoli, S. 2003. Valutazione critica degli indici riproduttivi nella gestione delle aziende da latte. *Atti della Società Italiana di Buiatria (Vol. XXXV)*: 51-61.
- SAS Institute. 2002–2010. *SAS User's Guide: Statistics. Version 9.3*
- Spelta, R. and E. Corbella. 2015. *Tecniche di fecondazione artificiale*. Novara: CittàStudiEdizioni.
- Waller, J. L. and M. H. Johnson. 2013. *Chi-Square and T-Tests Using SAS®: Performance and Interpretation*. Georgia Regents University, Augusta: Paper 430.
- Webster, J. 1. 1987. *Understanding the dairy cow*. Oxford \etc.!: BSP professional books.

Ringraziamenti

Senza nemmeno accorgermene sono arrivata alla fine del mio percorso universitario e prima di concludere questa Tesi, mi sembra doveroso porgere alcuni ringraziamenti.

Il Grazie più grande va ai miei genitori, Renato e Nadia, per avermi permesso di portare a termine questo percorso, mostrandosene sempre entusiasti e fieri, e per la gioia che mettono nell'aiutarmi a perseguire i miei obiettivi.

Un grazie speciale va anche a Michele per tutto l'amore che ha avuto e ha nei miei confronti e per avermi fatto sempre affrontare le difficoltà con leggerezza.

Grazie anche agli zii, sia di sangue che acquisiti, ai parenti, a mia nonna Dorina e agli altri nonni che, seppur non presenti fisicamente, non mi hanno mai fatto mancare il loro affetto.

Grazie ad Elisa, amica di una vita, e a tutti i miei amici per i bellissimi momenti trascorsi insieme, in cui con la vostra allegria mi avete permesso di staccare, anche solo per un attimo, dalla routine universitaria.

Ringrazio di cuore il Professor Martino Cassandro, che mi ha dato l'opportunità di realizzare questo progetto di Tesi, assieme al Dott. Massimo Callegaro, dimostrandosi sempre molto disponibili e con una grande umanità. Grazie anche a tutti i collaboratori di Intermizoo, agli agenti che mi hanno accompagnato nella raccolta dei dati tra le varie aziende, ed a tutti gli allevatori che hanno accettato di partecipare a questa prova sperimentale.

Infine ultimi, ma non certo per importanza, ringrazio i miei fratelli pelosetti, Maya e Ringo, per essere stati dei fedeli compagni di studio e di vita in tutti questi anni.