

VINCENZO COSTANTINI<sup>1</sup> & GIOVANNI MICHELE LACALANDRA

## RIPRODUZIONE ASSISTITA E PROGRAMMI DI CONSERVAZIONE EX SITU DELL'AVIFAUNA SELVATICA PROTETTA

**Riassunto** – I programmi di conservazione per le specie minacciate di estinzione mirano fondamentalmente a salvare l'ambiente ed a favorire la riproduzione. Per le specie giunte al limite dell'estinzione, la riproduzione in cattività, secondo mirati progetti scientifici finalizzati alla conservazione *ex situ*, si è dimostrata efficace e determinante per la realizzazione di programmi di incremento delle popolazioni in natura e di reintroduzione. Sono interventi che richiedono sinergie di numerose competenze tecnico-scientifiche e tempi di realizzazione piuttosto lunghi anche per il basso tasso di fertilità delle specie in cattività. La possibilità di individuare e definire nuove metodiche biotecnologiche diagnostiche e terapeutiche di condizionamento e controllo della riproduzione degli uccelli con aumento del tasso di fertilità e nascita di pulli vivi e vitali ha portato allo sviluppo di specifici programmi di ricerca. Le metodiche farmacologiche innovative definite di condizionamento neuroendocrino (GnRH) dell'attività riproduttiva e la possibilità di una adeguata e precoce formazione delle coppie di riproduttori anche nelle specie monomorfiche, mediante tecniche incruente di sessaggio genetico, associate ad efficaci procedure di inseminazione artificiale ed a recenti acquisizioni di medicina neonatologica fanno intravedere, anche per l'avifauna protetta, nuovi e concreti strumenti operativi nei programmi di conservazione integrata della biodiversità.

**Parole chiave** – avifauna protetta, riproduzione assistita, conservazione *ex situ*, sessaggio genetico, GnRH, inseminazione artificiale, adozione intraspecifica.

**Abstract** – *Assisted reproduction and ex situ conservation programs for endangered birds.*

Captive breeding programs have been used to save several endangered birds from extinction. The existence of a considerable number of successful releases of captive-born birds into the wild demonstrated that it is possible to establish a species in an area of its historical range (reintroduction) and to reinforce an existing wild population that was in decline (restocking). Most reintroduction programs are complicated and expensive, involving a multi-disciplinary approach to problem solving. One of the major problems of many current ex-situ conservation programs is the low fertility rate of the endangered species in captivity. In the current review, some research programs on assisted bird reproduction are introduced, and new diagnostic and therapeutic methods for avian infertility are described.

**Key words** – endangered birds, assisted reproduction, ex situ conservation, genetic sexing, GnRH, artificial insemination, direct fostering.

---

Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari - Strada prov.le per Casamassima, Km 3 – I-70010 Valenzano (BA)

<sup>1</sup> E-mail: v.costantini@veterinaria.uniba.it

## Introduzione

In diversi Paesi sono in corso progetti di conservazione integrata per le specie 'prioritarie' dell'avifauna selvatica protetta mediante una migliore tutela degli habitat (conservazione *in situ*) e, per alcune delle specie 'minacciate di estinzione' (*Critically Endangered*, *Endangered*, *Vulnerable and Extinct in the Wild*) della Lista Rossa dell'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN), mediante programmi di riproduzione in cattività (*captive breeding*) e rilascio in natura di giovani individui (*captive-born*), per l'incremento delle popolazioni naturali residue (*restocking*) e la reintroduzione negli areali storici, nell'ambito di specifici Piani di Azione (PdA) (GARIBOLDI *et alii*, 2004; BUTCHART *et alii*, 2005). I programmi di conservazione *ex situ* sono interventi che di solito comportano notevole impegno economico e tempi di realizzazione piuttosto lunghi in quanto il tasso di fertilità delle specie 'prioritarie' è frequentemente basso e le adeguate tecniche di gestione dell'ambiente e dell'alimentazione in cattività non sempre garantiscono il successo riproduttivo. La possibilità di individuare nuove biotecnologie per aumentare il tasso di fertilità ha portato, nell'ultimo ventennio, allo sviluppo di studi specie-specifici sulla biologia riproduttiva dell'avifauna selvatica protetta e nell'ambito di questi programmi di ricerca sono state definite metodiche di riproduzione assistita, sia a livello diagnostico che terapeutico, efficaci ed applicabili in campo.

## Dati e Metodi

Per la conservazione delle specie minacciate, la definizione del sesso è determinante per lo studio della *sex ratio* delle popolazioni naturali (conservazione *in situ*) e per la precoce scelta dei riproduttori nell'ambito dei programmi di riproduzione in ambiente controllato (conservazione *ex situ*). Negli ultimi anni sono state messe a punto diverse metodiche non invasive, da DNA estratto da piuma, per il sessaggio genetico degli uccelli monomorfici e dimorfici immaturi, in alternativa alla determinazione del sesso basata sulla valutazione, non sempre attendibile, di elementi morfologici e comportamentali, ed alle tecniche chirurgiche, non prive di rischi per la salute dei volatili e di non pratica realizzazione in *pulli* ancora presenti nel nido o in specie di piccola taglia. La metodica di base che prevede l'estrazione e l'amplificazione del DNA dal calamo di 2-3 piume (regione pettorale), mediante l'impiego di una PCR (Polymerase Chain Reaction) con primers universali per il gene CHD (Chromobox Helicase DNA binding domain), si è dimostrata efficace, su centinaia di specie, e trova ormai impiego nella pratica clinica corrente (GUARICCI *et alii*, 2005; COSTANTINI *et alii*, 2006a). Per le specie non responsive, come alcune spe-

cie di rapaci diurni e notturni, è stata definita una metodica alternativa di sessaggio genetico, da DNA estratto da piuma o da membrana testacea, che prevede l'associazione della PCR alla tecnica dell'analisi del polimorfismo in lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) con gli enzimi *HaeIII* e *Asp700* (COSTANTINI *et alii*, 2006b; COSTANTINI *et alii*, 2007a). Le metodiche di riproduzione assistita ed inseminazione artificiale (IA), con crioconservazione del seme, possono svolgere un ruolo determinante nei programmi di conservazione della originale variabilità genetica delle specie (banca del seme) e nei progetti di conservazione *ex situ* dell'avifauna selvatica protetta, per la terapia della infertilità di coppia da *impotentia coeundi* (incompatibilità di coppia, *imprinting* inidoneo, patologie biomecchaniche). Negli uccelli sono state individuate varie tecniche di inseminazione artificiale e di conservazione di materiale seminale diluito, refrigerato e congelato in specie domestiche e selvatiche utilizzando diversi diluitori come il TALP (Tyrode modificato), il turkey sperm extender (TSE), il chicken sperm extender (CSE), l'Ham's F-10 e la soluzione di Tyrode, ma non sempre con definizione di metodiche affidabili, semplici ed economiche (ST. JALME *et alii*, 2003). Nell'ambito di un programma di ricerca sulla inseminazione artificiale del Colombo viaggiatore, *Columba livia*, individuato come specie 'modello' per programmi di conservazione *ex situ* di specie 'prioritarie' dell'avifauna selvatica protetta indigena ed esotica, è stata realizzata la valutazione di alcuni parametri del seme fresco (volume, colore, motilità e concentrazione) e degli effetti sulla percentuale di motilità degli spermatozoi di alcuni diluitori, innovativi per l'avifauna, (INRA 96®; EZ-Mixin®“BF”; EquiPro®) durante la refrigerazione. L'inseminazione intracloacale è stata realizzata, nel Colombo viaggiatore, con seme fresco, in via preliminare e propedeutica rispetto alla definizione di tecniche di IA con liquido seminale crioconservato (fertilità uova = n. uova fertilizzate / n. uova deposte x 100 = 6/10 = 60%) (COSTANTINI *et alii*, 2007b). Nelle specie selvatiche allevate in cattività fattori stressogeni multifattoriali possono interferire negativamente con il controllo neuroendocrino della funzionalità riproduttiva, determinando problemi di infertilità e/o ipofertilità da stress sia maschile sia femminile (*impotentia generandi sine materia*), con blocco della deposizione delle uova o, comunque, con la nascita di un numero molto modesto di *pulli*. Nell'ambito di una serie di studi sulla biologia riproduttiva di varie specie dell'avifauna selvatica protetta indigena ed esotica è stata definita una terapia farmacologica della infertilità da deficit neuroendocrino, mediante somministrazione di analoghi del GnRH short-acting, il fattore ipotalamico di liberazione delle gonadotropine ipofisarie, in grado di indurre il ripristino di regolare attività gonadica (deposizione di uova, nascita di *pulli* vivi e vitali, cure parentali tipiche di specie) in individui in quiescenza riproduttiva (LACALANDRA *et alii*, 1985; COSTANTINI *et alii*, 1988).

I programmi di ricerca hanno portato di recente ad una evoluzione del-

la metodica farmacologica con formulazione e realizzazione di una nuova ed originale preparazione farmacologica a lento rilascio (GnRH slow-release), con posologia specie-specifica e di agile applicazione in campo (somministrazione unica o *una tantum*). La nuova preparazione farmacologica è stata somministrata, in via preliminare, in specie modello, il Pappagallino ondulato, *Melopsittacus undulatus*, ed il Fagiano comune, *Phasianus colchicus*, e, quindi, in specie di maggiore 'pregio biologico' di Falconiformi, Psittaciformi e Passeriformi, con valutazione dei parametri clinici riproduttivi ed indagini collaterali non invasive (titolazione steroidi fecali, ecografia gonadica). Nei piani di conservazione integrata dell'avifauna selvatica protetta le metodiche di rilascio in natura (*hacking, direct fostering, cross fostering*) di giovani individui nati in ambiente controllato sono risultate efficaci per alcune specie 'prioritarie' di Falconiformi (FREY & WALTER, 1989; CECCOLINI *et alii*, 2007). Nell'ambito di un programma preliminare di ricerca sulle tecniche di assistenza neonatale e di rilascio del Grillaio, *Falco naumanni*, in Puglia, un *pullus*, nato mediante incubazione artificiale di uova raccolte da nido naturale privo di cure parentali (Osservatorio Faunistico Regionale di Bitetto, Regione Puglia), è stato adottato da una coppia adulta naturale (*direct fostering*), in nido artificiale. Allevato da operatori, sin dalla schiusa, in Unità di Terapia Intensiva (D.P.A. - Università degli Studi di Bari), il *pullus*, è stato trasferito nel Parco Nazionale dell'Alta Murgia (Gravina di Puglia), all'età di 15 giorni, munito di anello di identificazione (INFS), in un nido artificiale (LIPU) con nidiate compatibile per numero, peso ed età dei *pulli*. L'intervento di rilascio, monitorato mediante videocontrollo, ha avuto esito positivo con attività comportamentali ed involo del *pullus*, all'età di 34 giorni, tipici dei grillai selvatici.

### Conclusioni

Nell'ambito di specifici programmi di ricerca sono state individuate e definite nuove metodiche diagnostiche e terapeutiche per la riproduzione assistita degli uccelli, con aumento del tasso di fertilità, nascita di *pulli* vivi e vitali e cure parentali tipiche di specie. Le terapie farmacologiche innovative (GnRH slow-release) dell'infertilità maschile e femminile da deficit neuroendocrino e la possibilità di una adeguata e precoce formazione delle coppie di riproduttori in specie monomorfiche e dimorfiche (immaturi), mediante le tecniche incruente di sessaggio genetico (DNA da piuma o da membrana testacea), associate ad efficaci procedure di inseminazione artificiale ed a recenti acquisizioni di medicina neonatologica e di tecniche di rilascio (*direct fostering*) di giovani rapaci *captive-born*, fanno intravedere, anche per l'avifauna selvatica protetta, nuovi e concreti strumenti operativi nei programmi di conservazione integrata della biodiversità.

*Ringraziamenti* - Gli Autori ringraziano per il sostegno e la collaborazione la Regione Puglia (Osservatorio Faunistico Regionale - Assessorato Risorse Agroalimentari; Ufficio Parchi - Assessorato all'Ecologia), l'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, la LIPU, la Provincia di Catanzaro, lo staff del Progetto WWF Capovaccaio e lo Zoosafari di Fasano.

BIBLIOGRAFIA

- BUTCHART S.H.M., STATTERSFIELD A.J., BAILLIE J., BENNUN L.A., STUART S.N., AKCAKAYA H.R., HILTON-TAYLOR C. & MACE G.M., 2005 - Using Red List Indices to measure progress towards the 2010 target and beyond - *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360: 255-258.
- CECCOLINI G., CENERINI A., LACALANDRA G.M., AEBISCHER A., ANDREOTTI A., GUSTIN M., BEDIN M., SIGISMONDI A., GIACOIA V., BELLINI F., BARBERIO F. & COSTANTINI V., 2007 - Tecnica dell'*hacking* e programmi di conservazione *ex situ* del Capovaccaio (*Neophron percnopterus*) in Italia: note preliminari - Atti V Congresso Nazionale S.I.R.A., Alghero, pp. 118-120.
- COSTANTINI V., MINOIA P. & DI NANNA I., 1988 - GnRH and light conditioning of reproduction in birds - Proc. 11<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Ireland, 354 pp.
- COSTANTINI V., GUARICCI A.C., CHAMMEM M., SEDDIK M.M., LACALANDRA G.M., HAMMADI M. & KHORCHANI T., 2006a - Sexage de l'Outarde Houbara par PCR sur plume - Séminaire international: Elevage et faune sauvage dans les régions aride et désertiques, Djerba, Tunisie, 33 pp.
- COSTANTINI V., GUARICCI A.C., CONZO G., LACALANDRA G.M. & MINOIA P., 2006b - Sessaggio di Rapaci Diurni e Notturmi mediante Per e Polimorfismo di Restrizione (RFLP) - Atti IV Congresso Nazionale S.I.R.A., Pisa, pp. 129-131.
- COSTANTINI V., GUARICCI A.C., INGLESE G., LA GIOIA G., D'ONGHIA T. & LACALANDRA G.M., 2007a - Sessaggio del Grillaio (*Falco naumanni*) mediante PCR-RFLP da piuma - Atti V Congresso Nazionale S.I.R.A., Alghero, pp. 124-126.
- COSTANTINI V., NICASSIO M., BUCCI F., BINETTI F. & LACALANDRA G.M., 2007b - Valutazione del liquido seminale, refrigerazione, e inseminazione artificiale nel Colombo viaggiatore (*Columba livia*) - Atti V Congresso Nazionale S.I.R.A., Alghero, pp. 121-123.
- FREY H. & WALTER W., 1989 - The reintroduction of the bearded vulture *Gypaetus barbatus* into the Alps. In: MEYBURG B.U.M. & CHANCELLOR R.D. (eds). Raptors in the Modern World - Proceeding of the 3<sup>rd</sup> World Conference on Birds of Prey and Owls, 1987. World Working Group on Birds of Prey and Owls, Berlin, pp. 341-344.
- GARIBOLDI A., ANDREOTTI A. & BOGLIANI G., 2004 - La conservazione degli uccelli in Italia. Strategie e azioni - *Alberto Perdisa Editore*, Bologna.
- GUARICCI A.C., MINOIA R., LACALANDRA G.M. & COSTANTINI V., 2005 - Sessaggio dei volatili monomorfici mediante PCR - Atti III Congresso Nazionale S.I.R.A., Roma, pp. 119-122.
- LACALANDRA G.M., ZARRILLI A. & CINONE F., 1985 - Deposizione anticipata in fagiani - *Praxis Vet.*, 4: 15.
- ST. JALME M., LECOQ R., SEIGNEURIN F., BLESBOIS E. & PLOUZEAU E., 2003 - Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the step towards a cryobank for endangered avian species - *Theriog.*, 59: 875-888.