

Contractor:

Stațiunea de Cercetare Dezvoltare pentru Creșterea Bubalinelor – S.C.D.C.B. Șercaia

Obiectivul general: *ADER 2026*

Numărul /codul proiectului: *7.2.2*

Data începerii: *19.07.2023*

Data finalizării: *30.06.2026*

Durata: *36 luni*

DENUMIREA PROIECTULUI:

SOLUȚII BIOECONOMICE PENTRU CONSERVAREA BIVOLULUI ROMÂNESC
„IN SITU” PRIN MONTĂ DIRIJATĂ ȘI „EX SITU” PRIN GAMEȚI ȘI EMBRIONI
OBȚINUȚI CU AJUTORUL BIOTEHNOLOGIILOR DE REPRODUCȚIE

Denumirea Fazei 2:

PRODUCEREA EMBRIONILOR, CONSERVAREA PE TERMEN SCURT ȘI MEDIU, TRANSFERUL
LA RECEPTOARE

Persoana de contact (Director de proiect):

Dr. Ing. Bota Adrian

Tel: 0726737908; e-mail: adrianbota68@yahoo.com

OBIECTIVUL CONFORM PROGRAMULUI ADER 2026:

Obiectiv general: *Managementul durabil al resurselor genetice animale*

Obiectiv specific: Conservarea și prezervarea populațiilor de animale rase, linii, vulnerabile și în pericol de dispariție și implementarea politicilor agricole comune

Obiectivul proiectului:

Conservarea Bivolului Românesc „in situ” prin montă dirijată și „ex situ” prin gameți și embrioni obținuți cu ajutorul biotehnologiilor de reproducție.

Obiectivele fazei 2:

Producerea embrionilor și evaluarea acestora; Conservarea pe termen scurt a embrionilor; Transferul embrionilor recoltați la bivolițele receptoare

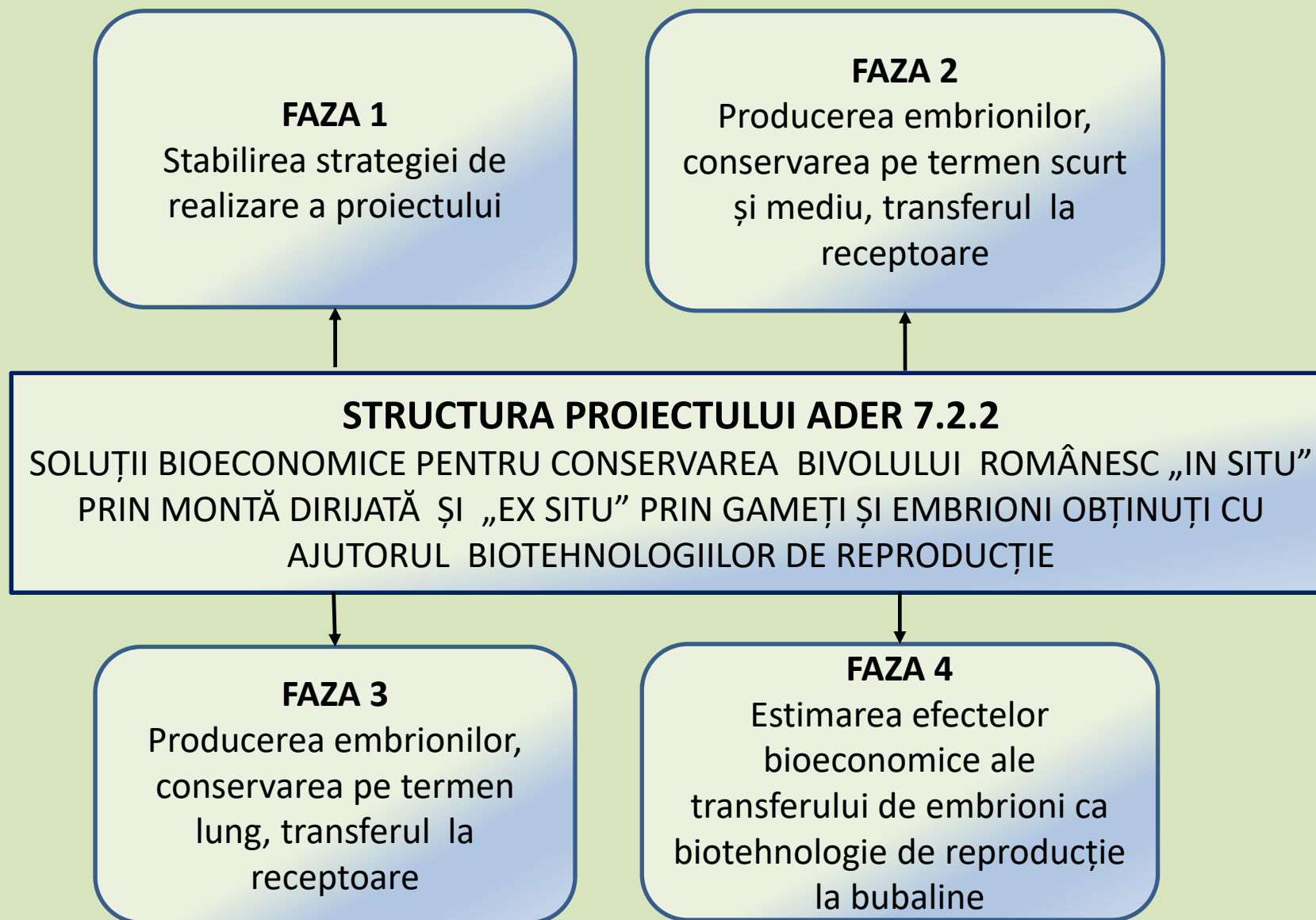
SCOPUL CERCETĂRILOR:

Prin proiect, va avea loc:

- Obținerea embrionilor de la bivolițele din rasa Bubaline Românească;
- Conservarea embrionilor obținuți de la bivolițe;
- Transferul de embrioni la bivolițe

METODE DE CERCETARE:

- ❖ tehnici de inseminare artificială a bivolițelor;
- ❖ tehnici de colectare a embrionilor și clasificarea acestora;
- ❖ tehnici de selecție și pregătire a bivolițelor receptoare;
- ❖ tehnici de transfer a embrionilor la bivolițele receptoare;
- ❖ tehnici de crioconservare a embrionilor pentru păstrare îndelungată și transport;
- ❖ tehnici de diagnostic al gestației.



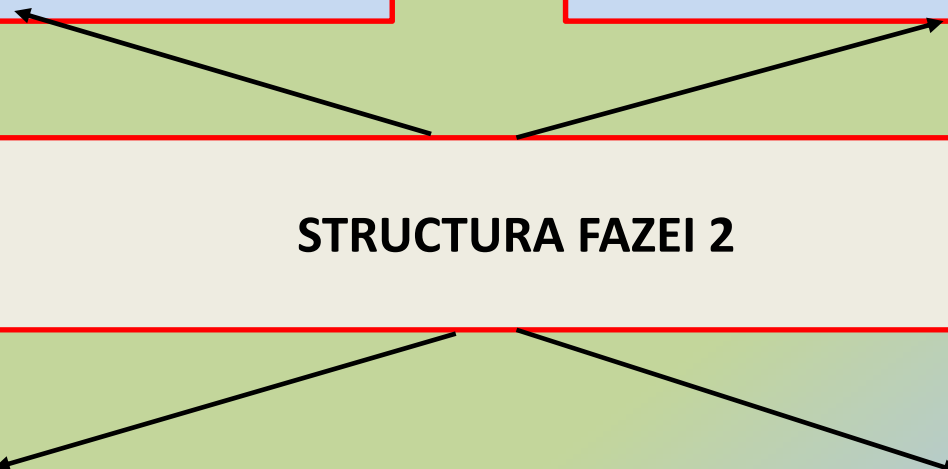
Activitatea 2.1.
Inducerea poliovulației la
femelele donatoare de embrioni

Activitatea 2.2.
Selecția femelelor receptoare
de embrioni

STRUCTURA FAZEI 2

Activitatea 2.3.
Fecundarea “in vivo” a
ovocitelor și recoltarea
embrionilor

Activitatea 2.4.
Transferul embrionilor la
bivolițele receptoare



Activitatea 2.1. Inducerea poliovulației la femelele donatoare de embrioni

- Scopul activității a fost stimularea ovulației multiple controlate pentru colectarea de embrioni viabili, destinați conservării ex situ.
- 30 de bivolițe din rasa Bivol Românesc au fost selectate pe baza sănătății, statusului reproductiv și istoricului productiv.
- Tratamentele hormonale au fost realizate sub supraveghere veterinară, iar bivolițele au fost întreținute în condiții optime de microclimat și nutriție.
- Distribuția bivolițelor donatoare de embrioni în funcție de lactațiile încheiate este următoarea: 5 bivolițe în lactația a II-a, 8 în lactația a III-a, 8 în lactația a IV-a, 6 în lactația a V-a și 3 în lactația a VI-a și peste.
- Distribuția bivolițelor pe loturi experimentale și tip de protocol aplicat: din cele 30 de bivolițe, 14 au urmat protocolul 1 (poliovulație pe ciclu natural) și 16 protocolul 2 (superovulație cu inducerea estrului).
- Sincronizarea estrului a avut un rezultat de 100% pentru protocolul 1 și 94% pentru protocolul 2.
- Administrarea FSH a determinat un răspuns ovarian mediu de 9,3 foliculi pentru protocolul 1 și 10,6 pentru protocolul 2.
- Administrarea FSH a determinat un răspuns ovarian mediu de 9,3 foliculi pentru protocolul 1 și 10,6 pentru protocolul 2. Rezultatele comparate între cele două protocoale arată că lotul 1 (poliovulație pe ciclu natural) și lotul 2 (superovulație cu inducerea estrului) sunt similare în majoritatea parametrilor, cu mici diferențe, lotul 2 având o vârstă medie mai mică, o rată de estru mai scăzută și un interval estru mai scurt.
- Lotul 2 a avut un răspuns mai bun la superovulație și un număr mai mare de foliculi >8 mm și ovulați.
- Vârsta medie a bivolițelor donatoare (aproape 5 ani) și scorul de condiție corporală (3,20 în Lotul 1 și 3,30 în Lotul 2) au fost adecvate pentru tratamentele de poliovulație și superovulație, fără diferențe semnificative între loturi. Aceste valori nu au limitat răspunsul reproductiv.

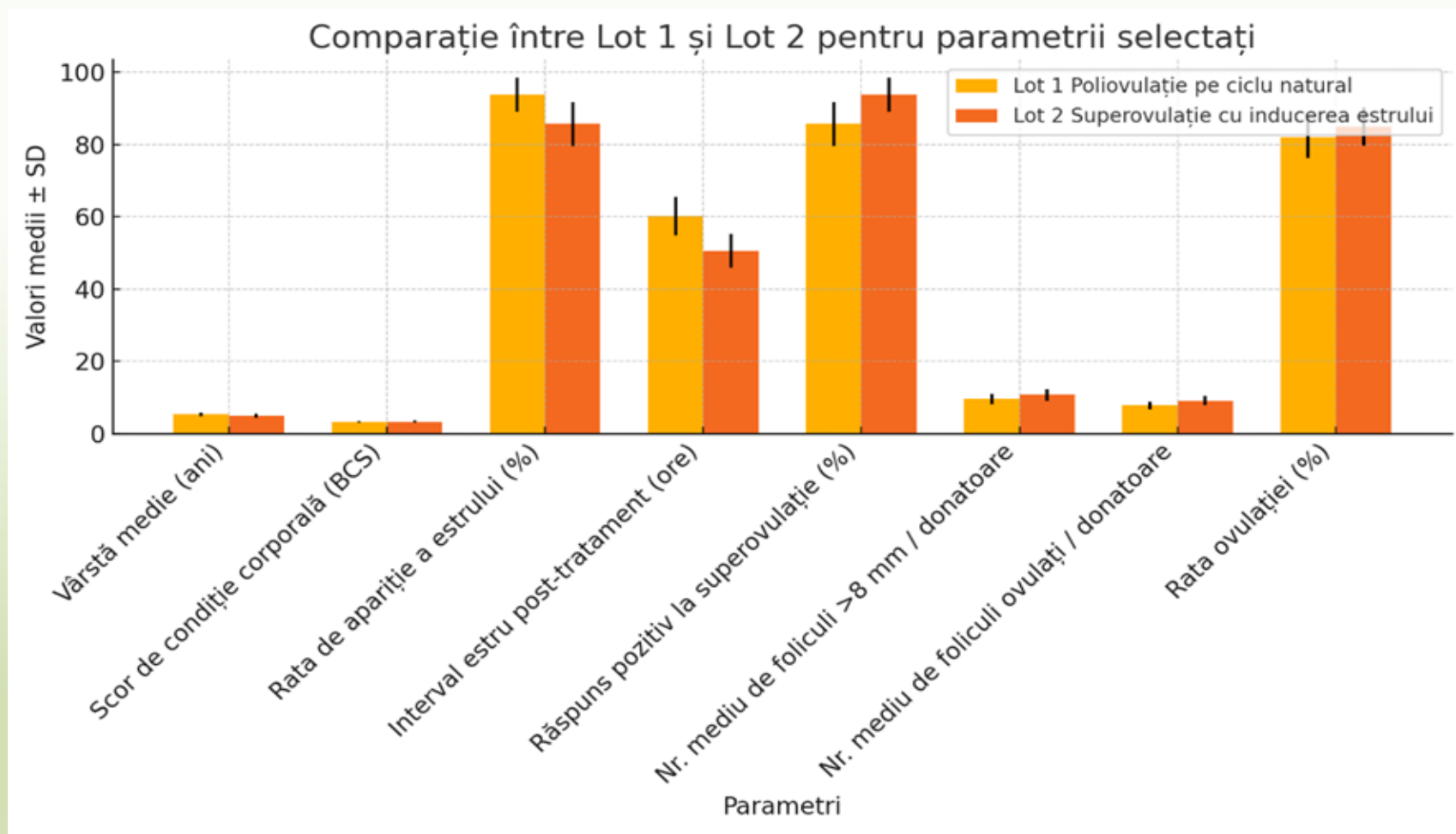
Activitatea 2.1. Inducerea poliovulației la femelele donatoare de embrioni

- Rata de apariție a estrului a fost mai mare în lotul 2 (93,8%) comparativ cu lotul 1 (85,7%), indicând că inducerea estrului prin tratamente hormonale îmbunătățește sincronizarea și succesul tratamentelor de fertilizare. Aceste rezultate susțin eficiența protocoalelor de superovulație cu inducerea estrului.
- Lotul 2 (superovulație cu inducerea estrului) a avut un interval estru post-tratament semnificativ mai scurt (50,6 ore) comparativ cu lotul 1 (60,2 ore), sugerând că inducerea estrului îmbunătățește sincronizarea și eficiența programelor de fertilizare și transfer de embrioni.
- Lotul 2 a avut un număr mai mare de foliculi >8 mm (10,7) comparativ cu lotul 1 (9,5), indicând că tratamentele hormonale pentru inducerea estrului stimulează dezvoltarea unui număr mai mare de foliculi maturi.
- Rata ovulației a fost semnificativ mai mare în lotul 2 (90,5%) față de lotul 1 (80,3%), indicând că tratamentele hormonale pentru inducerea estrului îmbunătățesc sincronia foliculară și ovulația multiplă.

Tabel 8. Rezultate comparative între cele două protocoale		
Parametru	Lot 1 Poliovulație pe ciclu natural (n=14) (Media ± SD)	Lot 2 – Superovulație cu inducerea estrului (n=16) (Media ± SD)
Vârstă medie (ani)	5,3 ± 0,5	5,0 ± 0,6
Scor de condiție corporală (BCS)	3,20 ± 0,22	3,30 ± 0,20
Rata de apariție a estrului (%)	93,8 ± 4,8	85,7 ± 6,1
Interval estru post-tratament (ore)	60,2 ± 5,3	50,6 ± 4,7
Răspuns pozitiv la superovulație (%)	85,7 ± 6,1	93,8 ± 4,8
Nr. mediu de foliculi >8 mm / donatoare	9,5 ± 1,4	10,7 ± 1,6
Nr. mediu de foliculi ovulați / donatoare	7,8 ± 1,1	9,1 ± 1,3
Rata ovulației (%)	82,1 ± 5,8	85,0 ± 5,2

Activitatea 2.1. Inducerea poliovulației la femelele donatoare de embrioni

Rezultate comparative între cele două loturi de bivolițe donatoare



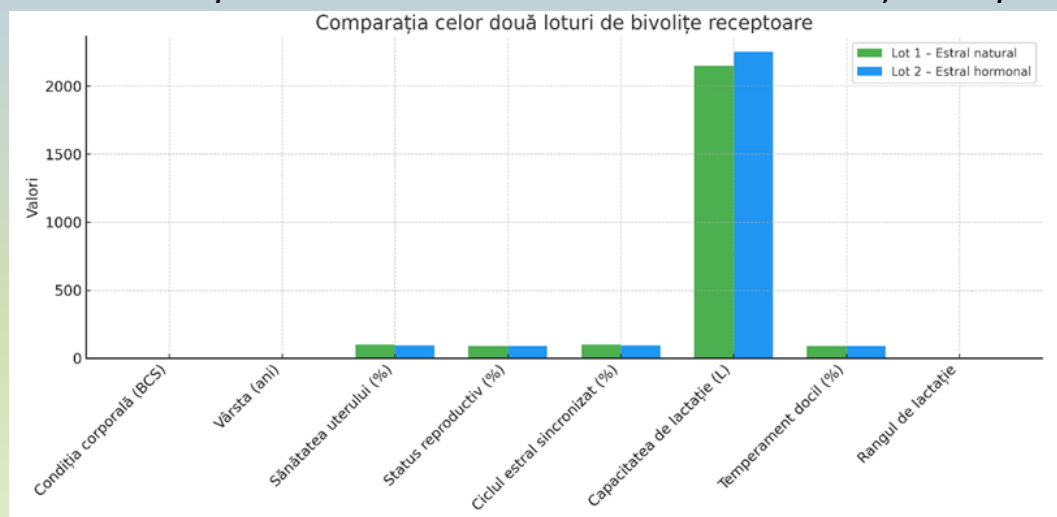
Activitatea 2.2. Selecția femelelor receptoare de embrioni

- Transferul de embrioni la bivolițe depinde de selectarea corectă a femelelor receptoare, bazată pe factori precum condiția corporală optimă (BCS 3,0-3,5), vârsta (4-8 ani), sănătatea uterului, istoricul reproductiv, sincronizarea estrului cu donatoarele, capacitatea de lactație și temperamentul docil.
- 30 de bivolițe receptoare reprezintă eșantionul ideal, asigurând puterea statistică necesară și validitatea rezultatelor.
- Selecția bivolițelor receptoare include evaluarea condiției corporale, vârstei, sănătății uterului, statusului reproductiv și sincronizării estrului, cu rezultate așteptate și obținute semnificative, inclusiv sincronizare estrului.
- Selecția bivolițelor receptoare include evaluarea condiției corporale, vârstei, sănătății uterului, statusului reproductiv și sincronizării estrului, cu rezultate așteptate și obținute semnificative, inclusiv sincronizare estrului.
- În urma selecției bivolițelor receptoare de embrioni, indicatorii pentru lotul 1 (sincronizare naturală) și lotul 2 (sincronizare hormonală) au fost comparabili, cu mici diferențe. Condiția corporală a fost $3,10 \pm 0,25$ la lotul 1 și $3,20 \pm 0,22$ la lotul 2.
- Sincronizarea estrului a fost de 21 ± 2 zile la lotul 1 și $18 \pm 1,5$ zile la lotul 2.
- Capacitatea de lactație și temperamentul docil au fost similare între cele două loturi. Rangul de lactație a fost ușor mai mare la lotul 2. În ceea ce privește selecția receptoarelor, lotul 1 (sincronizare naturală) a avut o condiție corporală de $3,0 \pm 0,2$, iar lotul 2 (sincronizare hormonală) a avut un scor mai mare, $3,2 \pm 0,2$, indicând o stare mai bună. Ambele loturi au inclus bivolițe cu vârste între 4,5 și 6 ani, optimă pentru reproducție.

Activitatea 2.2. Selecția femelelor receptoare de embrioni

- Aproape 95% dintre bivolițe aveau un uter sănătos, iar 90% aveau un ciclu estral activ, indicând o sincronizare eficientă a estrului. Aceste condiții favorabile sugerează un protocol de succes pentru transferul de embrioni.
- La lotul 1 (sincronizare naturală), durata ciclului estral a fost de 21 zile, iar la lotul 2 (sincronizare hormonală) a fost între 18-20 zile, indicând o sincronizare mai precisă.
- Capacitatea de lactație a fost similară în ambele loturi, cu o medie de 6,5-6,8 litri/zi. Aproape 85-90% dintre bivolițe aveau temperament docil, iar majoritatea erau la a doua sau a treia lactație, optimă pentru receptivitate uterină și succesul transferului de embrioni.
- Sincronizarea naturală și hormonală sunt metode eficiente pentru pregătirea bivolițelor receptoare de embrioni, fiecare având avantaje specifice. Starea generală de sănătate, sănătatea uterului și statusul reproductiv sunt factori esențiali pentru succesul transferului. Capacitatea de lactație adecvată și temperamentul docil contribuie la succesul transferurilor. Se recomandă selecția riguroasă a bivolițelor pentru a maximiza șansele de succes.

Rezultate comparative între cele două loturi de bivolițe receptoare



Activitatea 2.3. Fecundarea “in vivo” a ovocitelor și recoltarea embrionilor

- Fecundarea ovocitelor în programul de reproducție asistată la bivolițe poate fi realizată prin inseminare artificială sau montă naturală, în funcție de condițiile de management. Studiul a inclus 30 de bivolițe selecționate pe baza sănătății reproductive și condiției corporale.
- După confirmarea estrului, la un lot de bivolițe, s-a aplicat un protocol standardizat de poliovulație folosind FSH, ajustat în funcție de răspunsul ovarian.
- După confirmarea estrului, la un lot de bivolițe, s-a aplicat un protocol standardizat de poliovulație folosind FSH, ajustat în funcție de răspunsul ovarian.
- Evaluarea parametrilor ovarieni la bivolițele donatoare s-a realizat prin ecografie transrectală la 7 zile după fecundare.
- S-au monitorizat numărul de foliculi >8 mm și corpuri galbene formate, pentru a calcula rata de ovulație.
- Lotul 1 (ciclu estral fiziologic) a fost evaluat pentru răspunsul fiziologic la tratamentul cu FSH, iar lotul 2 (sincronizare hormonală) pentru eficiența controlului exogen asupra ovulației.
- Evaluările ecografice pentru parametrii ovarieni după poliovulație au fost realizate la 24-36 ore înainte de inseminare și la 7 zile după fecundare. La lotul 1, numărul mediu de foliculi >8 mm a fost 9,5 și rata ovulației 82,1%. La Lotul 2, numărul mediu de foliculi >8 mm a fost 10,7, iar rata ovulației 85%.
- În programul de poliovulație s-a obținut următoarele rezultate: Lotul 1 a avut un număr mediu de 9,5 foliculi >8 mm și o rată de ovulație de 82,1%, iar lotul 2 a avut 10,7 foliculi >8 mm și o rată de ovulație de 85,0%.
- Eficiența tratamentului a fost ușor mai mare la lotul 2, dar lotul 1 a prezentat și el rezultate foarte bune, sugerând că ciclul natural bine exprimat poate susține performanțe similare cu cele obținute prin tratamente hormonale.

Activitatea 2.3. Fecundarea “in vivo” a ovocitelor și recoltarea embrionilor

- Controlul fecundării s-a făcut ecografic la 7 zile în ambele loturi. La lotul 1, fecundarea s-a realizat prin montă naturală și IA suplimentară, cu un total de 28 de fecundări. La Lotul 2, fecundarea a fost realizată prin IA programată, cu un total de 32 de fecundări.
- Embrionii au fost recoltați la 7 zile post-fecundare de la 13 bivolițe din fiecare lot.
- La lotul 1, numărul embrionilor recoltați a variat între 5 și 10 pe bivoliță, iar la lotul 2 între 4 și 9. Din aceștia, embrionii viabili (Grad 1-2 IETS) au fost folosiți imediat sau conservați la +5°C pentru maxim 48 de ore.

Tabel 16. Indici cantitativi la recoltarea embrionilor de la bivolițe

Indicator	Valori așteptate	Interpretare
Număr mediu de embrioni recoltați/bivoliță	3-8	Depinde de răspunsul la superovulație și fertilizare
Număr total de embrioni recoltați la bivolițe	30-80	Un număr mai mare indică succesul procedurii
Număr de embrioni viabili (Grad 1 și 2) (%)	≥ 70%	Selecția pentru transfer sau crioconservare
Număr de embrioni transferabili (%)	60-80%	Embrioni care pot fi implantați cu succes
Număr de embrioni crioconservați (%)	40-60%	Depinde de calitatea embrionilor și planul de conservare

Tabel 17. Indici calitativi la recoltarea embrionilor de la bivolițe

Indicator	Metoda de evaluare	Valori optime
Calitatea embrionilor	Clasificare IETS (Grad 1-4)	> 70% Grad 1 și 2
Viabilitatea embrionilor	Morfologie, compactitate, fragmentare celulară	Embrioni cu formă simetrică, fără degenerare
Recoltare fără contaminare	Teste bacteriologice	Fără bacterii patogene

Activitatea 2.3. Fecundarea “in vivo” a ovocitelor și recoltarea embrionilor

Utilizarea embrionilor obținuți de la bivolițele din cele două loturi și clasificarea lor (Grad 1–2 și Grad 3–4)

Lot bivolițe	Nr. bivolițe recoltate	Total embrioni recoltați	Embrioni viabili	Embrioni folosiți imediat (Grad 1-2)	Embrioni conservați pe termen scurt 24-48h (Grad 1-2)	Rată viabilitate după conservare (%)	Embrioni de grad 3-4 (neutilizați)
Lot 1	13	44	21	7	14	88%	23
Lot 2	13	65	36	11	25	85%	29
Total	26	109	57	18	39	86.5%	52

- Rezultatele obținute la recoltarea embrionilor de la bivolițe au fost aproape conform așteptărilor. În prima lună, tratamentele și inseminările au fost aplicate cu succes, iar în următoarele două luni s-au recoltat 44 embrioni de la lotul 1 și 65 de la lotul 2, cu 21 și 36 embrioni viabili (Grad 1-2) în fiecare lot.
- Numărul mediu de embrioni recoltați a fost mai mare la lotul 2 (5 față de 3.38), iar viabilitatea embrionilor a fost de 47.73% la lotul 1 și 55.38% la lotul 2. Rata de transferabilitate a fost bună în ambele loturi.
- Calitatea embrionilor și viabilitatea au fost conforme standardelor, iar procesul de recoltare a fost eficient, cu un timp mediu de 33-35 minute pe bivoliță.
- Embrionii recoltați au fost clasificați conform IETS în gradele 1 (excelent), 2 (bun), 3 (moderat) și 4 (slab). De la lotul 1 s-au obținut 44 embrioni, iar de la lotul 2, 65 embrioni. Embrionii de grad 1-2 au fost destinați transferului imediat, iar cei de grad 1 au fost conservați. Conservarea s-a realizat la temperaturi de 37°C pe termen scurt și la +5°C pentru 24-48h.

Activitatea 2.4. Stabilirea criteriilor de includere a femelelor în lista donatoarelor de embrioni și a masculilor

- În cadrul activității, au fost utilizate 30 de bivolițe selectate pe baza mai multor criterii (condiție corporală, vârstă, sănătate uterină).
- Lotul 2 (18 bivolițe) a urmat un program de sincronizare a ciclului estral cu analogi de GnRH și PGF₂α. Vârsta medie a donatoarelor a fost de 5,1 ± 0,6 ani pentru Lotul 1 și 5,3 ± 0,5 ani pentru lotul 2.
- Protocolul hormonal a inclus injecții PGF₂α și GnRH pentru a sincroniza estrul și a facilita transferul embrionilor.
- Embrionii proaspeți au fost transferați imediat la receptoarele cu ciclu estal fiziologic, iar cei conservați pe termen scurt (24–48h) au fost transferați la receptoarele sincronizate hormonal.

Rezultatele transferului embrionilor proaspeți și conservați la bivolițele receptoare

Specificare	Nr. Bivolițe Receptoare (Sincronizate natural)	Nr. Embrioni Transferați (Proaspeți)	Nr. Bivolițe Receptoare (Sincronizate hormonal)	Nr. Embrioni Transferați (Proaspeți)	Nr. Embrioni Transferați (Conservați pe Termen Scurt)
TOTAL	12	12	18	6	12

REZULTATE OBȚINUTE

- Inducerea poliovulației la bivolițe - la un total de 30 de bivolițe, împărțite în două loturi distincte, lot 1 - 12 bivolițe cu sincronizare naturală a estrului și lot 2 - 18 bivolițe cu sincronizare hormonală a estrului;
- Prelevarea embrionilor prin tehnici nechirurgicale – un total de 109 embrioni prelevați de la 26 bivolițe donatoare;
- Identificarea și evaluarea morfologică a embrionilor – 109 embrioni identificați și evaluați astfel: 57 embrioni conform standardului IETS grad 1-2 și 52 embrioni evaluați conform standardului IETS grad 3-4;
- Conservarea embrionilor pe termen scurt: 39 embrioni conservați pe termen scurt;
- Sincronizarea ciclului estral al receptoarelor – la 18 bivolițe s-a sincronizat hormonal ciclul estral cu al donatoarelor de embrioni. 12 bivolițe receptoare au avut ciclul estral sincronizat natural cu al donatoarelor;
- Transferul nechirurgical al embrionilor la femelele receptoare – s-au transferat nechirurgical 30 embrioni la 30 bivolițe receptoare;
- Diagnosticul de gestație după transferul embrionilor: După transferul embrionilor s-au diagnosticat 26 bivolițe gestante. După 6 luni de gestație, procentul de fecunditate a fost de 63,3%.

CONCLUZII

- Producerea embrionilor: S-au obținut un număr satisfăcător de embrioni viabili de calitate bună (clasa I și II), care sunt esențiali pentru succesul conservării genetice a speciei;
- Conservarea pe termen scurt și mediu: Prin utilizarea tehnologiilor de conservare, s-au stocat embrioni pentru a asigura o rezervă genetică viabilă, care poate fi utilizată ulterior, contribuind astfel la păstrarea diversității genetice a Bivolului Românesc;
- Transferul la receptoare: Sincronizarea corectă a ciclurilor estrale și transferul embrionilor au dus la o rată de succes optimă a gestației, susținând creșterea numărului de viței născuți, care sunt esențiali pentru conservarea populației de Bivol Românesc.

