



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE VETERINARIE

Direttore: Prof.ssa Berliguer Fiammetta

XXXI CICLO

**Caratteristiche del volo, condizione genetica, aspetti etologici-
riproduttivi e condizione di stress nel grifone (*Gyps fulvus*) in
Sardegna**

Tutor: Prof. Naitana Salvatore

Dottorando: Dr. Frongia Gian Nicola

ANNO ACCADEMICO 2017 – 2018

Sommario

ABSTRACT	4
1. INTRODUZIONE	5
1.1 <i>Biodiversità</i>	5
1.2 <i>Distribuzione e popolazioni</i>	6
1.3 <i>Gli avvoltoi in Sardegna, il grifone</i>	10
1.4 <i>Biologia del grifone</i>	11
1.5 <i>Habitat del grifone</i>	13
2. ESPERIMENTO 1: STUDIO ETOLOGICO DEL GRIFONE NELLE COLONIE RIPRODUTTIVE DELLA ZONA DEL BOSANO. .	16
2.1 <i>Scopo</i>	16
2.2 <i>Materiali e metodi</i>	17
2.3 <i>Risultati e discussione</i>	19
3. ESPERIMENTO 2: ANALISI FILOGENETICA E VARIAZIONI DI FREQUENZA DEGLI ALOTIPI DOPO IL RIPOPOLAMENTO NELLA POPOLAZIONE SARDA DI GRIFONE.	34
3.1 <i>Scopo</i>	34
3.2 <i>Materiali e metodi</i>	35
3.3 <i>Risultati</i>	37
3.4 <i>Discussione</i>	40
3.5 <i>Conclusioni</i>	42
4. ESPERIMENTO 3: FILOGEOGRAFIA E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DELLE POPOLAZIONI DI GRIFONE IN TRE ISOLE DEL MEDITERRANEO.	44
4.1 <i>Scopo</i>	44
4.2 <i>Materiali e metodi</i>	45
4.3 <i>Risultati</i>	48
4.4 <i>Discussione</i>	50
4.5 <i>Conclusioni</i>	53
5. ESPERIMENTO 4: CARATTERISTICHE STRUTTURALI DELLE SEZIONI TRASVERSALI DELLE OSSA DELL'ALA NEL GRIFONE COME PREDIZIONE DELLO STILE DI VOLO.	54
5.1 <i>Scopo</i>	54
5.2 <i>Materiali e metodi</i>	56
5.3 <i>Risultati</i>	60
5.4 <i>Discussione</i>	64
5.5 <i>Conclusioni</i>	70
6. ESPERIMENTO 5: CONCENTRAZIONI DI CORTISOLO E DHEA NELLE PENNE DI GRIFONE PER VALUTARE LA CONDIZIONE DI STRESS SANITARIO.	71
6.1 <i>Scopo</i>	71
6.2 <i>Materiali e metodi</i>	73
6.3 <i>Risultati</i>	76
6.4 <i>Discussione</i>	78
6.5 <i>Conclusioni</i>	81
BIBLIOGRAFIA	82

Abstract

La presente tesi di Dottorato è stata incentrata su una specie animale di alto valore ecologico, il grifone (*Gyps fulvus*), presente in Sardegna nel territorio Bosano in un'area dall'importante rilevanza naturalistica ed inclusa nella Rete Natura 2000. L'attività di ricerca è stata articolata con metodo multidisciplinare in cui, etologia, genetica, endocrinologia, anatomia e fisiologia, sono state combinate insieme al fine di approfondire le conoscenze sulla specie.

Un primo lavoro riguardante la specie è stato condotto sul campo, dove abbiamo studiato l'etologia dell'animale e le caratteristiche riproduttive, considerando quei parametri che meglio descrivono il benessere delle colonie. Le differenze osservate nel successo riproduttivo fra le sei colonie prese in esame, ci ha condotto ad intraprendere uno studio sulle concentrazioni di Cortisolo e DHEA nelle penne per valutare la condizione di stress sanitario degli animali. Questo approccio potrebbe rappresentare un modello non invasivo supplementare per indagare sul benessere delle colonie.

Il grifone, è un rapace necrofago dalle grosse dimensioni corporee, si sposta esclusivamente mediante un volo veleggiato statico e solo eccezionalmente lo si può osservare nel battere le ali. Questo interessante aspetto ci ha condotto a compiere, sia uno studio sulle caratteristiche strutturali delle ossa dell'ala, sia una indagine genetica della popolazione. Infatti, per via del tipo di volo, il grifone ha difficoltà nell'attraversamento dei tratti di mari, e di conseguenza è geneticamente sottoposto ai fenomeni dell'isolamento. Abbiamo condotto analisi di caratterizzazione genetica delle popolazioni di grifone in Sardegna e in altre due isole del mediterraneo (Cipro e Creta) e studiato le variazioni di frequenza degli aplotipi in Sardegna prima e dopo il 1986, quando mediante azioni di ripopolamento, vennero introdotti grifoni provenienti dal continente Europeo.

1. Introduzione

1.1 Biodiversità

Gli ecosistemi insulari sono sempre stato oggetto di particolare attenzione da parte degli studiosi. Le vaste distese di acqua rappresentano il principale ostacolo alla distribuzione delle specie, e la distanza di un'isola dalla terraferma influisce sulla sua ricchezza, questo fenomeno riguarda non solo i mammiferi ma anche i volatili dal momento che non tutte le famiglie di uccelli sono in grado di disperdersi verso le isole più lontane dalla terraferma (Terborgh, 1973), così che isole remote hanno meno specie, specialmente non endemiche (Kalmar and Currie, 2006); tuttavia, in alcuni casi le specie endemiche possono raggiungere numeri più elevati lontano dalla terraferma poiché l'isolamento, offre migliori opportunità di speciazione (Whittaker et al., 2008).

Inizialmente la Sardegna era parte integrante del continente euroasiatico, circa 30 milioni di anni fa la frattura del continente portò alla formazione della placca sardo-corsa, successivamente in un movimento di traslazione e rotazione verso il centro del Mediterraneo, le isole si allinearono da nord a sud, evento che si concluse, 6-7 milioni di anni fa. Questi due fenomeni geologici di distacco e migrazione che hanno interessato la placca sardo-corsa sono l'origine della peculiare evoluzione della fauna e della flora sardo-corsa, caratterizzata da alcuni paleoendemismi e ad un più cospicuo numero di neoendemismi. I primi derivano dalla conservazione di elementi ancestrali che in seguito si sono estinti nel continente, gli altri dalla evoluzione differenziale con la nascita di nuove specie o sottospecie (Harrison and Noss, 2017). Sebbene queste specie mantengano una sostanziale analogia con la "fauna del continente", esse sono accumulate in generale da caratteristiche "tipiche delle isole", come le dimensioni più piccole degli esemplari rispetto a specie affini presenti in regioni geografiche più grandi.

Nonostante la ricchezza di biodiversità e la prevalenza dell'endemismo gli habitat insulari sono particolarmente sensibili ai rapidi cambiamenti antropogenici, con effetti negativi sulle dimensioni numeriche delle specie (Kreft et al., 2008, Kier et al., 2009). Sono le caratteristiche intrinseche degli ecosistemi insulari come le piccole dimensioni della popolazione, la scarsa disponibilità di habitat, la bassa ridondanza funzionale, ma anche che quelle estrinseche come la minore capacità di dispersione, la competizione con relativamente poche altre specie, che portano le specie insulari a sviluppare strategie di sopravvivenza basate sull'interdipendenza, la coevoluzione e il mutualismo piuttosto che meccanismi di difesa contro un'ampia gamma di predatori e concorrenti (Biber, 2002, Blackburn et al., 2004), risultando così vulnerabili all'estinzione.

Le caratteristiche uniche che rendono così speciale la biodiversità dell'isola fanno sì che questa sia particolarmente fragile e vulnerabile, molte specie isolate sono diventate rare o minacciate e le isole hanno un numero sproporzionato di estinzioni di specie registrate rispetto ai sistemi continentali (Johnson and Stattersfield, 1990, Turvey and Fritz, 2011). Come hanno mostrato Loehle and Eschenbach (2012) analizzando i dati della Lista Rossa IUCN, solo 6 uccelli continentali e 3 mammiferi continentali sono stati registrati come estinti dal 1500, rispetto a 123 specie di uccelli e 58 specie di mammiferi estinti dalle isole, questo rappresenta il 95% delle estinzioni registrate. Il tasso di estinzione sulle isole era 177 volte superiore per i mammiferi e 187 volte superiore per gli

uccelli che sui continenti. Complessivamente, come causa principale, il 74% dei 1.469 uccelli minacciati a livello globale sono colpiti principalmente dall'agricoltura, a seguire, la deforestazione, le specie invasive e la caccia rappresentano le altre principali minacce.

Tra gli animali minacciati di estinzione troviamo gli avvoltoi, animali necrofagi che coprono un ruolo importante nelle campagne, quello del servizio ecologico, oggi diverse specie di avvoltoio sono minacciate in tutto il mondo con una complessiva diminuzione delle loro popolazioni (Sekercioglu, 2006, IUCN, 2018). Attualmente, 14 su 23 (61%) specie di avvoltoio in tutto il mondo sono minacciate di estinzione, e il declino più rapido si è verificato nelle regioni più ricche di avvoltoio (Ogada et al., 2012).

1.2 Distribuzione e popolazioni

L'avvoltoio nel mondo è rappresentato da 23 specie, divise in due famiglie, Cathartidae e Accipitridae, la prima è composta da avvoltoi del nuovo mondo (Nord e Sud America), la seconda da avvoltoi del vecchio mondo (Europa, Africa e Asia). Le 7 specie di avvoltoi del Nuovo Mondo hanno una correlazione filogenetica ancestrale con le cicogne, le 16 specie di avvoltoi del Vecchio Mondo sono strettamente correlate con le aquile e poiane dei Falconiformes (Houston, 1983, Wink, 1995, Mundy et al., 1992). Le due famiglie di avvoltoi rappresentano un importante esempio di evoluzione convergente. Gli avvoltoi Cathartidi e Accipitridi condividono caratteristiche analoghe: teste calve o parzialmente calve per la pulizia o la termoregolazione; lunghe e larghe ali per poter volare sfruttando le correnti termiche e orografiche; vista acuta per cacciare da alte altitudini; estremo pH acido nello stomaco per la digestione di carne in decomposizione, lungo intestino tenue; nidificazione su alberi o pareti rocciose verticali (per proteggersi dai carnivori terrestri e facilitare il decollo); zampe più adatte per camminare piuttosto che per afferrare; becco progettato per strappare carne (nelle specie più grandi) (MO, 2015).

Il *Gyps* è un genere di avvoltoi del Vecchio Mondo a possedere più specie (Weick, 1980, Mundy et al., 1992). Catalogato da Marie Jules César Savigny nel 1809, all'interno di questo genere ritroviamo: il grifone dorsobianco africano (*G. africanus*), l'avvoltoio del Capo (*G. coprotheres*), il grifone di Rueppell (*G. rueppellii*) in Africa; il grifone dorsobianco del Bengala (*G. bengalensis*), il grifone indiano (*G. indicus*), l'avvoltoio beccosottile (*G. tenuirostris*) e grifone dell'Himalaya (*G. himalayensis*) in Asia; mentre il grifone euroasiatico (*G. fulvus*) abita tutta la regione mediterranea (Ferguson-Lees and Christie, 2001, Pain et al., 2003). Altre due specie, conosciuto solo grazie a resti fossili, facevano parte del gruppo *Gyps*, ed erano il *Gyps melitensis* (Lydekker, 1891, Mlíkovský, 2018), presente fino a 0.1 MYA nell'area centro-orientale del mediterraneo ed il *Gyps bochenskii* descritto di recente in Bulgaria presenta fino a 5 MYA (Boev, 2010).

Il Grifone (*Gyps fulvus*, Hablizl 1783) ha avuto un declino numerico durante il diciannovesimo e il ventesimo secolo in gran parte dell'Europa, principalmente a causa della persecuzione diretta ed indiretta da parte dell'uomo mediante l'utilizzo di carcasse avvelenate per combattere i predatori del bestiame (Snow et al., 1998, Ferguson-Lees and Christie, 2001, Orta et al., 2015). Altri fattori che hanno contribuito negativamente alla dimensione della popolazione sono stati l'implementazione della normativa CE sul destino delle carcasse (trasporto per l'incenerimento) e i cambiamenti nelle

pratiche di gestione del bestiame tendenti sempre più ad un allevamento di tipo intensivo piuttosto che estensivo (Orta et al., 2015). La costruzione di impianti eolici, non tiene conto finora delle caratteristiche di alcuni animali, rappresentando una continua minaccia per gli uccelli. In un lavoro scientifico Ferrer et al. (2012) hanno mostrato come il grifone sia la specie più frequentemente soggetta ad impatti con le turbine eoliche, recenti fattori di disturbo alle colonie di grifoni sono rappresentati dall'utilizzo dei droni nell'attività di caccia fotografica e dalle attività di arrampicata.

Tra gli altri fattori che minacciano la specie, vi è un farmaco veterinario, il Diclofenac, un antinfiammatorio non steroideo utilizzato negli animali da allevamento, questo è risultato estremamente tossico per gli avvoltoi e responsabile del loro rapido declino nel subcontinente indiano, dove ha portato all'estinzione cinque specie di avvoltoi (una popolazione di 70 milioni di uccelli) provocando un calo del 99% (Oaks et al., 2004, Shultz et al., 2004, Naidoo and Swan, 2009). L'attuale commercializzazione di questo farmaco e la sua applicazione nella cura degli animali da allevamento (principale fonte di nutrimento degli avvoltoi) rappresenta un fattore di minaccia su vasta scala per le specie di grifoni anche nel continente europeo (Margalida and Oliva-Vidal, 2017).

La popolazione Europea di *Gyps fulvus* è stata stimata in 64.800-68.800 individui (2012), poiché la tendenza delle dimensioni appare in aumento, la specie non si avvicina alla soglia "vulnerabile" secondo i criteri di classificazione del rischio di estinzione (Figura 1). Circa il 90% della popolazione europea è presente in Spagna (Tabella 1) con una dimensione della popolazione riproduttiva stimata in Spagna di > 25000 paia (BirdLife International, 2018).

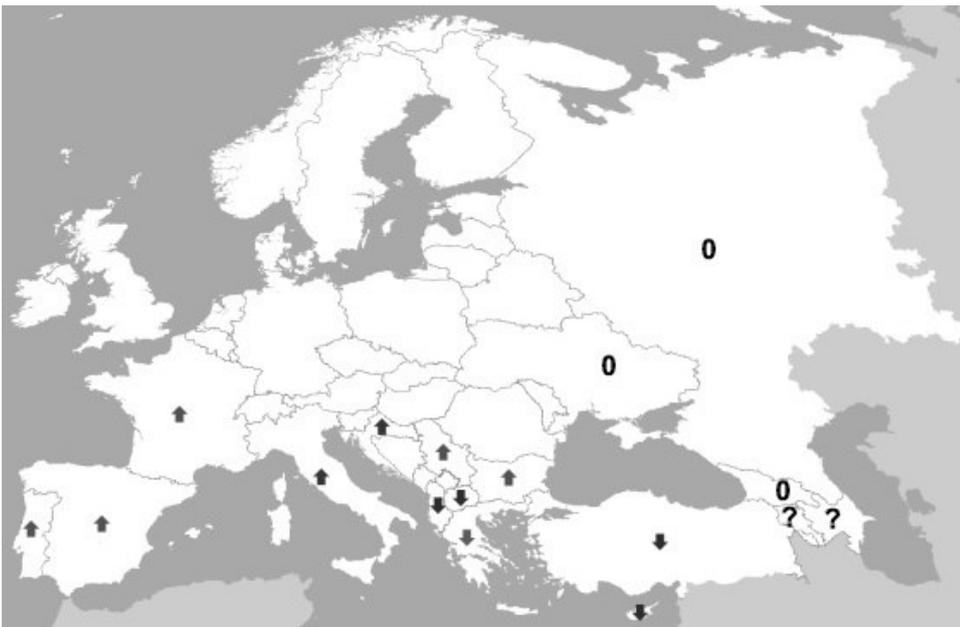


Figura 1. Tendenze demografiche del grifone in Europa (modificato da BirdLife International (2015)). Simboli: in aumento (↑); in diminuzione (↓); stabile (0); sconosciuta (?).

Nazione	Dimensioni popolazione (n° coppie)	Dimensione popolazione (%Europea)	Anni di riferimento	Qualità	Trend della popolazione
Albania	0	<1	2002-2012	-	?
Armenia	40-80	<1	2002-2012	media	?
Azerbaijan	10-50	<1	1996-2000	scarsa	?
Bosnia & HG	0	<1	2010-2014	media	?
Bulgaria	29-60	<1	2005-2012	buona	+
Croazia	110-130	<1	2013	buona	+
Cipro	2-5	<1	2005-2012	buona	0
Francia	1100	3	2008-2012	buona	+
Georgia	40-60	<1	2005-2012	media	0
Grecia	270	1	2013	buona	+
Italia	82-87	<1	2008	buona	+
FYR					
Macedonia	10-40	<1	2001-2012	buona	-
Portogallo	500-1000	2	2008-2012	media	+
Russia	400-500	1	2005-2007	media	-
Serbia	135-141	<1	2013	buona	+
Spagna	29531-30649	90	2008	buona	+
Turchia	150-200	1	2013	media	-
Ucraina	8-10	<1	2000	media	F
EU27	31500-33200	97			In crescita
Europa	32400-34400	100			In crescita

Tabella 1. Dimensioni e tendenze delle popolazioni di grifone nei vari paesi Europei (da BirdLife International (2015)). La tendenza è stata elaborata secondo la media per gli anni dal 2000 al 2012, le direzioni delle tendenze sono riportate come: crescente (+); decrescente (-); stabile (0); fluttuante (F); o sconosciuto (?).

In Italia, differenti cause hanno determinato il declino delle quattro specie di vulturidi un tempo distribuite su gran parte del territorio, ma tutte hanno una base in comune: l'uomo. L'avvoltoio monaco (*Aegypis monachus*), illustrato da Federico II nel libro sulla falconeria, nidificava sugli alberi secolari in aree poco disturbate e soprattutto termofile si è definitivamente estinto in Italia nel 1975, negli ultimi anni è stato osservato nelle Prealpi Friulane, ma solo occasionalmente (Marussi, 2002, WWF, 2014). Il gipeto (*Gypaetus barbatus*) si estinse prima nella penisola (1912) e successivamente in Sardegna, animale dalle forme agili e slanciate, dopo un lungo programma di reintroduzione è oggi presente sulle Alpi italiane con 12-13 coppie potenzialmente riproduttive (BirdLife International, 2018). Il capovaccaio (*Neophron percnopterus*), il più piccolo tra i quattro vulturidi europei, sebbene ben diffuso in Europa, Asia e Africa, era presente in Italia fino al 1950, successivamente ha iniziato ad estinguersi ed al momento sono presenti in Italia solo alcuni esemplari, nel 2015 le coppie nidificanti sono state solo sette, concentrate in Sicilia e Basilicata (BirdLife International, 2018, Savino, 2018). Il grifone è l'unico vulturide a non essersi estinto in Italia, un tempo presente su tutto il territorio, ha subito un grosso declino fino a scomparire completamente nella penisola, in Sicilia, sui Nebrodi gli ultimi grifoni scomparvero nel 1965 a causa una campagna di sterminio delle volpi con bocconi avvelenati. L'unica popolazione italiana a non essere estinta è rappresentata da quella Sarda dove il grifone è sopravvissuto grazie al sostegno degli allevatori nell'area del Bosano, alla scarsa antropizzazione del territorio ed ai programmi di restocking, queste azioni di ripopolamento sono state effettuate anche in altre aree della penisola dove oggi l'animale è presente (Figura 2).



Figura 2. Distribuzione della popolazione di Griffone in Italia.

1.3 Gli avvoltoi in Sardegna, il grifone

L'unica specie di vulturidi presente oggi in Sardegna è il grifone, intorno al 1940 gli individui Sardi erano tra i 1.000 – 1.400, la popolazione subì un progressivo e sempre più rapido tracollo sino ai 150 esemplari del 1974, le cause sono da ascrivere alla scarsità di risorse alimentari, all'uso dei bocconi avvelenati, al disturbo antropico (caccia fotografica, trekking, birdwatching, parapendio, caccia), alla frammentazione e alterazione dell'habitat, all'aumento di elettrodotti, alla costruzione di campi eolici, all'uso di sostanze tossiche e alla presenza di metalli pesanti. Nonostante la realizzazione di alcuni "carnai" ed un maggiore interesse della regione per la protezione della specie con la Legge Regionale 32/78 continuarono le uccisioni da parte dei bracconieri per il commercio abusivo di individui imbalsamati e le morti per avvelenamento. Le coppie passarono così da 70 nel 1985 a 21 nel 1986. Tra il 1986 e 1995 furono reintrodotti 68 grifoni tramite un programma di ripopolamento accordato con Spagna e Francia arrivando a 100-125 esemplari nel 1997, ma la popolazione crollò nuovamente per altri episodi di avvelenamento (Schenk et al., 2007).

Il Gipeto, un tempo presente nell'isola, si estinse intorno agli anni 60 probabilmente per la pressante attività di caccia da parte dell'uomo spinto dalla buona remunerazione offerta dai musei naturalistici, l'ornitologo Helmar Schenk catalogò ben 139 esemplari Sardi di gipeto distribuiti nei vari musei del mondo. L'avvoltoio monaco, presente in Sardegna con 40-60 individui negli anni 50, continuò a subire il declino con l'ultima nidificazione risalente al 1961 (Marussi, 2002). Del capovaccaio non si sono mai osservate coppie di riproduttori nel territorio, ma la presenza di qualche individuo è sempre stata registrata durante il periodo di migrazione della specie.

Come suggerito da Xirouchakis and Mylonas (2005), la popolazione adulta rappresenta un 65-70% della popolazione totale, perciò, conoscendo la dimensione delle coppie territoriali possiamo stimare che la popolazione di grifoni in Sardegna sia rappresentata oggi da circa 130-150 individui, concentrati nella zona del Bosano dove sono presenti le colonie più numerose. Questa popolazione può essere vista, in termini genetici, come una popolazione isolata rispetto a quello del continente. La causa di questa differenza è correlata alla tipologia di volo verso il quale si è evoluto l'animale, definito veleggiatore statico, caratterizzato da una superficie alare molto ampia che gli permette di sfruttare al meglio le correnti ascensionali per guadagnare quota e potersi così spostare risparmiando energia.

Incidenza sullo status del grifone	Fattori limitanti
critica	uso dei bocconi avvelenati (1997/98; 2006/07?)
alta	disturbi antropici (caccia fotografica, trekking, birdwatching, parapendio, caccia) perdita, frammentazione e alterazione di habitat
media, potenzialmente alta	aumento di elettrodotti e costruzione di campi eolici, modifica dell'habitat
bassa	scarsità di risorse alimentari; persecuzione e atti di vandalismo

Tabella 2. Fattori principali correlati al declino della specie grifone in Sardegna (Piano d'azione per il Grifone in Sardegna (Schenk et al., 2007)).

Diversi sono stati i fattori che hanno contribuito in maniera differente al declino della specie (Tabella 2), classificata oggi come specie in Pericolo Critico (Critically Endangered - CR) a livello regionale (Schenk et al., 2007). Oggi l'areale riproduttivo è relegato alla costa tra Bosa e Alghero e al corrispondente entroterra, il numero di individui presenti è estremamente basso, rappresentato da 4-5 individui nell'Algherese e 130-150 nel Bosano.

1.4 Biologia del grifone

L'avvoltoio, appartenente al genere *Gyps*, è caratterizzato dalle grandi dimensioni del corpo, il suo peso può variare dai 6,5 ai 12 kg con una apertura alare che oscilla tra i 240 e 280 cm, possiede un collo lungo che assieme alla testa è ricoperto di un finissimo, lanoso e corto piumino biancosporco. L'avvoltoio Grifone possiede una delle zone termoneutrali più ampie di qualsiasi uccello (Prinzinger et al., 2002), la regione della testa e del collo sono praticamente nude, così come le zampe inferiori, alcune zone ventrali e due chiazze di pelle nuda sul petto, l'animale può a seconda della postura adottata variare l'esposizione della superficie corporea composta da aree nude da 32% al 7%, ottenendo un risparmio nella perdita di calore dal corpo del 52% (Ward et al., 2008).

L'età di questo animale può essere valutata con una precisione di 2 anni combinando le caratteristiche del colore del becco, colore degli occhi, forma e colore delle penne del collo e forma delle copritrici dell'ala (Duriez et al., 2011). I grifoni giovani sono caratterizzati da becco e occhi scuri, lunghe e sottili piume di colore bruno-rossiccio alla base del collo che formano il "collare", e un piumaggio marrone scuro con elementi avente apice acuto. Diventando vecchio, si assiste ad una serie di cambiamenti, in primo luogo il becco diventa chiaro a partire dai lati verso il centro, fino a diventare completamente bianco. La forma e i colori delle grandi copritrici cambiano, da marrone scuro vira verso il chiaro, anche la piume del collare diventano progressivamente bianche e la punta di piume e penne da acuta assume un aspetto arrotondato. Sebbene non vi sia dimorfismo sessuale, i maschi tendono ad acquisire piumaggi adulti più rapidamente rispetto alle femmine (Hoyo et al., 2014, Duriez et al., 2011).

Il grifone ha un tipo di volo definito veleggiato statico, verosimilmente evolutosi in regioni montuose e/o desertiche dove, a causa della limitata presenza di animali, imponevano prolungate permanenze in volo ad alta quota per la ricerca del cibo. Pertanto questo tipo di volo doveva richiedere un dispendio energetico minimo. Il grifone è una specie gregaria, vive in colonie che si localizzano spesso in vaste aree aperte con scarsa vegetazione, in particolar modo preferiscono pareti rocciose e scoscese in aspre zone montane o falesie marine per la nidificazione così da poter sfruttare le correnti ascensionali per il volo planato. Fra i moti dell'atmosfera, quelli che maggiormente interessano la pratica del volo planato sono quelli con componenti verticali, i quali possono avere origine dinamica o convettiva. Si registra un moto d'aria di tipo dinamico quando una massa d'aria in movimento orizzontale incontra perpendicolarmente un ostacolo, come un sollevamento orografico rappresentato da una catena montuosa o collinare e per superarlo è costretta a salire per passarci sopra. Naturalmente

affinché l'aria risalga un pendio è necessario che la catena montuosa sia abbastanza estesa per non permettere al vento di aggirarla ai fianchi. Le correnti convettive rappresentano il meccanismo più sfruttato dagli uccelli terrestri per guadagnare quota senza spendere energia, in questo caso il sole, in una giornata limpida, scalda la superficie terrestre e quest'ultima scalda l'aria a contatto con esso. Nel processo di riscaldamento, dovuto all'irraggiamento solare, se la temperatura del suolo supera di due gradi rispetto alla temperatura dell'aria circostante, si creano delle bolle di aria calda che tendono a staccarsi dal suolo e salire. In genere si tratta di aria che scaldata diventa più leggera manifestando una densità minore rispetto all'aria fredda (principio di Archimede) e per convenzione sale verso gli strati più freddi sovrastanti. Quest'aria calda salirà tanto più velocemente (anche di 6-10 m/s) quanto l'aria circostante si trova ad una temperatura inferiore, quindi si genera un moto convettivo con una massa d'aria calda che sale verticalmente rispetto all'aria circostante più fredda, creando un vortice ascendente definito "termica". Il riscaldamento del suolo - dovuto all'irraggiamento solare - avviene in maniera non uniforme in relazione al tipo di terreno che, in modo disomogeneo, assorbe i raggi solari. Infatti, un costone roccioso scaldato dal sole è decisamente più vantaggioso rispetto ad un bosco, ovviamente il colore della parete rocciosa e la sua esposizione influiranno sui tempi più o meno rapidi di riscaldamento. Il diametro di queste correnti termiche (sebbene possono non essere circolari) può variare dai pochi metri a qualche chilometro, con una quota che può arrivare fino a 3.000 m o più, ed una velocità ascensionale che varia mediamente tra i 3 e i 25 Km/h. L'apparente 'leggerezza' dell'aria può trarre in inganno sulla dimensione delle forze in gioco, ma se si considera che un metro cubo d'aria pesa mediamente 1.3 Kg si capisce come una termica sia in grado di spostare masse di migliaia di tonnellate, in confronto alle quali il peso di un uccello anche di grosse dimensioni diventa irrilevante. Naturalmente quanto appena detto appare una schematizzazione teorica perché in pratica spesso i due fenomeni di moti convettivi e dinamici dell'aria si mescolano e si sovrappongono, creando condizioni molto favorevoli al volo veleggiato in alcune aree. Quando gli stessi rilievi, battuti dal vento, sono costituiti da costoni rocciosi dove l'aria viene scaldata in misura maggiore dal sole, i due effetti possono sommarsi generando un sollevamento termo-dinamico dell'aria. Ebbene è proprio questa la condizione orografica dell'area a nord di Bosa che permette al grifone di esprimere al meglio le proprie potenzialità di volo.

I veleggiatori per poter sfruttare questi fenomeni possiedono grandi competenze e capacità decisionali, a partire dal momento in cui decidono di iniziare la loro attività di ricerca, i grifoni tipicamente si involano alla ricerca di cibo circa 2 ore dopo il crepuscolo (Spiegel et al., 2013), dopo che il sole con la sua attività ha dato origine ai moti ascendenti di aria calda. Una volta individuata la termica favorevole, il veleggiatore deve regolare la sua velocità e angolo di inclinazione per "centrare la termica" così da poter prendere quota nel minor tempo (1.8 metri/secondo), una volta raggiunta l'altezza desiderata inizia la fase di planata (fase di gliding) verso una determinata direzione (alla ricerca di cibo o per rientrare verso l'areale di nidificazione), durante questa fase l'animale perde quota ma grazie alla sua abilità e conoscenza del territorio sfrutterà una nuova termica per riguadagnare altitudine.

Questo animale vive in monogamia permanente e raggiunge la maturità sessuale dopo il quinto-sesto anno, l'età media raggiunta dai grifoni è di 30 anni mentre in cattività può superare i 40 (Ferguson-Lees and Christie, 2001). La stagione riproduttiva inizia nei mesi di novembre e dicembre ed è segnata dai "voli nuziali" intrapresi dalle coppie in prossimità dei siti di riproduzione: i grifoni volano vicini uno sopra l'altro oppure appaiati eseguendo spirali e scivolate lungo le pareti rocciose, questa prima fase è seguita, nei mesi di dicembre e gennaio, dall'accoppiamento che si verifica nelle vicinanze del

nido preceduto da cerimonie comprendenti inchini, arruffamento delle penne dorsali e movimenti ripetuti del becco da parte del maschio. Non tutti i grifoni sessualmente maturi si riproducono, alcuni possono farlo ogni due anni, oppure saltare occasionalmente una stagione. I nidi vengono costruiti in nicchie inaccessibili, all'imboccatura di piccole caverne o su cenge più o meno protette da tetti di roccia; sono costruzioni molto semplici, poco voluminose, formata da un ammasso di rami, erbe secche. La costruzione è opera di entrambi i partners e il più delle volte si tratta di un restauro del nido utilizzato l'anno precedente. La deposizione dell'uovo inizia a gennaio e prosegue fino a marzo, questo verrà incubato per 52- 54 giorni da entrambi i componenti della coppia. Il pulcino appena nato è ricoperto da una peluria bianca; viene nutrito con una poltiglia di cibo rigurgitata direttamente dal gozzo e accudito da entrambi i genitori che non lo lasciano mai solo nei primi due mesi di vita. A questa età il piumino è stato sostituito dal piumaggio giovanile e il piccolo comincia a spostarsi per qualche tratto lungo i cornicioni di roccia. I primi brevi voli nelle vicinanze del nido vengono compiuti dopo i tre mesi. Molti giovani in questo frangente, se i nidi sono su falesie, cadono in mare a causa di improvvise raffiche di vento o in caso di disturbo da parte di natanti e turisti. A 4-5 mesi il giovane ha ormai imparato a volare per lunghi tratti. Il periodo critico per la sopravvivenza dei piccoli è quello immediatamente successivo all'involto, gli adulti continuano a nutrire i giovani per un certo periodo dopo l'involto mentre questi imparano a perlustrare il territorio in cerca di cibo e a socializzare con gli altri membri della colonia durante i pasti sulla carcassa.

1.5 Habitat del grifone

Gli avvoltoi sono caratterizzati da grandi dimensioni corporee e volo veleggiato statico, questi sono adattamenti che ben si associano alla attività di necrofagi obbligati, dato che permettono di ridurre notevolmente l'energia necessaria per il volo (Ruxton and Houston, 2004). Questa strategia di riduzione del lavoro muscolare potrebbe aver avuto origine all'inizio della storia evolutiva del volo, i reperti fossili indicano infatti che le varietà delle moderne modalità di volo si sono evolute dal Cretaceo inferiore (Chiappe, 2004).

A causa dell'elevato peso e delle grandi dimensioni, il grifone generalmente si riposa su pareti rocciose così, sfruttando le correnti ascensionali termiche e orografiche può decollare senza battere le ali (Bohrer et al., 2012, Newman, 1958, Pennycuick, 1983), queste sono rappresentate da posatoi comuni "roost" o aree di nidificazione, sono soprattutto per gli adulti ad essere molto legati all'habitat di riproduzione, dove generalmente ritornano ogni sera. Al mattino, appena le correnti ascensionali sono disponibili gli avvoltoi abbandonano le pareti rocciose per sfruttare le termiche così da guadagnare altitudine in maniera economica, in questa fase si osservano numerosi animali che si portano verso l'alto. Infatti l'attività di ricerca del cibo, per essere più efficiente avviene in gruppo, i grifoni monitorano il territorio di alimentazione distribuendosi in un'ampia rete nella quale gli animali rimangono costantemente in contatto visivo con i conspecifici. Durante l'attività di ricerca tengono la testa inclinata verso il basso così da poter sfruttare un maggior campo visivo per esaminare i campi e le aziende sulle quali volano. Per questo motivo, quando sono alla ricerca di carcasse, gli avvoltoi non osservano direttamente in avanti e ciò li rende altamente vulnerabili alle collisioni con strutture antropogeniche come linee elettriche, turbine eoliche e anche aerei (Martin et al., 2012). Una volta che un avvoltoio individua una carcassa manda agli altri del gruppo un segnale rappresentato dallo

sganciamento degli arti inferiori. Il segnale recepito genera una catena di discesa verso la carcassa. L'estensione dell'area di alimentazione è abbastanza ampia e nel grifone viene indicata in un territorio con un raggio di 25 Km a partire dal centro del suo sito di nidificazione (van Beest et al., 2008). Naturalmente, considerata l'eccentricità della colonia di grifoni del bosano, confinante con il mare, tale raggio risulta essere asimmetrico e totalmente spostato verso est per circa 40 km (Figura 3)

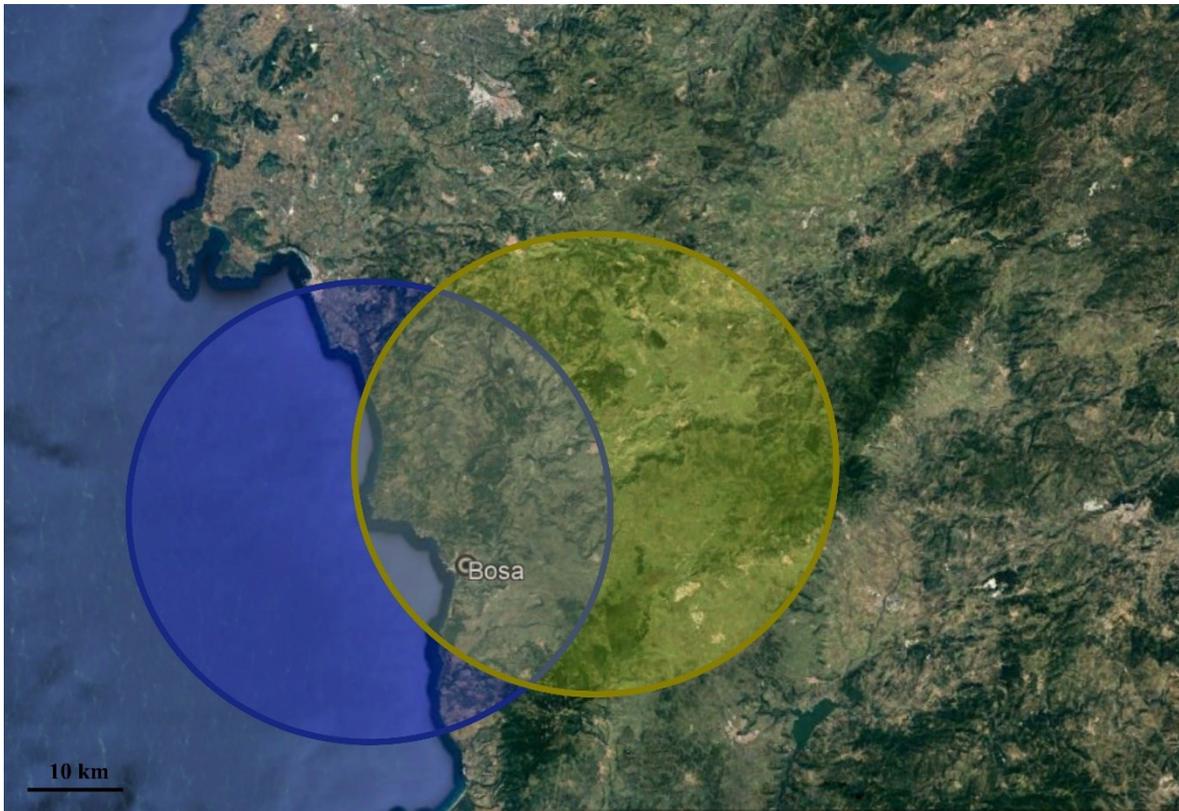


Figura 3. Areali di alimentazione teorici, i cerchi sono stati disegnati posizionando il centro sulla più grande colonia marina (cerchio blu) e terrestre (cerchio giallo), la colonia marina ha una posizione molto più eccentrica, perciò gli animali hanno la necessità di allontanarsi maggiormente dalla colonia per coprire la stessa area di terra descritta dal cerchio giallo.

Il grifone nidifica su pareti rocciose, i nidi possono essere disposti ad una altezza molto variabile rispetto al livello del mare, nelle falesie marine dai 10 m a 400m sul livello del mare (Bosa ed Alghero) e in zone di collina e montagna sino a quote di circa 1250m (Supramonte di Oliena sino agli anni '80 del secolo scorso), si tratta generalmente di aree poco antropizzate. Le pareti scelte da questo animale sono rocciose (rocce vulcaniche, calcaree, graniti, scisti) con terrazze, cenge e cavità (Schenk et al., 2007). La conformazione geomorfologia e l'esposizione dei siti delle colonie favoriscono lo sviluppo di correnti termiche ascensionali che l'animale utilizza per le prolungate permanenze in volo ad elevate quote con il minimo dispendio energetico (Duriez et al., 2014). Tutti gli attuali siti di nidificazione si trovano lungo la fascia costiera tra Bosa e Punta Cristallo (Alghero) e nelle aree contigue, ad una distanza massima dalla costa di circa 7 km. Gli habitat di alimentazione interessano un areale di circa 1.800 km² nella Sardegna nord-occidentale tra Bosa, Macomer e Alghero/Porto Ferro/Nurra e comprendono la fascia costiera, le cuestas tra Bosa e Alghero, l'Altopiano di Campeda e le colline di Montresta, Pozzomaggiore, Ittiri, Thiesi e Putifigari, caratterizzate dalla presenza di

vasti pascoli estensivi, da una frammentazione ancora bassa e da una densità demografica al di sotto della media regionale, sporadicamente singoli esemplari vengono osservati anche in altre aree dell'isola (Schenk et al, 2007).

2. Esperimento 1: studio etologico del grifone nelle colonie riproduttive della zona del Bosano.

2.1 Scopo

I grifoni sono uccelli monogami e longevi, lavorano come animali necrofagi obbligati e mostrano un comportamento gregario. Durante il periodo riproduttivo nidificano in colonie dove le femmine depongono un unico uovo all'anno. Gli adulti generalmente filopatrici, si riproducono sfruttando di anno in anno un proprio spazio per la nidificazione (Sarrazin et al., 1996). Al contrario, i giovani grifoni mostrano spesso un comportamento erratico (Bernis, 1983).

In questo primo esperimento abbiamo voluto studiare alcuni aspetti dell'etologia della specie. I comportamenti che questo animale mette in atto sono numerosi, il grifone occupa in gruppo pareti rocciose che utilizza per nidificare e spazi definiti "posatoi comuni" di solito collocati nelle parti più alte delle pareti. E' un animale gregario ma anche territoriale, le coppie difendono l'area nella quale costruiscono il nido e lo spazio limitrofo, mostrando aggressività verso i conspecifici e solo in un certo periodo della fase riproduttiva permettono agli individui del nucleo familiare di posarsi in quello spazio. Le cure parentali vengo portate avanti dal grifone con dedizione, la strategia riproduttiva K fa sì che si occupino a lungo dell'unico pullo nato, offrendo protezione, nutrimento e calore, atteggiamenti che si protraggono fino alla stagione successiva.

Durante l'attività sul campo ho potuto studiare gli aspetti etologici del singolo individuo, dei rapporti tra individui (comportamento sessuale, allopreening, cure parentali, territorialismo), il comportamento dei piccoli e l'interazione con i genitori fino all'involto. Inoltre ho avuto la possibilità di raccogliere informazioni sui principali parametri della popolazione riproduttiva, attraverso un'azione di monitoraggio ben pianificata, nel rispetto temporale e spaziale della specie, queste riguardano il periodo riproduttivo dal 2016 al 2018. Lo studio etologico e di monitoraggio numerico ci ha permesso di ricavare parametri e informazioni utili per valutare meglio la presenza della specie, studiare possibili correlazioni tra successo riproduttivo delle colonie e gli effetti di potenziali minacce. Infatti frequentare il territorio mi ha permesso di osservare direttamente alcune delle attività antropiche esercitate in prossimità delle colonie. La valutazione del successo riproduttivo è un indicatore importante per il monitoraggio dello stato di salute delle specie e rispecchia quella che è la qualità dell'ambiente, dal momento che il disturbo antropico nelle aree di nidificazione rappresenta da sempre una minaccia per le specie.

Essendo degli necrofagi obbligati, i grifoni percorrono lunghe distanze alla ricerca di carcasse di specie domestiche e selvatiche, offrendo così un importante servizio di pulizia dell'ecosistema limitando la proliferazione e diffusione di microrganismi e competendo con altri mammiferi necrofagi (volpe, cani domestici, mustelidi, cinghiale) (Donazar, 1993, Prakash et al., 2003). In termini economici Markandya et al. (2018) ha stimato che solo nel India settentrionale, la presenza di una popolazione sana di vulturidi garantirebbe un risparmio sulla sicurezza per la salute pubblica di 2,4 trilioni di US\$. I vulturidi hanno subito nell'ultimo secolo una fase di declino, le cause sono comuni alle differenti regioni europee e sono rappresentate dall'utilizzo di veleni, scarsità di risorse

alimentari, antropizzazione dell'habitat e disturbo antropico delle aree di nidificazione (escursionismo, caccia fotografica, parapendio, caccia).

2.2 Materiali e metodi

Area di studio e paesaggio

La popolazione di grifone studiata si trova solo lungo l'habitat nella Sardegna nord-occidentale seguendo un tratto di costiero tra le città di Bosa e Alghero. Questa zona fa parte della rete natura 2000. Sebbene fronte mare è caratterizzata da un paesaggio poco antropizzato, collinare con un profilo discretamente acclive, le spiagge sono scarse e prevalgono le falesie. Nel complesso questo tratto di costa è relativamente incontaminato dal turismo e offre un habitat eccellente per una vasta gamma di specie. La zona è principalmente ricoperta di garighe, la *Pistacia lentiscus* è l'essenza dominante e, a seconda dell'altitudine e dell'esposizione, si trova insieme a *Phillyrea latifolia*, *Rhamnus alaternus*, *Myrtus communis*, *Cistus* spp., *Crocus minimum*, *Pancratium illyricum*, *Crithmum maritimum*, *Crithmum maritimum*, *Helicrysum italicum*, *Calicotome villosa*, *Juniperus phoenicea*, *Euforbia dendroides*, *Limonium bosanum*, *Chamaerops humilis*; *Olea europaea oleaster*, *Quercus suber*. Quest'area offre un habitat ideale a diverse specie di rapaci, oltre al grifone riscontriamo: *Accipiter gentilis arrigonii*, *Accipiter nisus*, *Buteo buteo*, *Falco tinnunculus*, *Falco peregrinus brookei*, *Milvus milvus*, *Aquila chrysaetos*. L'habitat ideale del grifone non può fare a meno della presenza di aziende zootecniche, soprattutto di carattere estensivo, dato che rappresentano la fonte di alimentazione più importante dell'animale. In Sardegna il numero delle aziende zootecniche di ovini e caprini rappresenta il 13,7% di quello totale Italiano, seguito per importanza dal comparto suinicolo (12,5%) e dal settore bovino (6,7%), l'isola con 3.478.707 piccoli ruminanti possiede il 42,3% del totale dei capi Italiani (ISTAT 2017).

Organizzazione delle Osservazioni

Grazie alla concessione dell'Assessorato alla difesa dell'ambiente abbiamo potuto effettuare delle riprese video fotografiche durante le attività di studio comportamentale della specie (Direzione generale Difesa Ambiente, Servizio tutela della natura e politiche forestali, Prot. N. 12383).

I nidi e i posatoi di grifone osservati si trovavano su pareti verticali ad una altitudine che varia dai 10 a 400 m s.l.m.. La colonia riproduttiva è stata considerata a sé stante quando costituita da minimo due coppie territoriali che si trovano ad almeno 1km di distanza dalla colonia più vicina (Del Moral, 2001). La coppia di grifoni è stata definita nidificante quando osservata nel trasportare materiale per la costruzione del nido (Newton, 1979). L'attività riproduttiva è stata registrata anche in altre località, sempre del Bosano, ma non all'interno delle colonie (coppie extra-colonie) (Figura 4).



Figura 4. Distribuzione colonie prese in esame nel territorio Bosano, per lo studio sono state prese in considerazione le sei colonie indicate con le lettere maiuscolo, in due colonie (E ed F) gli animali nidificano su falesie (10 - 50 m s.l.m.), nelle altre le pareti rocciose non sono affacciate direttamente sul mare (232 - 380 m s.l.m.). * rappresentano le coppie extra-colonie.

Le osservazioni sono state fatte durante il giorno, con un binocolo 10X50 (Nikon Action EX) ed un telescopio 15-45X60 (Nikon spotting Scope 7357) per un massimo di 10 ore e ad una distanza che non arrecasse disturbo per l'animale. La strumentazione tecnica utilizzata per le attività di foto e video documentazione è rappresentata dalla macchina fotografica reflex Canon EOS 650D con teleobiettivo Sigma 150-500mm, e videocamera Panasonic HC-W570EG con tele zoom 59x (equivalente a 1740 mm).

E' stata dedicata una visita ogni dieci giorni per ogni colonia presa in esame, le osservazioni per la valutazione dello stato riproduttivo della colonia sono state effettuate in specifici periodi:

- 5 novembre - 5 dicembre per verificare la territorialità pre-riproduttiva;
- 15 dicembre - 10 gennaio per valutare i voli nuziali e le copulazioni;
- 20 febbraio, valutazione delle coppie e nidi;
- 10 marzo - 5 aprile per confermare la presenza o l'assenza delle coppie precedentemente rilevate, l'esistenza di nuovi nidi e i pulcini appena schiusi;
- 20 aprile - 10 giugno per monitorare lo sviluppo di pulcini precedentemente rilevati;
- Luglio - agosto, monitoraggio degli involi;
- Settembre - Ottobre per valutare la presenza degli juvenilis assieme ai genitori nella colonia;

Le colonie situate su falesie marine sono state monitorate in barca dal mare ricevendo un minore numero di visite in relazione al tempo.

Le attività osservate sono state annotate considerando gli animali per tre classi di età (Forsman, 1999):

- Juvenilis di 1 anno: il piumaggio è di colore marrone scuro; le piume del corpo sono strette e appuntite; il becco completamente scuro; le penne del colletto sono scure e a punta; le remiganti hanno una tonalità scura;
- Immaturi, 2-4 anni: il piumaggio ha un aspetto misto per via della muta incompleta, le remiganti primarie e secondarie sono solo in parte state sostituite, così come alcune copritrici; il nuovo piumaggio ha una tonalità più chiara e con punta arrotondata; il becco assume gradualmente un colore bianco.
- Adulti, 5 anni in su: il piumaggio è marrone pallido chiaro; le copritrici sono chiare e con punta arrotondata; le piume del collare ed il becco sono bianchi.

I principali tipi di comportamento analizzati sono stati: atteggiamento in volo, selezione del sito di nidificazione e difesa di questo, corteggiamento (espresso da allopreening) e copulazione, costruzione dei nidi (ovvero il trasferimento del materiale di nidificazione e costruzione del nido), cova e cure parenterali. Il comportamento di costruzione del nido includeva anche osservazioni del materiale utilizzato e la distanza, rispetto ai nidi, dalla quale veniva acquisito. Le copulazioni sono state definite di successo quando si osservava un contatto cloacale (González-Solís and Becker, 2002).

L'estensione del territorio attorno al nido difeso dagli adulti e le distanze esistenti tra i nidi sono stati stimati estrapolando le dimensioni del corpo di un grifone (cioè 110 cm, Cramp and Simmons (1980)).

2.3 Risultati e discussione

Voli nuziali

I voli nuziali sono stati osservati principalmente durante il mese di dicembre, anche se con minore frequenza questo tipo di volo in sincronia tra gli animali adulti è stato registrato durante tutto l'anno, una media di 14,4 voli nuziali sono stati registrati nel mese di dicembre durante il triennio di osservazione. Sono stati registrati due differenti tipi di voli nuziali: nel volo "in tandem", i partner della coppia volano uno sopra l'altro (osservato per il 43%), mentre nel volo "mano nella mano", i partner volano in parallelo (osservato per il 57%). La sincronia nello spostarsi in coppia secondo uno degli schemi è stato osservato per il 72,2% delle volte per un tempo inferiore ai 7 secondi, per 23,7% tra i 7 e 15 secondi, il 3,1% oltre i 15 secondi. La maggior parte dei voli nuziali sono stati osservati al rientro del gruppo nell'habitat di nidificazione (66,3%).

Costruzione del nido

Il periodo di costruzione del nido si accompagna alla riduzione della frequenza delle osservazioni dei voli nuziali, a gennaio la quantità di nidi costruita oscillava tra 64 ed 88% (a seconda dell'anno). La costruzione dei nidi è avvenuta con maggiore frequenza nella prima metà di gennaio. Dei 124 nidi osservati nel triennio 2016-2018 solo 3 sono stati costruiti alla fine di marzo (2 nel 2016 e 1 nel 2018, Figura 5). Dalla costruzione del nido alla deposizione passano in media 20 ± 5 giorni (range 10-30), il

periodo minimo è stato osservato in una coppia che aveva iniziato tardivamente la costruzione del nido.

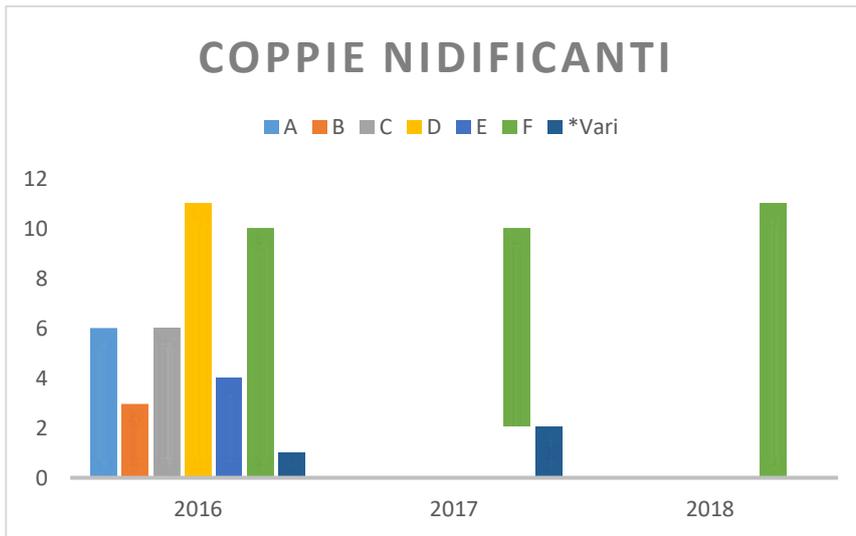


Figura 5. Il grafico mostra, per le diverse colonie (A-F), le dimensioni della popolazione di animali adulti nidificanti nei tre anni di attività. Le coppie nidificanti extra-colonia indicati con il simbolo * sono assenti nel 2018.

Il materiale viene raccolto dal grifone ad una distanza di 80 ± 35 metri, questo è rappresentato da vegetali secchi e freschi. Gli animali adulti a differenza di altri rapaci, raccolgono e trasportano il materiale vegetale con il becco, questo materiale è rappresentato per lo più da gruppetti di lunghi elementi secchi o lunghi rametti di arbusti con un diametro non superiore a 1,5 cm, la scelta del materiale come quella del nido ha una importanza per un buon risultato riproduttivo. Abbiamo osservato la raccolta di materiale vegetale secco proveniente da nidi costruiti nell'anno precedente e da nidi in fase di costruzione ma lasciati incustoditi (Figura 6), in genere il materiale fresco viene depositato al centro del nido e quello secco nella periferia del nido.



Figura 6. Questa sequenza segue un ordine cronologico e si conclude in meno di cinque minuti, l'adulto ruba del materiale da un nido incustodito, quindi una volta portato al proprio nido lo sistema con cura usando il becco per circa 4 minuti, per finire si accovaccia sul nido.

La raccolta del materiale può essere secco o fresco, di solito viene strappato tramite strattoni dal terreno (Figura 7), i rami secchi e verticali di asfodelo vengono afferrati con il becco per metà e spezzati ruotando la testa di 90° .



Figura 7. Raccolta del materiale, A: il grifone ricicla del materiale da un nido costruito da un'altra coppia nell'anno precedente; B: l'adulto atterrato su un terreno posto sopra la colonia, valuta per un istante il materiale da raccogliere, questo può essere secco e sottile quindi facile da strappare, oppure fresco e quindi viene recuperato dall'animale con maggiore sforzo. C: il trasporto del materiale al nido avviene tramite il becco.

Alla costruzione del nido partecipano entrambi i partner (87%), in particolare uno si occupa del trasporto e l'altro della sistemazione del materiale per formare il nido. Quando solo uno degli adulti è presente nella colonia, questo si dedica al trasporto e alla sistemazione del materiale oppure solo all'assestamento del materiale già presente. Il materiale viene sistemato di continuo durante la fase di costruzione, sia con il becco che con il corpo, in questo caso l'adulto si accovaccia sul nido cercando di sagomarlo meglio. I nidi vengono assestati dagli adulti durante tutto il periodo della cova tramite aggiunta di nuovo materiale. Tale comportamento è funzionale al fatto che il lungo tempo di permanenza nel nido comporta la frammentazione e perdita del materiale che lo costituisce. Una differente esposizione ai punti cardinali è stata osservata confrontando i nidi terrestri con quelli marini, mentre nei primi prevale una esposizione a sud-ovest e sud, nelle colonie marine la principale esposizione è quella a nord-ovest (Figura 8).

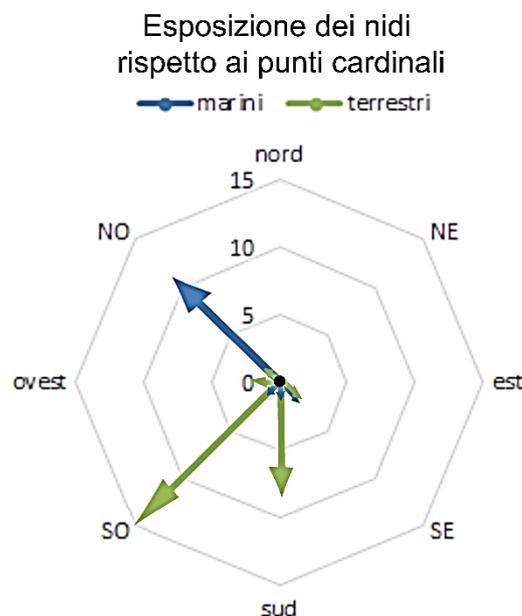


Figura 8. Analizzando l'esposizione dei nidi nelle diverse colonie è emersa una interessante differenza fra le colonie marine e quelle terrestri.

La disposizione a nord-ovest dei nidi marini espone i grifoni ai venti regnanti e dominanti che caratterizzano la costa occidentale: il Maestrale e Ponente, questa esposizione potrebbe offrire il vantaggio di sfruttare le correnti orografiche per prendere quota. Mentre un orientamento dei nidi a sud sud-ovest, che caratterizza le colonie terrestri, favorisce il riscaldamento della parete anticipando la formazione di correnti ascensionali.

Territorialità, aggressività intraspecifica

Sebbene il grifone sia identificato come gregario e nidifica in comunità più o meno fitte, resta un animale territoriale nel difendere il proprio sito di nidificazione. Questo è necessario per prevenire attacchi alla propria prole o al materiale di nidificazione. L'atteggiamento di territorialità è stato registrato solo fra gli animali adulti con lo scopo di difendere un territorio, rappresentato da una incavo, cengia, terrazza sulla quale costruiscono il nido. Ciò che si osserva è un comportamento costantemente vigile delle coppie e aggressività nei confronti dei conspecifici, con lo scopo di difendere i confini. Il comportamento aggressivo è caratterizzato dall'attacco con il becco verso l'invasore, accompagnato da vocalizzazioni e arruffamento del piumaggio del dorso (Figura 9).



Figura 9. Territorialità, sequenza di immagini in ordine cronologico da sinistra a destra. Una coppia di adulti, difende il proprio territorio scacciando un altro adulto, questo viene rincorso e beccato di continuo, nella immagine di destra si osservano gli adulti con le piume del dorso ancora alte dopo aver scacciato l'”intruso”.

Le dimensioni dell'area verso la quale gli individui adulti mostrano territorialità varia in relazione alla disposizione spaziale del nido e dal periodo considerato, la presenza di conspecifici in prossimità del territorio protetto è meglio tollerata quando questi sono posati ad una altezza diversa e non facilmente raggiungibile camminando. La territorialità è stata osservata più frequentemente durante la stagione riproduttiva, in particolare nel mese di gennaio si è registrata la maggiore prevalenza. Durante il periodo della deposizione, quando i confini territoriali aumentano, la tollerabilità intraspecifica diminuisce, questo atteggiamento è stato osservato in tre coppie che nidificano su cenge e terrazzi molto ampi (Figura 10).



Figura 10. Due delle aree dove è stato registrato un cambiamento del grado di territorialità, la maggiore frequenza di atteggiamento di territorialità è stato registrato durante tutto il periodo riproduttivo (81,3%), una maggiore tollerabilità è stata osservata verso i sub-adulti nel periodo pre costruzione del nido.

Le coppie territoriali hanno subito una variazione della densità numerica che ha interessato 4 colonie su sei (Figura 11), per le colonie A e B si è assistito ad un aumento delle coppie presenti durante il periodo di pre-costruzione del nido. In particolare la colonia B ha mostrato un incremento del 133% nei tre anni di osservazione. Analizzando i dati complessivi dei tre anni, si è registrato un incremento di +6 coppie territoriali su tutto il territorio monitorato (Figura 12).

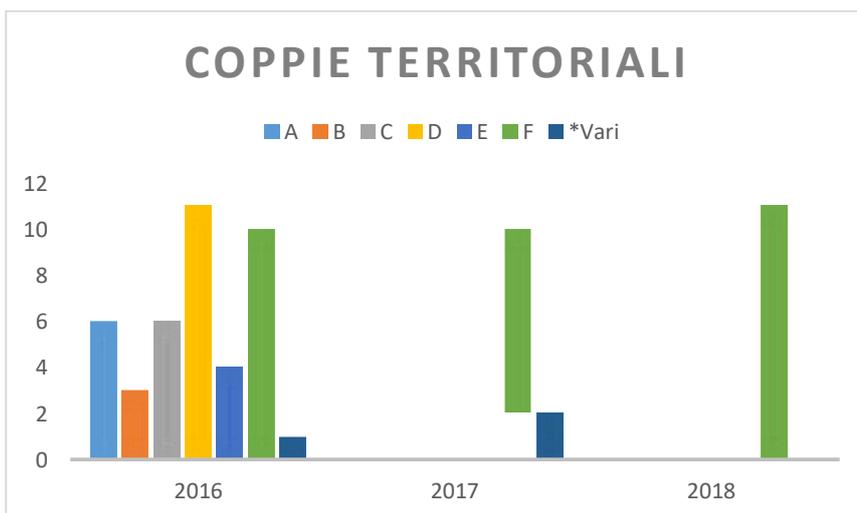


Figura 11. Il grafico mostra, per le diverse colonie (A-F), le dimensioni delle coppie territoriali nei tre anni di attività. Le coppie nidificanti extra-colonia indicati con il simbolo * sono assenti nel 2018.

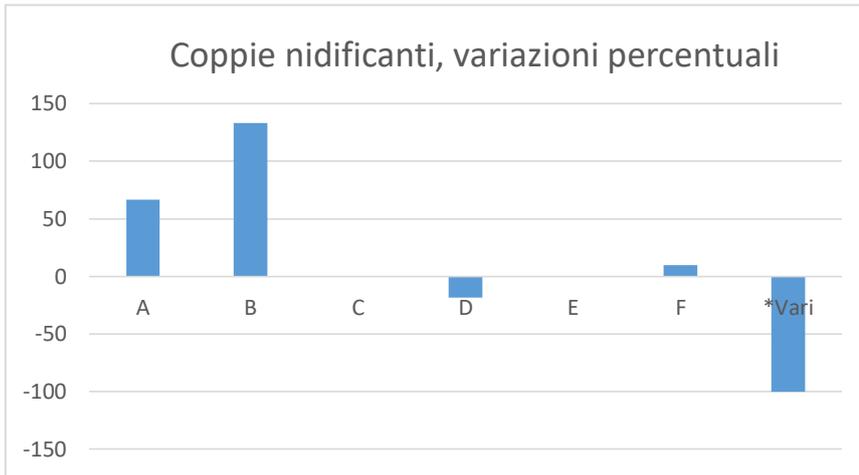


Figura 12. Il grafico mostra le variazioni percentuali della dimensione numerica delle coppie nidificanti nelle sei colonie dal 2016 al 2018. Il maggiore incremento riguarda la colonia B, mentre in negativo si osserva la colonia D. Le coppie extra-colonia sono assenti del 2018, facendo così registrare una -100%.

Attività riproduttiva

Le attività di accoppiamento sono state registrate quasi tutto l'anno (ottobre – agosto) con frequenze molto diverse. L'accoppiamento ai fini riproduttivi è iniziato molto presto in forma sporadica (ottobre), ed ha raggiunto il massimo a dicembre e nei primi giorni di gennaio durante il periodo del corteggiamento e la maggiore attività di costruzione dei nidi. Gli accoppiamenti sono cessati durante i periodi di incubazione dell'uovo e allevamento del piccolo, le coppie che hanno deposto tardivamente rispetto alla media (5,2% delle deposizioni) (marzo-aprile), hanno fatto registrare anche accoppiamenti tardivi.

Nella nostra attività abbiamo registrato 68 attività riproduttive, di queste è stato possibile osservare direttamente il comportamento riproduttivo nel 72% dei casi, mentre per il restante 28% solo le vocalizzazioni tipiche della copula, questo ultimo dato riguarda soprattutto le due colonie A e D, qui l'habitat è rappresentato da pareti affacciate su un canale o gola e gli animali sfruttando le pareti dei due versanti rendono difficoltosa l'osservazione. Tra le attività riproduttive osservate direttamente, 32 atti copulatori sono avvenuti sul nido e 15 al di fuori di esso (Figura 13, C), più frequentemente i tempi erano inferiori ai 25 secondi (77,55%), il tempo massimo registrato è stato di 3,5 minuti.



Figura 13. A: accoppiamento di due adulti, nella giornata di osservazione erano intenti a costruire il nido. B: l'inseminazione avviene dopo qualche secondo di assestamento del maschio sul dorso della

femmina con l'intento di trovare il giusto equilibrio per raggiungere il contatto tra le cloache. C: due adulti si accoppiano su un posatoio comune, il precario equilibrio della femmina, posata sul bordo della parete rocciosa ha reso difficoltoso l'accoppiamento che si è concluso dopo pochi secondi senza successo.

Il grifone non possiede un organo penieno, come nella gran parte delle specie appartenenti alla classe Aves. La fecondazione avviene attraverso il contatto delle due cloache "cloacal kiss". Al momento dell'accoppiamento, la femmina si blocca assumendo un atteggiamento quasi di "seduta", inarca il dorso e sposta lateralmente la coda mettendo in evidenza la cloaca; allo stesso tempo il maschio, cercando il giusto equilibrio sulla groppa della femmina, dà piccoli colpi con il becco alla femmina, inarca in senso opposto il dorso per mettere a contatto le due cloache (Figura 13, B). La maggiore durata dell'accoppiamento è stata determinata da un mancato equilibrio del maschio sulla groppa della femmina che ha portato al fallimento della copula. In qualche caso, l'accoppiamento è stato preceduto da un volo nuziale ed i preamboli della copula si sono conclusi nel nido dove si è assistito ad una sorta di danza da parte di entrambi i partner che si cercavano muovendo in modo sincronizzato la testa ed il collo.

Due accoppiamenti extra-coppia sono stati osservati, entrambi nel periodo di costruzione del nido, in una osservazione, il grifone adulto dopo aver avvistato una femmina da sola nel nido vicino (in quanto il partner si era spostato per la raccolta di materiale), si è involato sul posto ed ha provveduto all'accoppiamento senza alcuna esitazione da parte di entrambi. Nell'altro un individuo maschio ha interrotto il trasporto di materiale sul nido per accoppiarsi con una femmina localizzata su un posatoio comune.

Deposizione, incubazione e schiusa

Il 84% delle deposizioni è stata registrata tra l'ultima decade di gennaio e prima di febbraio, il numero medio delle deposizioni nel triennio è stato di 32. Il successo delle schiuse (n° schiuse / n° uova deposte in %) è stato, ad eccezione della colonia B nel 2017 sempre sopra il 65%, con la colonia A che ha mostrato in media per i tre anni i risultati più alti (Figura 14). L'incubazione ha avuto una durata di 53 ± 2 gg di media con le schiuse concentrate in massima parte fra il 13 ed il 20 di marzo.

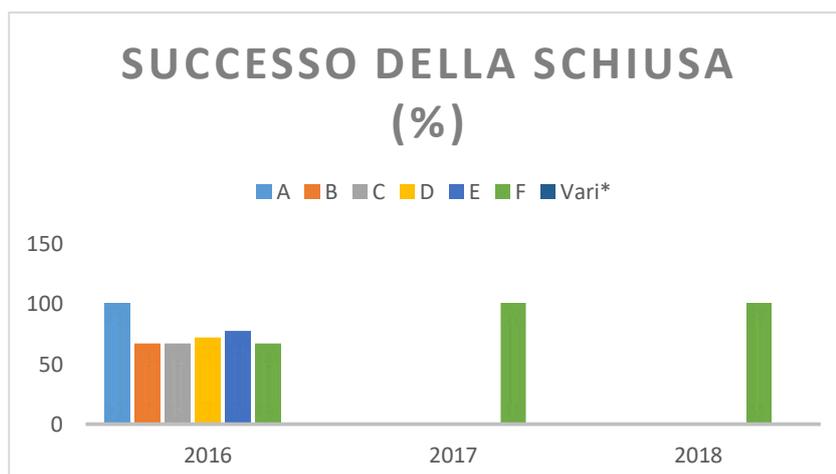


Figura 14. Successo della schiusa (%), per le diverse colonie (A-F), nei tre anni di attività. Le coppie extra-colonia hanno mostrato un successo della schiusa pari a 0.

L'uovo deposto è di colore bianco e pesa 230-250 gr, circa il 2.5% del peso della femmina. A fine maggio 2017 una covata in prossimità della colonia è stata abbandonata, dopo circa dieci giorni di assenza dell'adulto abbiamo proceduto al recupero dell'uovo, questo presentava un peso di 229 gr, una lunghezza di 9,6 cm ed un diametro di 7,1 cm (foto al lato), inoltre il guscio aveva un difetto di circa 1 mm di grandezza in prossimità del polo acuto, la speratura ha messo in evidenza un corpo scuro, segno evidente della presenza di un embrione, l'embrione all'interno era in gran parte colliquato immerso in un liquido maleodorante.



L'onere dell'incubazione viene suddiviso fra i genitori, l'alternanza alla cova avviene in tempi molto stretti per evitare perdite di calore dell'uovo, soprattutto nella stagione invernale, in quanto questo deve mantenersi ad una temperatura ottimale. L'uovo viene giornalmente rigirato più volte per evitare che le due membrane testacee si possano incollare portando così alla perdita dell'embrione (Figura 15), il genitore in cova ogni 2-6 ore si alza, muove col becco l'uovo facendogli cambiare posizione, quindi in breve tempo (10-15 secondi in alcuni casi, 2 minuti in media in altri casi) si riaccovaccia cambiando esso stesso posizione di 180° (atteggiamento osservato nell'81% dei casi). In alcuni casi abbiamo verificato che nel corso di questa fase, soprattutto nei nidi scoperti, l'adulto in piedi apre le ali quasi a nascondere la presenza dell'uovo. Lo spostamento continuo dell'uovo è funzionale al fatto che questo, attraverso i pori, ha la possibilità di eliminare il surplus di acqua che si forma in seguito al metabolismo e che deve essere allontanata, altrimenti il pulcino annegherebbe nella propria acqua metabolica.



Figura 15. L'adulto, dopo molte ore passate immobile ad incubare l'uovo si alza e aiutandosi con il becco gira l'uovo, in questo caso tutta la sequenza dura quasi un minuto.

Il successo della coppia è rappresentato dall'involo del piccolo, il grifone è una specie a strategia k-selezionata ed investe molte risorse nelle cure parenterali. La coppia depone un unico uovo e durante

la fase di incubazione gli adulti si danno il cambio sul nido, solo nel 8% delle osservazioni lo scambio è avvenuto in volo, cioè l'adulto in cova si è involato dal nido prima che il partner atterrasse in prossimità del nido. Ciò vuole significare il fatto che esiste un riconoscimento visivo del partner anche ad una certa distanza. Per la maggior parte delle volte l'adulto è ancora accovacciato quando il partner atterra in prossimità del nido per il cambio (51%) oppure si è già alzato in piedi (41%).

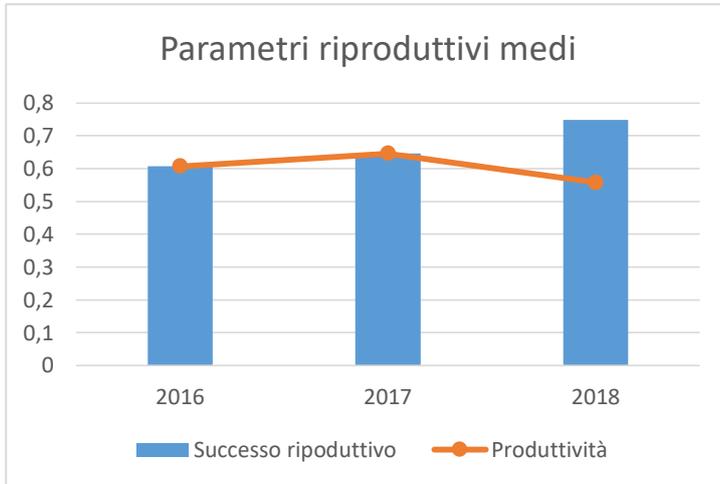


Figura 16. Il grafico è stato ottenuto sulla MEDIA del successo riproduttivo e produttività delle singole colonie, senza perciò considerare le coppie extra-colonia registrate nel triennio.

Infatti, senza prendere in considerazione le coppie territoriali extra-colonie, e facendo una media del successo riproduttivo e produttività delle colonie nei tre anni possiamo osservare come il primo abbia mostrato una tendenza alla crescita, mentre la produttività sebbene aumentata dal 2016 al 2017 sia poi diminuita nell'ultimo anno (-0,05) (Figura 16), questo dovuto ad un incremento delle coppie territoriali registrato per le colonie terrestri A e B, non seguito da un proporzionale incremento degli involi (Figura 17). È stato segnalato che le colonie riproduttive di grifone se indisturbate raggiungono in media il 75% di successo riproduttivo e la produttività di circa 0,6 pulcini per coppia all'anno (Mundy et al., 1992, Donázar, 1993).

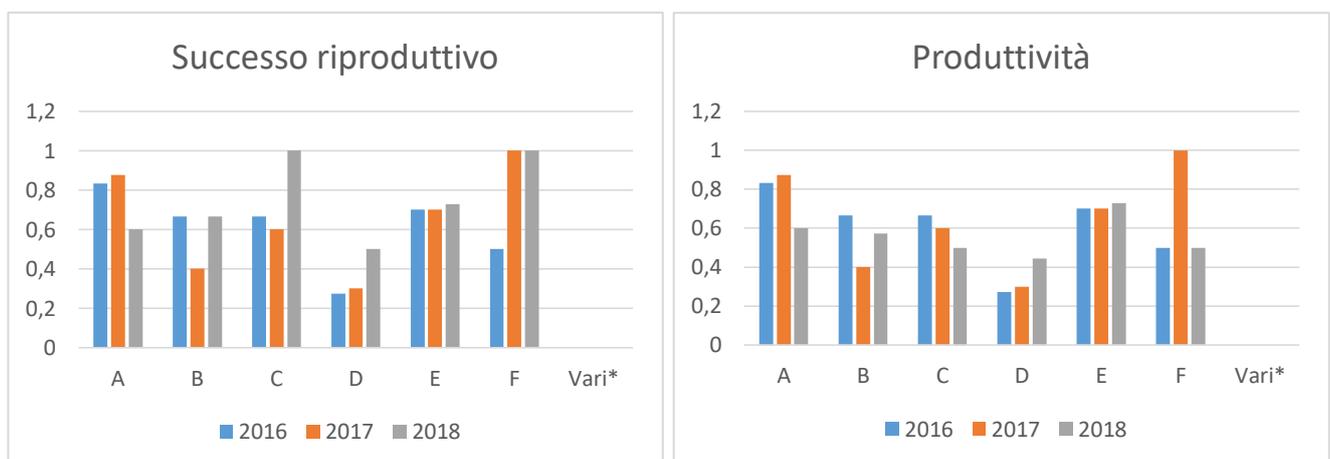


Figura 17. Grafico a colonne mostrante il successo riproduttivo e la produttività delle colonie del Bosano, il triennio 2016-2018

Le perdite registrate nel triennio hanno riguardata principalmente le covate. Queste hanno fatto registrare un maggior insuccesso (n=19) rispetto alle perdite post-schiusa (n=3), tutte le colonie hanno subito nell'arco dei tre anni almeno una perdita di covata, mentre la morte dei pulli è stata registrata solo per la colonia D (Figura 18). Sebbene questa colonia sia anche la più numerosa tra le colonie terrestri, mettendo a confronto le colonie non è stata riscontrata una relazione tra numerosità delle coppie territoriali e perdite (Pearson correlation, P-Value = 0,973; r = 0).

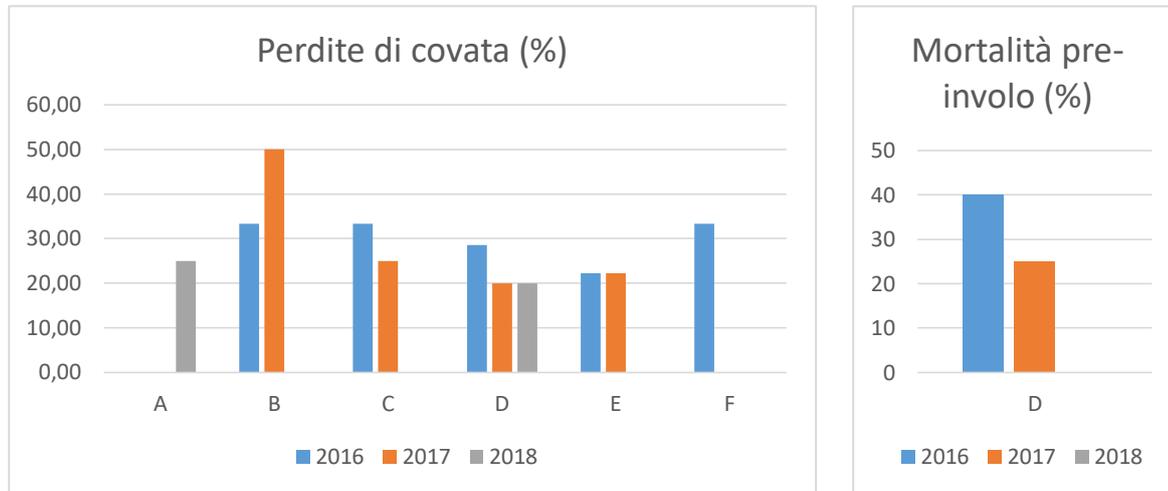


Figura 18. Perdita di covata e mortalità dei pulli per il triennio, espressi in valore %, calcolati in base alle covate i primi e alle schiuse i secondi.

L'insuccesso riproduttivo come mostrano i dati è legato prevalentemente alla mortalità preschiusa, con successivo abbandono del nido da parte degli adulti, mentre solo in rari casi le coppie hanno eseguito una cova tardiva di rimpiazzo (1 in tre anni). Sebbene alcune perdite siano state tristemente correlate al disturbo antropico sulle coppie in cova (Tabella 3), per altre, le sole osservazioni non sono state in grado di discriminare la causa del problema.

Colonia	A	B	C	D	E	F	vari
Attività antropica (<0,3km nidi)	Caccia fotografica	Caccia; Taglio del legno	Ippovia; Taglio del legno	Caccia; Raccolta Funghi;	Turismo nautico	Turismo nautico	Caccia fotografica; arrampicata; trekking; Capre;

Tabella 3. Attività antropiche di disturbo registrate in prossimità dei nidi (meno di 300metri dalla parete), alcune di queste sono stete effettuate durante la stagione riproduttiva causando perdite di covate.

In un caso, la mancata schiusa è stata correlata ad un effettivo problema dell'uovo, che non essendosi schiuso per tempo, e stato abbandonato dai genitori a maggio. Per identificare e comprendere i specifici problemi legati alla mancata schiusa, sarebbe necessario eseguire ulteriori studi, così da poter discriminare l'infertilità dalla morte embrionale. Nelle specie in via d'estinzione è noto che l'inbreeding causa l'esposizione ai geni recessivi letali nello stato di omozigote (Keller and Waller,

2002), questi geni sono espressi precocemente nello sviluppo, l'elevata incidenza della morte precoce dell'embrione rappresenta così un risultato più prevedibile della depressione da consanguineità (Arnold et al., 2003). Il destino dell'uovo e/o pullo dopo l'abbandono è segnato dalla presenza di predatori, come ad esempio il corvo imperiale il cui habitat si sovrappone all'habitat riproduttivo dei grifoni.

Il grifone è una specie minacciata dalla degradazione dell'habitat ed antropizzazione del territorio. La presenza di turbine eoliche ed il disturbo antropico in prossimità delle aree di nidificazione rappresentano i più recenti problemi, in certi casi il disturbo è prolungato nel tempo come accaduto per la costruzione di una ippovia, in altri anche se breve (escursionisti, arrampicatori, fotografi). Abbiamo potuto notare come le capre, allevate in maniera estensiva e presenti in alcuni di areali di nidificazione, sfruttino le pareti rocciose dove i grifoni nidificano (Figura 19). La capacità estrema di arrampicata della capra ci ha permesso di poter osservare gli animali, in due areali differenti, in prossimità dei nidi. Questi mammiferi perciò potrebbero essere un elemento di disturbo per l'avvoltoio durante la fase di cova.



Figura 19. Un gruppo di capre (cerchi gialli) distribuito su una parete utilizzata dal grifone per la nidificazione.

Cura e alimentazione del piccolo

Alla schiusa, il piccolo è ricoperto di un blando piumino e pesa circa 170gr. Nei primi giorni è difficile da intravedere in quanto nascosto dal genitore che si mantiene sui tarsi molto flessi. In questa fase le attenzioni della coppia sono sempre rivolte al pullo (pulizia con il becco per l'asportazione di ectoparassiti, fornitura di cibo e di bevanda, protezione per mezzo dell'estensione delle ali dall'azione diretta dei raggi solari o dalle intemperie). I movimenti del piccolo sono molto goffi in quanto manca di equilibrio, già dalla seconda settimana di vita è in grado di sollevarsi sui tarsi e a partire dalla terza settimana si riveste di un piumino più lungo e compatto, iniziando anche a sviluppare il piumaggio vero e proprio (Figura 20).

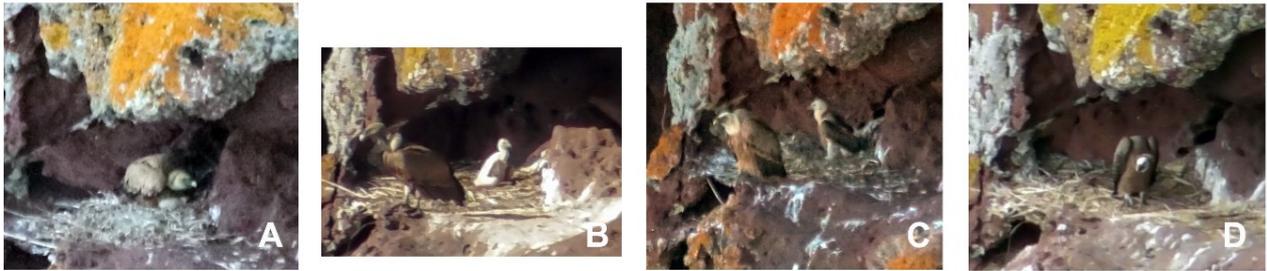


Figura 20. Accrescimento del piccolo; A: 15 giorni dalla schiusa, il piccolo dotato di piumino si trova sotto il petto dell'adulto protetto dal freddo e dai possibili predatori; B: un mese, il piccolo è in grado di assumere la posizione eretta, per fare ciò si aiuta con le ali che usa come leva per raddrizzare il busto; C: due mesi, le ali mostrano il colore delle copritrici, le remiganti sono in fase di crescita; D: tre mesi, il piccolo ha quasi raggiunto le dimensioni dell'adulto.

L'alimentazione del pullo da parte dei genitori ha mostrato due fasi giornaliere: una a metà giornata (11.30-13.00) e l'altra alla sera (16.00-17.00). Il quadro giornaliero ha inizio di primo mattino con i siti di nidificazione presidiati da entrambi i genitori: uno sul nido e l'altro nelle immediate vicinanze. Quando le condizioni di vento e/o di termica lo permettono il genitore posizionato in prossimità del nido intraprende il volo, tra le 9.30 e le 11.30 e spesso viene seguito da qualche altro genitore della colonia. Questi individui rientrano dopo 2-3 ore in relazione all'agibilità del volo, all'individuazione della carcassa e alla relativa distanza (primo turno). Naturalmente, al ritorno, l'eventuale stato di replezione del gozzo e il fatto che la testa sia più scura del resto del collo lasciano subito intuire che il genitore è provvisto di cibo da offrire al piccolo. Abbiamo osservato che in genere il genitore rimasto sul nido ispeziona continuamente il cielo per verificare l'arrivo del partner. È probabile che il riconoscimento tra i due partner avvenga per caratteristiche esteriori proprie di ciascun individuo. Ciò è ancor più probabile in virtù del fatto che l'atterraggio di un grifone estraneo in prossimità del nido scatena immediatamente l'attacco da parte del genitore posto a guardia di questo. All'arrivo, il cambio è quasi automatico e non supera i 60 secondi. Il genitore liberato dall'accudire il pullo si invola a sua volta e farà ritorno al nido per il secondo turno di alimentazione (Figura 21).

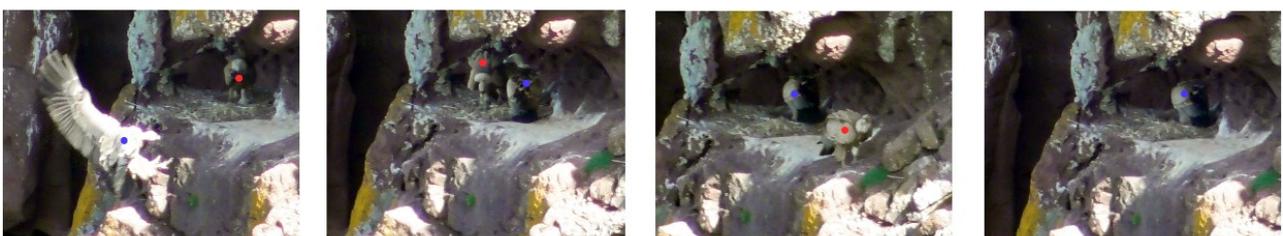


Figura 21. Sequenza di immagini che descrivono il cambio del partner nell'accudire il piccolo, quando l'adulto raggiunge il nido o quando ancora in volo ma di ritorno sulla colonia, l'adulto in cova si alza e si allontana dal nido per lasciare spazio al partner. Quindi può rimanere nella colonia, questo

accade la sera tardi, oppure intraprendere il volo alla ricerca di cibo. La sequenza continua nella figura successiva.

Naturalmente, il cambio dei genitori attiva il pullo che inizia a muoversi e pigolare (apertura e chiusura del becco con 1 pigolio ogni 3-5 secondi). Il genitore inizia ad alimentare il pullo, l'azione del rigurgito appare abbastanza evidente, l'adulto esegue una sorta di "esse" col collo per 2-3 volte, quindi estende la testa e fa fuoriuscire il cibo presente nel gozzo. L'adulto è in grado di controllare la quantità di cibo rigurgitato anche in funzione del fatto che nel primo periodo, la capienza dello stomaco del pullo è abbastanza limitata rispetto alle sue dimensioni. In questa fase si assiste quindi alla reiezione di piccoli quantitativi di alimento. In un'occasione, abbiamo potuto osservare che il genitore, in seguito alla richiesta del pullo, ha tentato di rigurgitare per ben sette volte, ma senza risultato, quindi ha desistito. Ciò lascia intendere che la reiezione del cibo è possibile solo se questo è presente nel gozzo. Questa azione viene ripetuta per 4-8 volte in relazione all'età del pullo con frequenza più alta nella fase iniziale e più bassa quando la capienza dello stomaco del pullo è maggiore. Il genitore, terminata la fase di alimentazione, resta sul nido col pullo fino al cambio successivo. Nei primi giorni il pullo viene alimentato dai genitori che rigurgitano il cibo mantenendolo sempre fra il becco e lasciando che il pullo lo prenda, qualora il genitore rigurgiti una notevole quantità di cibo e questo cada sul nido, il genitore si preoccupa di prenderlo ed offrirlo al piccolo (Figura 22).



Figura 22. Alimentazione, il piccolo pigola insistentemente e va alla ricerca del becco dell'adulto allungando il collo, in questa sequenza l'adulto somministra il cibo direttamente nella bocca del piccolo, dopo il pasto le richieste del piccolo cessano, e l'adulto si accovaccia sopra di lui.

Questo tipo di comportamento viene mantenuto fino alla 6^a settimana di vita. Il tempo di alimentazione è stato nelle prime fasi di 8-10 minuti. Il pullo non è totalmente passivo ma spesso sollecita i genitori a rigurgitare il cibo, solleva le penne del dorso, emette vocalizzazioni e tutto ciò mantiene viva l'attenzione dei genitori nei suoi confronti, questo appare molto evidente quanto il piccolo ha raggiunto grandi dimensioni (Figura 23).



Figura 23. In questa sequenza si vede l'adulto in piedi e il piccolo (3 mesi) sul nido, questo cerca di attirare l'attenzione dell'adulto, chiedendo probabilmente del cibo, lo fa pigolando e aprendo e scuotendo le ali.

Spesso il genitore per evitare le continue insistenze del pullo che cerca il suo becco, resta in stazione con la testa alta in modo da non ricevere lo stimolo del pullo. Tuttavia, abbiamo osservato come le buone dimensioni raggiunte dal pullo in breve tempo, gli permettono, allungando il collo, di arrivare al becco del genitore. Non è automatico che il genitore appena arrivato dia subito da mangiare al pullo, ma questo può avvenire con un certo ritardo. Dalla 6^a settimana in poi, abbiamo osservato che il genitore si allontana deliberatamente dal nido lasciando il piccolo da solo. L'allontanamento è solo fittizio ed il genitore resta ad una distanza di 20-30 metri dal nido in relazione alla disponibilità degli spazi, controllando il pullo e le sue immediate vicinanze. Superati i due mesi e mezzo le coppie iniziano a lasciare soli i piccoli per andare entrambi alla ricerca di cibo, il piccolo solo sul nido, è consapevole che il genitore arriverà ad intervalli non sempre regolari. In questo periodo il piccolo passa il tempo giocando con i rametti che compongono il nido, a volte tenendo il rametto tra le zampe per una estremità e strappando con becco l'estremità opposta, inoltre effettua degli esercizi pre-volo, rimanendo in stazione, il piccolo apre e batte le ali per 3-5 volte di fila. Questi primi esercizi permetteranno ai giovani di prendere confidenza con i movimenti degli arti anteriori, in un periodo nel quale stanno raggiungendo uno sviluppo osseo e muscolare sovrapponibile a quello degli adulti (Carrier and Leon, 1990). I giovani a tre-quattro mesi di età migliorano le loro abilità di volo, spostandosi per brevi tratti dell'habitat riproduttivo sfruttando le correnti ascensionali presenti. L'abilità di volo non è ottimale, gli animali giovani hanno una minore capacità nel utilizzare le correnti ascensionali rispetto agli adulti (Harel et al., 2016). Inoltre si può notare la difficoltà del giovane nella fase di atterraggio, sul nido o su posatoio, che lo costringono a continuare l'attività di volo. Quando anche il secondo tentativo di atterraggio non va a buon fine, l'animale, stremato dalla attività atterra sui posti più disparati come cespugli di ginestra sotto le pareti della colonia Figura 24.



Figura 24. Sequenza di immagini riguardanti uno *Juvenilis* durante le prime esperienze di volo, l'animale ha difficoltà nel calcolare il piano di atterraggio, il nido si trova infatti circa 5 metri sopra di

lui, non riuscendo ad aggrapparsi alla parete è costretto a riprendere subito il volo, dopo un secondo errore l'animale visibilmente stanco perde quota e decide di atterrare sotto la parete rocciosa, prima finisce su un cespuglio, successivamente si porta camminando su un grosso masso, qui si riposerà per circa 15 minuti, per poi riprendere il volo e raggiungere un posatoio comune.

Non sappiamo quale siano le motivazioni che spingono il piccolo a tentare il volo. Dopo l'involo, i giovani seguono gli adulti durante le attività di alimentazione, tuttavia ciò che caratterizza gli animali giovani è la dispersione. A testimonianza di ciò, il recupero dei giovani è stato effettuato a più di 130km di distanza dall'area di nidificazione nelle zone di Lanusei, Capoterra e La Maddalena (Comunicato da Dott. Muzzeddu, agenzia Fo.Re.S.T.A.S.).

3. Esperimento 2: Analisi filogenetica e variazioni di frequenza degli aplotipi dopo il ripopolamento nella popolazione Sarda di grifone.

3.1 Scopo

Come conseguenza della grave condizione di criticità della specie Grifone in Sardegna, diversi programmi ed interventi di conservazione sono stati attuati dal 1986 per evitare il declino della popolazione del grifone, da associazioni ambientaliste, dalla Regione Sardegna, dalla agenzia forestale (attualmente Fo.Re.S.T.A.S) e dai Comuni di Oliena e Bosa; Tutte queste azioni hanno notevolmente rallentato il processo di estinzione del Grifone in Sardegna, ma non hanno potuto evitare l'estinzione locale della popolazione nella Sardegna centro-orientale, scomparsa nella prima metà degli anni '80 del secolo scorso. Tra queste azione, quelle di restocking di soggetti da altre aree geografiche hanno potenzialmente mitigato questo declino, ma non si sono mai prese in considerazione le ripercussioni genetiche. Durante il mio dottorato ho partecipato con il dipartimento di scienze biomediche per indagare sulle caratteristiche genetiche, attuali e passate, della popolazione di grifone in Sardegna.

Le popolazioni di piccole dimensioni sono più suscettibili agli eventi stocastici demografici e genetici, con impatto negativo sulla sopravvivenza a lungo termine della popolazione, soprattutto se isolana, dove la genetica soffre dell'isolamento geografico e dell'habitat limitato. Quando la popolazione viene ridotta a pochi esemplari, si hanno delle variazioni delle frequenze geniche estremamente ampie e totalmente casuali, che fanno parte del fenomeno della deriva genetica. Quando la popolazione di grifoni in Sardegna è andata incontro ad una situazione di “pericolo critico” ha probabilmente subito il fenomeno detto collo di bottiglia, perdendo alcuni tipi di caratteristiche (geni) rispetto alla popolazione di partenza con perdita di variabilità genetica. All'interno di popolazioni isolate e di dimensioni ridotte, dato che gli accoppiamenti avvengono sempre e solo tra un numero limitato di individui, con il trascorrere delle generazioni aumenta il fenomeno negativo della depressione da consanguineità, favorendo la formazione d'individui omozigoti. Gli effetti si manifestano prevalentemente nei caratteri che riguardano la fitness dell'animale, ovvero nella sua capacità riproduttiva e di adattamento ai cambiamenti ambientali (Frankham, 2005, Frankham and Kingsolver, 2004, Williams and Hilbert, 2006). Per prevenire la depressione da consanguineità e l'estinzione della popolazione Sarda, nel 1986-87 è stata effettuata la prima azione di ripopolamento con 48 individui, poi una seconda nel 1995-96 con 12 individui, in entrambe le attività i grifoni provenivano dalla Spagna e dalla Francia. I programmi di reintroduzione e ripopolamento sono diventati una delle pratiche più comunemente utilizzate per la conservazione e la protezione delle popolazioni locali a rischio a livello europeo. Sfortunatamente, queste azioni sono state compiute senza indagini genetiche note per fornire informazioni critiche atte a contrastare la perdita di diversità genetica nelle popolazioni native. Senza l'introduzione di una valida diversità genetica, gli alleli vengono rapidamente risolti o persi, ciò riduce la capacità delle popolazioni insulari di adattarsi a qualsiasi nuova circostanza esponendole a una maggiore sensibilità verso l'estinzione, la valutazione genetica pre-reintroduzione o pre-restocking ha come obiettivo il mantenimento dei modelli di diversità all'interno della popolazione ricevente con l'introduzione di genotipi adattati alle condizioni dell'habitat (McKay et al., 2005).

Le stime di diversità genetica, potenzialmente utili per le attività di conservazione, sono attualmente carenti, gli studi basati su analisi di marcatori nucleari e mitocondriali hanno evidenziato una bassa differenziazione genetica nel genere *Gyps* e all'interno di specie *G. fulvus*, indicando una elevata mobilità con flusso genico tra le popolazioni di avvoltoio (Arshad et al., 2009, Le Gouar et al., 2008). Il DNA mitocondriale (mtDNA) possiede una elevata frequenza di mutazioni, più alta rispetto al DNA nucleare. Questo assieme e passaggio di materiale genico solo per linea verticale materna e con bassissima ricombinazione, rende il mtDNA un potente strumento per studiare la storia evolutiva e la filogenesi di molti animali (Bruford et al., 2003). In particolare, il displacement loop (D-loop) è un tratto di mtDNA caratterizzato da una tripla elica per la presenza di un tratto di RNA quiescente che impedisce l'accoppiamento dei due filamenti complementari, qui sono contenute le contiene regioni ipervariabili (HVR) importantissime per gli studi sulla genetica delle popolazioni, i quali permettono di ottenere un numero elevato di aplogruppi e aplotipi (Hpt) all'interno della specie. Variazioni di aplotipi / aplogruppi, sono utili per poter indagare sulla storia naturale delle specie, chiarire eventuali fenomeni di migrazione, studiare la biologia della popolazione, la paleontologia e la geografia storica (Bruford and Townsend, 2006).

Con l'obiettivo di migliorare la conoscenza della genetica e della storia evolutiva del grifone in Sardegna, abbiamo indagato sulla filogenesi dell'animale, inoltre la sequenze di mtDNA di due gruppi di grifoni è stata analizzata e messa a confronto, uno gruppo rappresentato da grifoni appartenenti alla popolazione Sarda attuale, l'altro da individui museali deceduti prima del 1987, questo ci ha permesso di comprendere le caratteristiche genetiche della popolazione pre-declino, impatto introgressivo derivante da due attività di ripopolamento e le relazioni genetiche esistenti tra la popolazione reintrodotta e quella nativa. Per ricostruire la storia evolutiva del genere *Gyps*, è stata eseguita un'ulteriore analisi utilizzando le sequenze del gene Cyt B e ND2, mentre l'analisi della regione D-loop è stata utilizzata per stimare la variabilità genetica intraspecie all'interno della popolazione Sarda così da poter comprendere i flussi genetici. L'obiettivo è stato quello di stimare l'impatto genetico derivato dalle attività di ripopolamento e anche fornire alla letteratura scientifica informazioni importanti e utili con la speranza che le future azioni di ripopolamento vengano condotte con un moderno approccio di salvaguardia, che consideri anche le caratteristiche genetiche della specie.

3.2 Materiali e metodi

Raccolta dei campioni

Sono stati esaminati un totale di 66 grifoni Sardi così suddivisi: 22 campioni museali risalenti a prima del 1986 e 44 campioni recuperati da grifoni ancora in vita. Il dataset è stato implementato scaricando da Genbank 18 sequenze intere di mtDNA, 23 del Cyt B, 23 del ND2 e 4 del D-loop (tab. 5). Il DNA genomico proveniente dagli individui catturati in natura è stato estratto da sangue, muscoli e piume utilizzando il kit GenElute Blood genomic DNA (Sigma-Aldrich) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Il kit GenElute Mammalian genomic DNA miniprep (Sigma-Aldrich) è stato utilizzato per estrarre il DNA dai campioni museali. La qualità e la concentrazione del DNA estratto sono state

determinate mediante spettrofotometria utilizzando il ND-8000 (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE).

Amplificazione e reazioni di sequenziamento

Sono state utilizzate un totale di 31 coppie di primer per amplificare l'intera sequenza del mtDNA, con una sovrapposizione media di circa 200 bp di frammenti; le amplificazioni riguardavano anche una reazione di nested PCR. Il set di primer degenerati per l'amplificazione del mtDNA aviario (Sorenson et al., 1999) è stato impiegato per eseguire 14 reazioni di PCR su 31. Gli ampliconi sono stati quindi purificati e sequenziati. Sulla base delle loro sequenze, sono state progettate 17 nuove coppie di primer specifici. Una miscela di PCR standard da 50 µl è stata utilizzata per tutte le coppie di primer, ed era composta da 200 ng di DNA templato, 2,5 mM MgCl₂, 0,20 mM per ogni dNTP, 0,20 µM per ogni primer, 0,02 mM BSA, 1X buffer per PCR e 2 unità Taq DNA polimerasi (Sigma-Aldrich). L'amplificazione della PCR è stata effettuata con GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nelle seguenti condizioni: denaturazione iniziale di 95 ° C per 5 min, seguita da 35 cicli di 95 ° C per 50 s, 52-67 ° C per 50 s, e 72 ° C per 1 min; e un'estensione finale di 72 ° C per 4 minuti. Il sequenziamento diretto dei prodotti della PCR è stato effettuato mediante la procedura di sequenziamento ciclico con il metodo del terminatore ideossi utilizzando gli stessi primer per PCR. La reazione di sequenziamento è stata eseguita in reazioni da 20 µL composti da 40 ng di templato e da 0,16 µM di primer secondo quanto descritto in protocollo. I prodotti di sequenza sono stati purificati utilizzando SigmaSpin Post-Reaction Clean-UP Columns (Sigma-Aldrich) ed elaborati su un sequenziatore 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). I dati grezzi del sequenziamento sono stati elaborati con il Sequencing Analysis Software 5.3.1 (Applied Biosystem) e il valore di qualità di ciascuna base negli elettroferogrammi è stato valutato dall'algoritmo KB base-calling. Le sequenze processate sono state visualizzate e assemblate in contigs, come descritto da Sanna et al. (2015). La disposizione genica è stata identificata confrontando le sequenze con quella di *Aegyptius monachus* (GB # KF682364) (Li et al., 2015) che è la specie più vicina a *G. fulvus* tra gli avvoltoi del Vecchio Mondo esistenti, di cui è disponibile tutta la sequenza del mitogenoma. La mappa fisica del mitogenoma del grifone è stata generata mediante OGDRAW 1.2 (Lohse et al., 2013).

Analisi filogenetiche e datazione molecolare

Le sequenze sono state allineate usando Clustal X 2 (Larkin et al., 2007). Le analisi filogenetiche sono state eseguite utilizzando quattro diversi marcatori molecolari: l'intero mitogenoma, il Cyt B, ND2 e la regione D-loop. L'intero mitogenoma è stato utilizzato per inferire la storia evolutiva del clade degli avvoltoi del Vecchio Mondo, mentre le relazioni filogenetiche tra le specie dei *Gyps* sono state studiate mediante le sequenze del gene Cyt B e ND2. Il set di dati è stato composto rispettivamente da 19 e 24 sequenze e il gruppo dei passeriformi è stato impostato come outgroup per la radice dell'albero.

L'analisi a livello intra-specie è stata effettuata utilizzando le sequenze della regione del D-loop ottenute da 68 individui di *G. fulvus*, mentre *G. africanus* e *G. bengalensis* erano gli outgroups. Poiché abbiamo sequenziato solo le prime 446 bp del del dominio I della regione di controllo del mtDNA dai campioni museali, riportiamo solo le stime di diversità basate sulla sequenza omologa di tutti gli altri campioni. Tutta la variabilità dei nucleotidi osservata tra i campioni esistenti era presente in questo più piccolo frammento.

La variazione genetica all'interno della specie *G. fulvus* è stata stimata valutando il numero di siti polimorfici (S), il numero di aplotipi (H), la diversità di aplotipo (h) e la diversità nucleotidica (π) utilizzando il software DnaSP 5.10 (Librado and Rozas, 2009). Le distanze genetiche a coppie, corrette in base al modello a due parametri di Kimura (K2P), sono state stimate tra gli individui mediante il software MEGA 7 (Kumar et al., 2016) con 1000 repliche bootstrap. MEGA 7 è stato utilizzato per scegliere il modello di sostituzione del nucleotide e per inferire gli alberi con la massima verosimiglianza (ML). L'affidabilità di ciascun ramo è stata stimata mediante il bootstrap (10.000 steps). Le relazioni filogenetiche tra gli individui sono state studiate mediante l'analisi di Inferenza Bayesiana (BI) e l'analisi ML come precedentemente descritto da Sanna et al. (2015). Le stime dei tempi di divergenza sono state ottenute utilizzando l'approccio bayesiano implementato in BEAST 1.7.5 come precedentemente riportato (Sanna et al., 2015). Per l'analisi a livello intra-specie eseguita sulle sequenze del D-loop, è stato assunto un modello coalescente a dimensione costante. Sono state eseguite quattro corse indipendenti con le seguenti impostazioni: 20.000.000 steps, i cui dati sono stati tracciati ogni 2000 steps per ottenere 10.000 record e alberi. L'output di due corse indipendenti è stato analizzato utilizzando Tracer 1.5. L'analisi dei file di registro indicati per tutti i parametri convergenti delle corse indipendenti e la dimensione del campione effettivo totale (ESS) era > 200 . Successivamente, un albero di maximum clade credibility (MCC) è stato creato utilizzando un combinatore di log per unire i files dell'albero da ogni corsa indipendente dopo aver rimosso il 10% degli alberi iniziali come burn-in e successivamente ricampionando gli stati per ottenere un campione finale di 9000 alberi e (ii) utilizzando un annotatore ad albero per creare l'albero di consenso. Anche il tempo per i più recenti antenati comuni (TMRCA) è stato valutato secondo quanto descritto da Sanna e collaboratori (2015). La datazione molecolare dei principali eventi di scissione all'interno del clade dei vulturidi del Vecchio Mondo e del genere *Gyps* è stata effettuata assumendo quattro diversi punti di calibrazione (CP) basati su registrazioni fossili che forniscono età per i nodi correlati all'aumento di Sphenisciformes (CP1), Psittaciformes (CP2), la spaccatura Anseranatidae / Anatidae (CP3) (Ksepka and Clarke, 2015) e la divergenza tra Sphenisciformes e Ciconiiformes (CP4) (Slack et al., 2006). Dal momento che non erano disponibili registrazioni fossili all'interno del gruppo *G. fulvus*, la stima dei tempi di divergenza a livello intra-specie è stata eseguita sulla regione D-loop, impostando la divisione tra *G. fulvus* e *G. rueppellii* come punto di calibrazione (CP5). È stato dedotto dalle analisi molecolari eseguite sulle sequenze del gene Cyt B e ND2.

Le frequenze degli aplotipi nelle popolazioni museali e degli esistenti *G. fulvus* sono state confrontate calcolando il test del Chi-quadrato (Software Minitab, Minitab Ltd., UK).

3.3 Risultati

Analisi evolutive all'interno del genere *Gyps*

Al fine di fornire un quadro più completo della filogenesi di *Gyps*, le sequenze del gene del Cyt B e di ND2 sono state selezionate per la loro maggiore disponibilità rispetto alle sequenze complete di mtDNA nel database. Il set di dati era composto da 24 sequenze per ciascun marker. Gli alberi BI estrapolati usando questi due differenti marker hanno fornito una topologia identica e sono stati completamente risolti. Tutte gli accipitridiformi condividevano un antenato comune, in base al risultato ottenuto dall'analisi di tutte le sequenze mitogeniche, sebbene gli sphenisciformi siano stati

trovati più correlati agli Accipitriformes invece che a Psittaciformes. Gli avvoltoi e le aquile erano raggruppati in due cluster ben separati. All'interno del gruppo di avvoltoi, erano identificati due diversi sotto-cladi, uno comprendente *T. tracheliotus*, *T. occipitalis* insieme a *A. monachus* e uno composto da *N. monachus*, *G. bengalensis*, *G. rueppellii* e *G. fulvus*. La comparsa dell'antenato comune delle specie *Gyps* risale a circa 5,4 MYA quando *G. bengalensis* si separò precocemente dal gruppo composto da *G. rueppellii* / *G. fulvus*, separati circa 2,3 MYA. Le analisi ML erano coerenti con BI, mostrando la stessa topologia ma un nodo di supporto inferiore nei gruppi principali recuperati.

Diversità genetica e analisi filogenetica a livello intra-specie

Un frammento del D-loop 1 corrispondente al I dominio HV di 66 grifoni Sardi (22 musei + 44 campioni esistenti) sequenziato ha permesso di rilevare tre aplotipi unici (Hpt = 3), e definiti da due siti polimorfici (S). Sono stati ottenuti valori complessivamente bassi di aplotipo medio totale e diversità nucleotidica, $h = 0,574 (\pm 0,033)$ e $\pi = 0,00179$, rispettivamente (Tabella 4).

Tipo Campione	N	S	h	H	π
Attuale	44	2	3	0.532	0.00158
Museale	22	1	2	0.455	0.00125
TOT	66	2	3	0.566	0.00172

Tabella 4. Diversità genetica rilevata nella popolazione di grifoni Sardi Museali (M) ed Attuali (A). N:dimensioni del campione; S:numero di siti polimorfici; h:numero di aplotipi; H:diversità aplotipica; π : diversità nucleotidica.

L'Hpt A, che era il più grande, comprendeva 36 sequenze (52,9%), 7 delle quali (19,4%) appartenenti a campioni museali. L'Hpt B era composto da 26 sequenze (38,2%), 15 delle quali (il 57,7%) da campioni museali. L'Hpt C (8,9%) è stato osservato solo in cinque campioni esistenti e nell'individuo pakistano. All'interno del gruppo di grifoni Sardi, le frequenze degli aplotipi erano diverse tra campioni esistenti e museali (test del chi quadrato $p < 0,01$). La maggior parte dei campioni esistenti apparteneva all'Hpt A (28/44; 63,6%), mentre i campioni Hpt B erano 11 su 44 (25,0%) e quelli Hpt C erano 5 su 44 (11,4%). Al contrario, la maggior parte dei campioni museali (15/22; 68,2%) ha presentato l'Hpt B mentre l'Hpt A è stato rilevato in 7 su 22 (31,8%) individui. Nessuno dei campioni museali presentava la sequenza del Hpt C (Tabella 5).

Hpt	Composizione	N° dei campioni Museali (%)	N° dei campioni totali (%)
A	1–7, 9, 11, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 25–31, 33, 40–44, M1- M3, M6, M20- M22	7 (31.8%)	35 (53.0%)
B	8, 10, 12–14, 17, 20, 21, 24, 38, 39, M4, M5, M7-M19	15 (68.2%)	26 (39.4%)
C	32, 34–37	0	5 (7.6%)

Tabella 5. Distribuzione dei campioni tra gli aplotipi identificati.

Per quantificare la divergenza tra gli aplotipi, le distanze genetiche a coppie tra i gruppi sono state calcolate secondo il modello K2P impostando una variazione uniforme dei tassi tra i siti. Il più basso livello di diversità genetica è stato osservato tra Hpt A e B ($0,00275 \pm 0,00267$) e Hpt A e C ($0,00275 \pm 0,00265$), mentre è stata trovata una distanza di $0,00552 \pm 0,00372$ quando si confrontano le sequenze Hpt B e Hpt C.

L'analisi dell'albero BI ha indentificato tre diversi lignaggi materni nella irradiazione di *G. fulvus* che ha dato origine a tre distinti cladi corrispondenti agli aplotipi del mtDNA osservati nell'analisi sulla variabilità genetica inferta da DnaSP. L'albero filogenetico è stato completamente risolto e ben supportato (Figura 25). Per completare il set di dati, 2 sequenze omologhe di individui *G. fulvus* provenienti dal Pakistan e dal Gambia (GB # DQ908993-4), uno di *G. rueppellii* e *G. africanus* (GB # DQ909000-2) (Johnson et al., 2006) sono stati scaricati da GenBank. Le ultime due sequenze sono state utilizzate come outgroup. Il grifone del Gambia era raggruppato all'interno del clade Hpt A, mentre l'individuo pakistano era incluso nel gruppo corrispondente all'Hpt C. Il clade composto da sequenze che ospitavano l'Hpt C presto divergeva dagli aplotipi A e B, che condividevano un più recente comune antenato (MRCA). La spaccatura tra *G. fulvus* / *G. rueppellii* ricavata dall'analisi sulle sequenze del gene Cyt B e ND2 è stata impostato come CP per stimare la divergenza tra gli aplotipi rilevati all'interno di *G. fulvus* a livello della sequenza del D-loop. La divergenza tra Hpt A / B e Hpt C risale a circa 0,73 MYA; questo evento potrebbe essere rappresentativo della comparsa della specie *G. fulvus*. Gli Hpt A e B sono stati trovati più strettamente correlati in quanto hanno condiviso un MRCA di circa 0,37 MYA, mentre l'aumento degli attuali aplotipi del grifone sardo è stato stimato intorno a 310-120 mila YA.

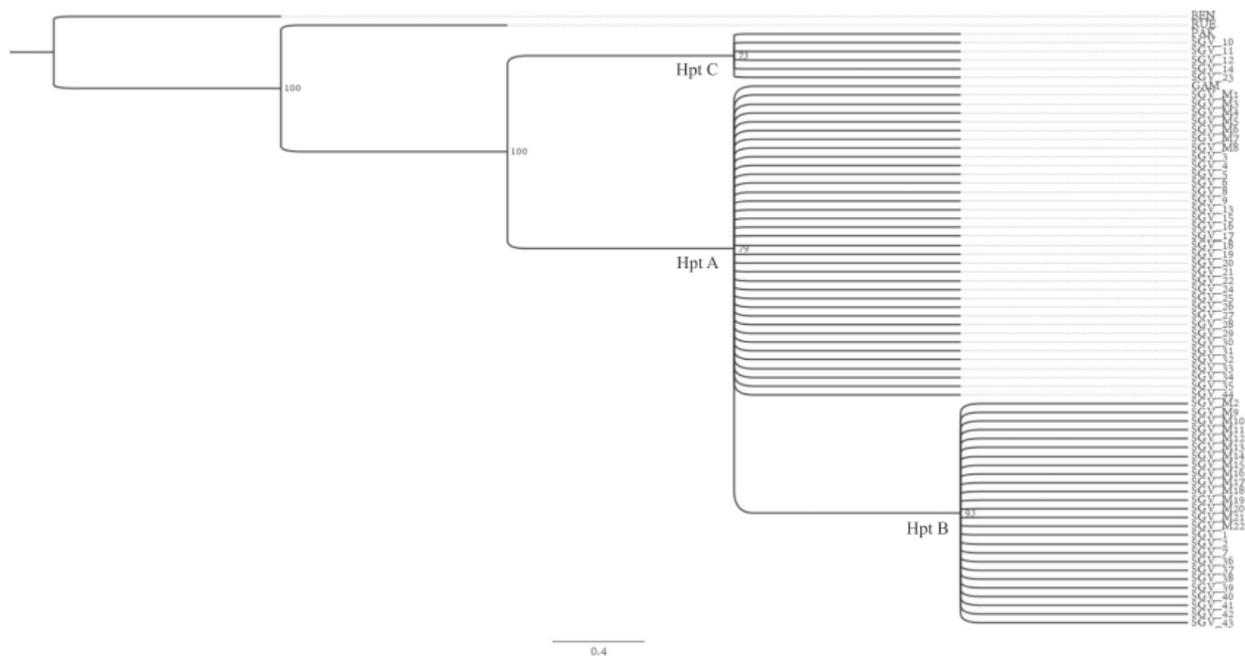


Figura 25. Albero radicato, tipo binario basato sul dataset D-loop che mostra tre cluster di aplotipi di grifoni Sardi. I supporti nodali (probabilità posteriore) sono indicati sotto i nodi. BEN: *G. bengalensis*; RUE: *G. rueppellii*; PAK: *G. fulvus* dal Pakistan; GAM: *G. fulvus* dal Gambia; SGV: avvoltoio grifone Sardo; SGV_M: campione Sardo di grifone proveniente da museo.

3.4 Discussione

È stata eseguita un'analisi della diversità genetica tra i campioni attuali e museali di grifone presenti in Sardegna, analizzando le conseguenze che le azioni di restocking hanno avuto sulla genetica della popolazione autoctona. Dato che la variabilità genetica è la base della capacità di adattamento, con la perdita di diversità genetica, si ha una riduzione dei tratti legati al fitness, rendendo la specie maggiormente sensibile ai cambiamenti ambientali. La variabilità genetica è alla base dell'adattamento, e la perdita di diversità genetica, in particolare per i tratti legati al fitness, inciderà sulla persistenza della popolazione e limiterà la capacità di una popolazione di adattarsi ai cambiamenti ambientali (R. Frankham et al., 2002, Reed and Frankham, 2003). Comprendere meglio la storia evolutiva e acquisire conoscenze genetiche di una specie in pericolo di estinzione, offre un contributo alle problematiche di gestione delle specie. Inoltre risulta fondamentale per il successo dei programmi di conservazione, poiché consente la definizione delle unità di gestione e la progettazione di strategie volte a ridurre l'erosione genetica preservando specificità distintive delle popolazioni autoctone (Haig, 1998, Hedrick, 2001).

Nonostante il basso numero di individui, la popolazione di grifoni Sardi attuali ha mostrato una variabilità genetica maggiore rispetto alla popolazione passata (precedente al ripopolamento), attestata dalla presenza di tre diversi Hpts (A, B e C), mentre solo due aplotipi (Hpt A e B) sono stati osservati tra i campioni museali. La frequenza della distribuzione degli aplotipi comuni ai due periodi storici, pre e post restocking sono cambiate. Infatti, mentre in passato l'Hpt B era il più comune nella popolazione Sarda, attualmente prevale l'Hpt A e inoltre è presente un nuovo aplotipo C presente nel

7% degli individui analizzati. Ipotizzando che i nostri dati mostrino un quadro della diversità genetica all'interno della popolazione Sarda prima e dopo le azioni di restocking (1987 e 1996) con animali provenienti dalla Spagna e dalla Francia, possiamo affermare che le conseguenze del restocking (ripopolamento), da un punto di vista genetico, siano state l'introduzione di un aplotipo alieno e l'alterazione delle frequenze relative agli aplotipi nativi. Per spiegare questa inversione delle frequenze degli aplotipi abbiamo ipotizzato che la maggior parte degli animali reintrodotti avesse l'Hpt A, insieme ad una piccola percentuale di individui Hpt C. L'integrazione nell'habitat riproduttivo di questi soggetti ha aumentato le frequenze Hpt A e introdotto Hpt C all'interno della popolazione esistente rispetto a quella nativa. L'Hpt B, quello maggiormente rappresentato nella popolazione nativa Sarda prima delle azioni di ripopolamento.

Reperti fossili trovati a Malta (Lydekker, 1890) e in Sardegna, hanno ipotizzato la presenza di una specie estinta, chiamata *Gyps melitensis* (Louchart, 2002, Wilkens, 2003). I risultati dedotti dalla lunghezza delle ossa e dal confronto della struttura scheletrica sono coerenti con l'ipotesi che questo avvoltoio fosse fenotipicamente molto simile all'attuale grifone anche se di dimensioni maggiori (Sánchez Marco, 2007). In un tale contesto, avrebbe potuto giocare un ruolo chiave nell'evoluzione di *G. fulvus*. Gli aplotipi A e B sono emersi in un intervallo di tempo compreso tra 1 e 0.8 MYA come risultato di una rapida radiazione adattativa. Dal momento che i grifoni sono necrofagi obbligati, possiamo supporre che la loro evoluzione e la loro distribuzione geografica siano correlate e condizionate dalla storia evolutiva di grandi specie di mammiferi da cui dipendono per nutrirsi. L'Hpt A e B arrivarono probabilmente dalla terraferma durante il Neolitico, dopo l'estinzione della mammalofauna endemica Sarda, rappresentata dal *Megaceros cazioti* (un cervide) e il *Cynotherium sardous* (un canide) (Carenti and Wilkens, 2006), queste specie sono scomparse durante l'ultima era glaciale, successivamente l'isola è stata nuovamente popolata da mammiferi importati attraverso il Mar Mediterraneo dai primi agricoltori. È noto che il grifone, a causa del suo volo, è riluttante a volare anche a breve distanza sull'acqua, e migra invece principalmente, se non interamente, sulla terraferma (Agostini et al., 2005, Bildstein et al., 2009). Così i grifoni Sardi per via dell'isolamento geografico hanno subito un livello molto basso di scambi con le popolazioni dell'Europa continentale. Tuttavia, data la vicinanza al continente Europeo, non possiamo escludere che particolari condizioni atmosferiche, seppure rare, abbiano favorito la migrazione della specie nell'isola come recentemente osservato nella popolazione di Maiorca (J. Mayol, personale comunicazione). Nel 2005 e nel 2006 la presenza di un individuo di avvoltoio monaco, proveniente dall'Europa continentale, è stata registrata nel Bosano (L'altra Bosa). Questa osservazione testimonia la possibilità che hanno i grossi vulturidi di raggiungere l'isola. Questi animali sono in grado di raggiungere altitudini superiori ai 10000 metri (Orta et al., 2015), ricavando così un'elevata energia potenziale da sfruttare in planata, sopra le distese di acqua, per raggiungere le isole. L'alta frequenza di Hpt B rilevata nei campioni museali Sardi potrebbe essere dovuta a una forte struttura filogeografica, legata a fenomeni di deriva genetica, collo di bottiglia e limitato scambio di individui da e verso altre popolazioni Europee. Tuttavia, un tale livello di differenziazione della popolazione Sarda appare particolarmente sorprendente per una specie che può volare fuori dalla sua area di nidificazione coprendo lunghe distanze, anche di 500 km in un solo giorno (Susič and Grabec, 2000). Questo tipo di mobilità è stato descritto per gli spostamenti sulla terraferma ma non per quelli transmarini che, per la carenza di correnti ascensionali e la presenza di correnti trasversali, risultano essere assenti nelle specie che effettuano un tipo di volo come quello del grifone.

Ad oggi, sono disponibili pochissimi dati sulla caratterizzazione genetica del grifone. Le Gouar et al. (2008) hanno utilizzato i micro-satelliti per confrontare le popolazioni native di Israele, Croazia, Pirenei Francesi (Ossau) e una colonia reintrodotta nel Massiccio Centrale meridionale Francese (Causses). La diversità genetica era simile in tutte le popolazioni native e in quelle reintrodotte con successo, mentre la popolazione della Croazia risultava differente da tutte le altre popolazioni occidentali, questo a causa dell'immigrazione limitata di avvoltoi da altre aree europee nelle isole. In maniera simile, questo potrebbe essere accaduto in Sardegna dove, ad eccezione del comportamento dispersivo giovanile, i grifoni adulti sono sedentari. Tuttavia, dovremo tenere in considerazione che sebbene i giovani siano in grado di coprire lunghe distanze, data l'inesperienza nel volo del primo periodo di vita, le loro capacità di sopravvivenza sono inferiori rispetto agli avvoltoi adulti (Anders et al., 1997, Harel et al., 2016). Poiché i giovani hanno bisogno di almeno 4-5 anni per raggiungere la capacità riproduttiva e disseminare il loro genotipo in una nuova area e, considerando il rapporto tra i sessi nella popolazione dove solo le femmine possono contribuire alla trasmissione del mtDNA, i flussi genetici tra le popolazioni sono ulteriormente ritardati. I fattori genetici, tra cui la perdita di diversità e la depressione da inbreeding, aumentano i rischi di estinzione riducendo il potenziale adattativo, specialmente negli uccelli longevi e filopatrici come i grifoni (Brook et al., 2002) e come dimostrato da diversi autori il ripopolamento può contrastare gli effetti della depressione da consanguineità in popolazioni isolate (Hedrick, 1995, Madsen et al., 1999, Mansfield and Land, 2002, Robertson and Meathrel, 2006). Non possiamo escludere il proseguimento delle azioni di ripopolamento nelle regioni in cui il numero di individui è molto inferiore alla dimensione minima vitale della popolazione (MVPS) con rischio reale di scomparsa totale, tuttavia, se l'obiettivo di un programma di conservazione è preservare il carattere distintivo genetico, le azioni di ripopolamento dovrebbero essere scoraggiate a meno che non si valuti il genotipo degli animali da introdurre.

3.5 Conclusioni

In conclusione, la diversità genetica stimata all'interno della attuale popolazione Sarda di grifoni è rappresentata da tre aplotipi di mtDNA, questi hanno presentato una frequenza differente rispetto a quella mostrata dagli animali in Sardegna prima delle attività di restocking. Infatti, mentre Htp B è stato quello osservato più comunemente tra i campioni museali, l'Hpt A ha superato il B tra gli esemplari esistenti e tra questi è stato descritto l'Hpt C. Ciò suggerisce che l'Hpt B era il più rappresentativo nella popolazione Sarda pre-declino, mentre l'Hpt C è stato introdotto dalla azione di restocking. Sulla base di questi risultati possiamo inoltre ipotizzare che l'Hpt A sia il più diffuso nel bacino del Mediterraneo, ma ulteriori analisi di confronto fra le popolazioni delle isole presenti nel Mediterraneo potrebbero chiarire meglio questa dinamica. Le analisi filogenetiche sugli aplotipi attuali riscontrati indicano che hanno avuto origine 0,73 MYA a causa di una rapida radiazione adattativa originata da un antenato comune.

Al fine di preservare la diversità genetica autoctona all'interno della popolazione Sarda, così come in altre colonie native, raccomandiamo di fare riferimento alle nuove informazioni genetiche fornite nel presente studio prima dell'attuazione dei programmi di recupero. Ogni nuovo individuo dovrebbe essere genotipizzato prima del ripopolamento, dal momento che è importante prendere in considerazione non solo il comportamento ecologico, l'aspetto morfologico, le dimensioni delle

colonie, ma anche i risultati genetici, così da evitare la perdita del pool genetico originale. Le evidenze riportate in questo manoscritto supportano la necessità di politiche di biodiversità che vadano verso l'identificazione e la conservazione dell'Htp B, il quale potrebbe rappresentare un relitto ancestrale genetico.

Visti i risultati ottenuti studiando le caratteristiche genetiche dei grifoni in Sardegna, e considerando i fenomeni ai quali sono sottoposte le popolazioni di piccole dimensioni presenti nelle isole, abbiamo voluto indagare, sulle possibili differenze genetiche esistenti nei grifoni di tre isole del Mediterraneo.

4. Esperimento 3: Filogeografia e caratterizzazione genetica delle popolazioni di grifone in tre isole del Mediterraneo.

4.1 Scopo

Il grifone è caratterizzato da un volo che necessita la presenza di correnti ascensionali per poter guadagnare quota, questa particolarità rende difficoltoso e pericoloso l'attraversamento dei tratti di mare, che per via dell'assenza di correnti ascensionali richiede invece un volo battente prolungato. Questo limite dell'animale fa pensare che le popolazioni insulari di grifone, siano delimitate all'interno del confine segnato dal mare, facendo ipotizzare che queste siano sottoposte a differenziazione fenotipica e genotipica propria della isola, o comunque meno legata alla evoluzione genetica che la stessa specie ha subito nel continente. Le isole sono viste come ambienti genetici dinamici dove immigrazione e tassi di estinzione si verificano in maniera differente rispetto al continente e, quando le capacità di dispersione della specie considerata sono scarse, questi fenomeni assumo un carattere di indipendenza della terraferma. Le popolazioni insulari sono naturalmente più vulnerabili ai fattori demografici, ambientali e genetici stocastici associati con piccole popolazioni (Pimm et al., 1988, Frankham, 1995). Una conseguenza inevitabile della piccola dimensione della popolazione dei grifoni in Sardegna è la perdita della diversità genetica a causa della deriva genetica, conducendo la specie a una depressione da consanguineità che potrebbe anche influenzare la persistenza a lungo termine di una popolazione.

L'ampia apertura alare del grifone consente di sfruttare efficacemente le termiche mediante il caratteristico volo veleggiato ed è a questo tipo di volo che sono legate le capacità di dispersione e il comportamento migratorio di questi animali. Gli animali giovani Spagnoli svernano in Africa (Bijlsma, 1987, Donazar, 1993, Hoyo et al., 2014, Sušić, 2000, Terrasse, 2006) sfruttano lo stretto di Gibilterra per raggiungere il Marocco, dove la superficie di acqua da sorvolare, per cambiare continente, è minima. Infatti i grifoni sono piuttosto riluttanti ad attraversare anche brevi tratti sul mare (< 25 Km) (Agostini, 2004, Bildstein et al., 2009), la scarsa tendenza ad attraversare brevi tratti di mare sarebbe attribuita all'assenza di correnti ascensionali di aria termica nel mare associate al rischio di affaticamento derivante da un l'utilizzo del volo battente e dalla possibilità di andare fuori rotta a causa dei venti trasversali (Kerlinger, 1989). L'ampiezza dello stretto di Gibilterra potrebbe rappresentare, per il grifone, il limite massimo per il quale è possibile attraversare il mare (Bildstein et al., 2009). Pertanto, nel caso delle isole, maggiore è la loro distanza dalla terraferma, più improbabile è una loro colonizzazione da parte dei grifoni e per lo stesso motivo, quando alcuni individui raggiungono occasionalmente un'isola, sarebbe difficile per loro tornare sulla terraferma. La colonizzazione delle isole può essere mediata dall'uomo o da eventi meteorologici eccezionali, come nel caso di Maiorca (Camiña et al., 2015). In alternativa, la colonizzazione può essere fatta risalire all'esplorazione di nuove aree da parte di individui giovani che mostrano frequentemente una dispersione natale (Bernis, 1983), in contrasto con gli individui adulti che sono fedeli al proprio habitat di riproduzione (Sarrazin et al., 1996, Xirouchakis, 2010).

Attualmente, tra le isole del Mediterraneo, Maiorca, Sardegna, gli isolotti dell'arcipelago del Quarnero in Croazia, Creta e Cipro ospitano popolazioni di grifoni insulari. Tuttavia, a parte le

colonie adriatiche vicine alla costa croata (1-3,5 km), il resto di esse avrebbe avuto un livello molto basso di scambi con le popolazioni di grifoni continentali data la loro distanza dall'Europa continentale per via dei limiti di volo dei grifoni. A causa di questo isolamento geografico, queste popolazioni di grifoni potrebbero aver sperimentato derive genetiche e / o eventi a collo di bottiglia. Pertanto, è altamente probabile una riduzione dei valori di diversità genetica nelle popolazioni di grifoni presenti nelle isole del Mediterraneo rispetto alle controparti continentali. Tuttavia, in un nostro recente studio molecolare che ha analizzato la variabilità della sequenza del DNA mitocondriale all'interno della popolazione di grifoni sardi, è stato rilevato un livello abbastanza buono di diversità genetica confermato dalla scoperta di tre aplotipi (Mereu et al., 2017).

In questo contesto, e escludendo le popolazioni di grifoni Croati a causa della vicinanza dell'isola all'Europa continentale, e escludendo i grifoni Maiorchini data la loro recente presenza (2008), lo scopo del presente studio era di fornire un quadro completo della diversità genetica tra la popolazione di grifoni nativi ospitati nelle isole del Mediterraneo della Sardegna, Creta e Cipro analizzando la regione del D-loop del DNA mitocondriale. La specie di Creta conta 250-300 coppie riproduttive attive ed una popolazione totale stimata di circa 1000 individui, per questo è stata valutata come popolazione "vulnerabile" (Anastasios and Panagiota, 2009). A Cipro e in Sardegna, i grifoni sono stati selezionati come "in pericolo critico" e comprendono 11-15 individui (1-2 coppie deposte l'uovo) e 130-150 individui (42 coppie in deposizione) (dati non pubblicati, 2017, Iezekiel e altri 2004, Kasinis dati non pubblicati) rispettivamente.

4.2 Materiali e metodi

Raccolta dei campioni

I campioni di DNA del grifone sono stati raccolti durante le ricerche condotte dal Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari (Italia), in collaborazione con il Museo di Storia Naturale dell'Università di Creta (Grecia) e il Ministero dell'interno di Cipro (Cipro). Complessivamente, tra gennaio 2016 e dicembre 2018 sono stati raccolti 109 campioni (sangue e piume) di individui vivi e tessuti museali di animali imbalsamati originari della Sardegna (n = 66), Creta (n = 36) e Cipro (n = 7) (Figura 26;

Tabella 6).

I campioni museali sono stati ottenuti raccogliendo un piccolo frammento (1x1cm) di cute dai polpastrelli di 22 grifoni Sardi e 3 Cretesi. I campioni museali e le piume sono stati conservati in fiale etichettate individualmente contenenti EtOH al 95% a temperatura ambiente finché non sono state sottoposte a procedure di estrazione del DNA. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette con EDTA, nel rispetto del benessere degli animali.

Specie	N	Origine Geografica	Tipo	Code	GB#
Gyps fulvus	44	Sardegna	Attuale	SGV_1-44	KX893248-313
	22		Museale	SGV_M1-M22	
	33	Creta	Attuale	CGV_1-33	*
	3		Museale	CGV_M1-M3	*
	7	Cipro	Attuale	YGV_1-7	*
Gyps rueppellii	1	Gambia	-	GAM	DQ908994
Gyps bengalensis	1	Pakistan	-	PAK	DQ908993
Gyps rueppellii	1	-	-	RUE	DQ909000
Gyps bengalensis	1	-	-	BEN	KJ506786

Tabella 6. Elenco delle specie e delle sequenze incluse nelle analisi filogenetiche. N: numero; GB#: GenBank Accession number; *sequenze ottenute in questo esperimento.

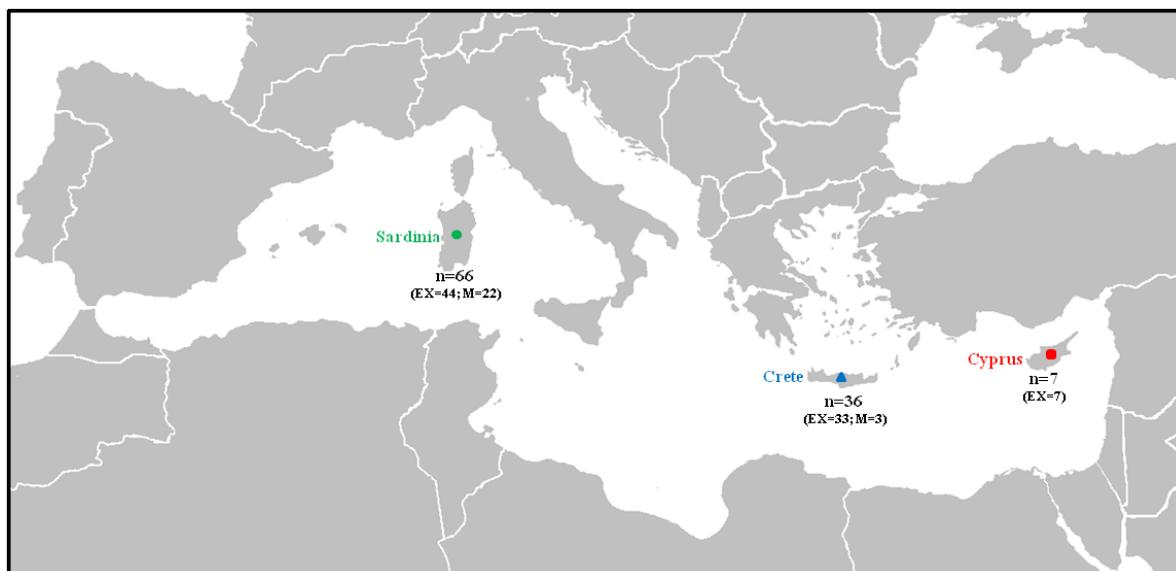


Figura 26. Mappa del bacino del Mediterraneo che indica la distribuzione geografica dei siti di campioni genetici del grifone. EX: individuo esistente; M: esemplare del museo.

Analisi molecolare

Per consentire un confronto diretto con i dati precedentemente pubblicati, abbiamo utilizzato lo stesso marker molecolare (mtDNA D-loop) utilizzato da Mereu et al. (2017), la cui analisi non includeva le isole Mediterranee di Creta e Cipro. Primer specifici per il mtDNA (GbCR1.L - GbCR2.H) progettati da Johnson et al. (2006) sono stati utilizzati per amplificare circa 400 coppie di basi (bp) dall'estremità 5' della regione di controllo del mtDNA che contiene tutta la variabilità nucleotidica discriminante gli aplotipi di *G. fulvus* rilevati all'interno della popolazione del grifone Sardo (Mereu et al., 2017).

L'isolamento del DNA genomico dai campioni di sangue è stato eseguito utilizzando il kit NucleoSpin Blood (MACHEREY-NAGEL) secondo il protocollo del produttore. I kit NucleoSpin DNA FFPE XS e NucleoSpin Tissue XS (MACHEREY-NAGEL) sono stati utilizzati rispettivamente per recuperare il DNA dai campioni di cute e piume. La qualità del campione e la concentrazione del DNA sono state determinate mediante spettrofotometria utilizzando un ND-8000 (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE). L'amplificazione è stata condotta utilizzando il GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e il profilo ciclico è stato il seguente: denaturazione iniziale a 95 °C per 5 min, quindi denaturazione, anelling dei primer ed estensione a 95 °C per 50 s, 62 °C per 50 s e 72 °C per 1 min per 35 cicli, seguito da un'estensione di 4 min a 72 °C. I campioni sono stati quindi raffreddati e mantenuti a 4 °C fino al sequenziamento. Il sequenziamento diretto dei prodotti di PCR e l'elaborazione dei dati di sequenziamento grezzi sono stati eseguiti come precedentemente descritto nell'esperimento 2.

Analisi statistica

Le sequenze sono state allineate usando Clustal X2 (Larkin et al., 2007) e BioEdit (Hall, 1999). I calcoli sulla diversità genetica sono stati implementati usando DnaSP v5.10 (Librado and Rozas, 2009). Il numero di siti polimorfici (S), numero di aplotipi (H), diversità di aplotipo (h), diversità nucleotidica (π) e stime della frequenza degli aplotipi sono stati calcolati come una singola popolazione su un frammento lungo 342 bp che comprende l'intero dominio HVS I della regione del D-loop del mtDNA. I campioni sono stati quindi suddivisi in sottopopolazioni e combinati a livello regionale per calcolare il coefficiente di differenziazione (FST) intra-popolazione e le analisi gerarchiche di varianza molecolare (AMOVA). Le distanze genetiche a coppie sono state corrette in base al modello a due parametri di Kimura (K2P) e sono state stimate tra gli individui mediante il software MEGA 7 (Kumar et al., 2016) con 1000 repliche di bootstrap. Anche le differenze a coppie inter e intra popolazioni sono state calcolate insieme alla distanza di Nei (d) attraverso l'uso delle statistiche F tradizionali.

L'albero era radicato dal *G. bengalensis* con una sequenza parziale di 773 bp dal D-loop (GB # KJ506786) che era allineata alle sequenze del grifone e quindi ritagliata per contenere le stesse regioni. Il *G. rueppellii* è stato usato come outgroup. L'analisi filogenetica è stata eseguita utilizzando i metodi Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) e Bayesian Inference (BI). Le analisi ML e MP sono state eseguite mediante MEGA 7.0.14 (Kumar et al., 2016), che sono state utilizzate anche per inferire il miglior modello di sostituzione del nucleotide. L'albero BI è stato ricavato utilizzando Bayes 3.2.5 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) tramite la catena di Markov Monte Carlo (MCMC). I campioni sono stati prelevati ogni 1.000 passaggi su 20.000.000 passaggi di MCMC. Il primo 10% è stato scartato come burn-in. Campionamento accettabile e convergenza alla distribuzione stazionaria sono stati controllati mediante l'ispezione di tracce utilizzando Tracerv1.7 (Rambaut et al., 2018) e gli alberi sono stati modificati in FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Inoltre, una rete aplotipica è stata dedotta mediante l'opzione Integer Neighbor-Joining (IntNJ) di PopART v1.7 (<http://popart.otago.ac.nz/index.shtml>).

Le stime del tempo di divergenza sono state calcolate utilizzando il metodo RelTime basato sul framework Maximum Likelihood implementato in MEGA 7.0.14 (Kumar et al., 2016) e l'approccio Bayesiano implementato in BEAST 1.7.5 (Drummond et al., 2012). Dal momento che non erano disponibili registrazioni fossili all'interno di *G. fulvus*, la datazione molecolare è stata effettuata assumendo cinque punti di calibrazione (CP) ottenuti da analisi molecolari eseguite da Mereu et al.

(2017) sulle sequenze di regioni del D-loop. Questi CPs si riferiscono a eventi di scissione all'interno della radiazione evolutiva del grifone tra cui la comparsa della specie *G. fulvus* (CP1), la divergenza tra aplotipi (Hpt) A e B (CP2) e l'insorgenza degli Hpt A (CP3), B (CP4) e C (CP5).

4.3 Risultati

Stima della diversità genetica

Complessivamente, sono stati trovati quattro aplotipi tra 109 avvoltoi; tre aplotipi (Hpt-A, Hpt-B, Hpt-C) descritti da Mereu et al. (2017) e un aplotipo non segnalato precedentemente (Hpt-D). Il nuovo aplotipo è stato riscontrato solo nella popolazione Cretese con una frequenza del 5,6%. Le differenze in questi aplotipi sono dovute a quattro mutazioni puntiformi incluse 3 transizioni G / A e una C / T. Il primo sito polimorfico è stato trovato nella posizione 37 dell'allineamento e discrimina Hpt-B (A) dagli altri Hpt (G). Due transizioni (192: A / G; 301: G / A) erano esclusive di Hpt-D, mentre in posizione 195 un polimorfismo C / T discrimina Hpt A e B da Hpt C e D. Se la consideriamo come una unica popolazione, la differenza (Hd) in aplotipo (o gene) era elevata a 0,535 +/- 0,042, mentre la diversità nucleotidica (π) e il numero medio di differenze nucleotidiche (k) erano rispettivamente 0,00195 e 0,665. Le popolazioni Sarde e Cretesi hanno mostrato un buon livello di diversità genetica, come confermato dall'individuazione di tre aplotipi all'interno di ciascuno di essi (

Tabella 7).

Popolazione	N	S	h	Hd	π	k
Sarda	44	2	3	0.566	0.00172	0.627
Cretese	33	3	3	0.408	0.00171	0.602
Cipriota	7	0	1	0.00	0.00	0.00
Totale	84	4	4	0.535	0.00195	0.665

Tabella 7. Stima della diversità genetica all'interno e tra le tre popolazioni di grifone studiate. N = numero di sequenze; S = numero di siti polimorfici; h = numero di aplotipi; Hd = diversità di aplotipo; π = diversità nucleotidica; k = numero medio di differenze nt.

La popolazione Sarda era composta da 66 sequenze (il 60,6% dell'intero campione analizzato) distribuite tra Hpt A (35), B (26) e C (5), con Hd = 0,566 e π = 0,00172. L'Hpt B è stato rilevato esclusivamente tra sequenze di grifoni Sardi, con una maggiore frequenza in campioni museali (58%). Le 36 sequenze Cretesi (il 33% dell'intero campione analizzato) sono state trovate distribuite tra Hpt A (27), C (7) e D (2), quest'ultima rilevata esclusivamente in campioni di grifoni Cretesi attuali, con Hd = 0,408 e π = 0,00171 (Tab. 7). Non sono state riscontrate differenze all'interno della popolazione

Cipriota che era composta da 7 sequenze, tutte mostravano l'Hpt A. Un'analisi AMOVA, eseguita con ciascuna area, ha prodotto un FST di 0,24 (valore p = 0,000) tra le popolazioni insulari (Tabella 8). Oltre alla divergenza tra gli aplotipi, il calcolo delle distanze genetiche a coppie tra i gruppi sotto il modello K2P ha mostrato una variazione uniforme tra i siti (Tabella 9). Il livello più alto di diversità genetica è stato osservato tra gli Hpt B e D ($0,01502 \pm 0,01041$), che sono stati trovati esclusivamente nelle popolazioni Sarde e Cretesi, seguiti dalla distanza tra Hpt A e D ($0,01054 \pm 0,00766$). Hpt-C ha mostrato la stessa distanza dagli Hpt B e D ($0,00659 \pm 0,00555$) mentre è stata rilevata la più bassa divergenza confrontando l'Hpt-A con gli Hpt B e C ($0,0031 \pm 0,003$).

Fonte di Variazione	d.f.	Somma dei quadrati	Componenti della varianza	Percentuale di variazione	p-value
Among populations	2	286.936	4.56408 Va	24.48	<0.001
Within populations	106	1492.770	14.08274 Vb	75.52	<0.001
Total	108	1779.706	18.64682		
Fixation index	FST	0.24476			

Tabella 8. Risultati Amova con FST.

	Hpt-A	Hpt-C	Hpt-D	Hpt-B
Hpt-A		0,00338	0,00766	0,00349
Hpt-C	0,00309		0,00551	0,00555
Hpt-D	0,01054	0,00659		0,01041
Hpt-B	0,00309	0,00659	0,01502	

Tabella 9. Distanze genetiche a coppie tra gli aplotipi calcolati secondo il modello K2P di sostituzione nucleotidica.

Analisi fenogenetica e datazione molecolare

L'analisi dell'albero bayesiano supportata da un alto valore di probabilità posteriore per ciascun nodo ($PP \geq 93$) è mostrato nella Figura 27. Sono stati identificati quattro diversi lignaggi materni tra l'intero set di dati di cui 109 sequenze di avvoltoio grifone. I cladi emersi da questi lignaggi corrispondono agli aplotipi del mtDNA riportati sopra. Pur risultando in clustering simile, i valori di bootstrap ML e MP hanno offerto un supporto più debole rispetto al PP dell'albero BI ai nodi che identificano i gruppi principali recuperati. L'analisi della rete IntNJ ha recuperato quattro cluster principali tra le tre popolazioni di *G. fulvus* analizzate nel presente studio (Hpt A, B, C e D in Figura 28).

Hpt-A ha mostrato la più alta frequenza sia nell'intero dataset che all'interno di ogni singola popolazione, e differiva per un solo polimorfismo da Hpt B e C. Hpt-D è risultato essere il più raro e risultato strettamente correlato a Hpt-C da cui differiva per due sostituzioni nucleotidiche. Gli Hpt B e D sono stati rilevati, rispettivamente, nelle popolazioni Sarde e Cretesi. Sulla base della nostra

datazione molecolare, il nuovo aplotipo Hpt-D qui riportato divergeva da Hpt-C di 14.000 anni (valori mediani). Gli eventi di splitting che hanno dato origine agli aplotipi rimanenti descritti erano in accordo con quanto riportato da Mereu et al. (2017).

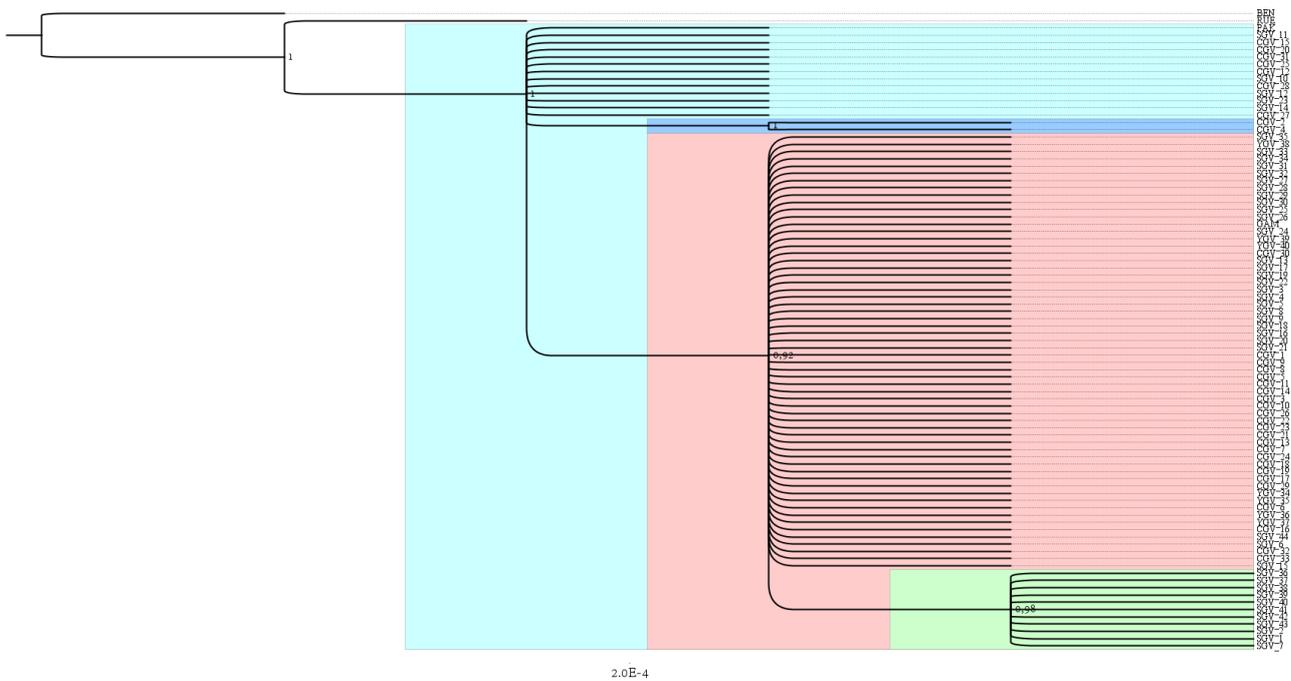


Figura 27. Albero bayesiano con radici, Verde: Hpt-B (esclusivo della popolazione Sarda); Rosso: Hpt-A; Blu: Hpt-D (nuovo aplotipo trovato esclusivamente nella popolazione di Creta); Celeste: Hpt-C.

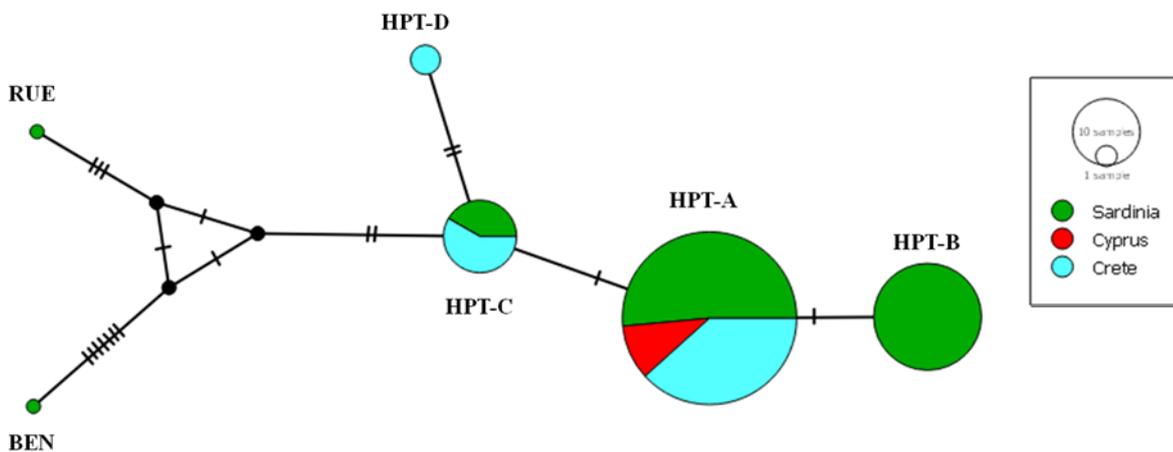


Figura 28. Albero filogenetici creato mediante il metodo di raggruppamento Neighbor Joining.

4.4 Discussione

Flusso di geni tra le popolazioni di grifoni

Data la difficoltà della specie nel sorvolare le masse marine, ci si aspetterebbe di rilevare una limitata diversità genetica all'interno delle tre popolazioni di isole del Mediterraneo analizzate. Questo per via del ridotto o assente flusso di individui tra le popolazioni dell'isola con quelle della terraferma. Contrariamente a quanto ci si aspettava, a livello evolutivo, l'analisi filogenetica delle sequenze di regioni di controllo ha rivelato l'esistenza di diversi lignaggi evolutivi. Sia la popolazione di Creta che quella di Sardegna hanno mostrato una variabilità aplotipica piuttosto pronunciata. La presenza di un solo aplotipo (Hpt-A) nella popolazione di Cipro potrebbe essere determinata al basso numero ($n=7$) di campioni raccolti, che costituiscono, quasi tutta la popolazione dell'ultimo decennio. I nostri risultati suggeriscono che le isole di Creta e della Sardegna potrebbero rappresentare riserve di diversità genetica in cui, oltre agli aplotipi più comuni rilevati finora, sono presenti varianti genetiche non ancora descritte delle due isole, come Hpt-B in Sardegna e Hpt-D a Creta. Il flusso genetico su linea materna tra queste popolazioni sembrava essere basso, $F_{ST} = 0,24$, ed i valori di F_{ST} maggiori o uguali a $0,25$, indicando un alto livello di differenziazione genetica tra popolazioni a causa di un basso flusso genico (Hard and Clark, 1997).

Sulla base di questa evidenza, possiamo supporre che queste due popolazioni siano rimaste isolate per un lungo periodo durante il quale potrebbero aver accumulato una buona variabilità genetica mentre la popolazione Cipriota sembra derivare da una più recente introduzione di individui portatori dell'Hpt-A. La diversa espressività dei quattro aplotipi del mtDNA tra le tre popolazioni analizzate nel presente studio potrebbe essere spiegata ipotizzando che la colonizzazione delle isole sia avvenuta in tempi diversi. In tale contesto, ogni ondata di nuovi individui avrebbe potuto sostituire o contribuire ad arricchire il pool genico preesistente. Molto probabilmente, una combinazione di queste due possibilità ha determinato la variabilità genetica attualmente presente nelle popolazioni di *G. fulvus* che vivono nelle isole del Mediterraneo. Generalmente si presume che la presenza di specie su un'isola, così come il numero di aplogruppi / aplotipi al loro interno, sia il risultato di introduzioni da parte dell'uomo e / o la conseguenza di eventi naturali quali immigrazione, emigrazione, estinzione. Grazie alla capacità di sorvolare vaste distese d'acqua, gli uccelli di solito hanno una maggiore possibilità di colonizzare nuovi habitat e isole rispetto ai mammiferi. Tuttavia gli avvoltoi, a differenza della maggior parte degli uccelli, sono caratterizzati da uno stile di volo che non è ottimale per lunghi attraversamenti marini (Agostini et al., 2005, Bildstein, 2006).

La colonizzazione dell'isola da parte dei grifoni potrebbe anche dipendere da due modi dinamici di interazione con la terraferma. Sebbene il grifone per lungo tempo sia stato considerato come un uccello sedentario, le tecnologie di localizzazione hanno rivelato che i giovani mostrano una dispersione nativa molto elevata, questi soggetti abbandonano gli habitat di riproduzione durante il loro primo autunno di vita (Griesinger, 1998, Donázar, 1993, Sušić, 2000). I giovani avvoltoi, inesperti nei primi mesi dopo l'involo, presentano prestazioni inferiori di volo e minore capacità di sfruttare le termiche se confrontati con gli animali adulti (Harel et al., 2016). È stato osservato che, tra i grifoni, questa grande differenza è legata alla scelta delle termiche e alla capacità di stare al centro di esse. Infatti nel volo veleggiato, la capacità di stare all'interno della termica richiede abilità avanzate (Harel et al., 2016). Questa minore capacità potrebbe suggerire che i giovani compiano scelte meno adatte ma con un alto potenziale di dispersione in modo da colonizzare nuovi ecosistemi. I giovani potrebbero adottare una particolare strategia di attraversamento del mare, si portano ad una altitudine molto elevata, e vedendo in lontananza la terra ferma, possono poi sfruttare un gliding più lungo in modo da raggiungere la costa opposta senza battere le ali (Pennycuik and Scholey, 1984). La possibilità di raggiungere elevate altitudini negli uccelli, a differenza dei mammiferi, non

rappresenta un ostacolo poiché, grazie alla presenza dei sacchi aerei, ossa pneumatiche e scambio in controcorrente tra ossigeno e sangue, possono avere una buona disponibilità di ossigeno ad elevate quote. Un secondo modo di interazione tra isole e terraferma viene suggerito dall'evento verificatosi in Spagna nel 2008, quando una tempesta ha spostato un gruppo di grifoni dalla terraferma all'isola di Maiorca, circa 170 km dalla costa Iberica (Camiña et al., 2015). Ad oggi, Maiorca ospita una colonia di grifoni con una popolazione che mostra un'eccellente adattabilità alle condizioni ambientali dell'isola.

Storia della colonizzazione delle isole del Mediterraneo

I fattori climatici e geografici dovrebbero essere presi in considerazione per spiegare il modello filogeografico osservato in questa specie nelle isole del Mediterraneo. All'inizio della colonizzazione si poteva supporre che gli individui pionieri non avessero informazioni sociali disponibili e quindi seguivano solo segnali esterni derivanti dalle strutture dell'habitat come siti di nidificazione e disponibilità di cibo (Danchin et al., 2001). I siti di nidificazione dei grifoni hanno bisogno di pareti ripide, caratterizzate da formazioni rocciose con un'alta suscettibilità all'erosione dell'acqua che determinano un'improvvisa discontinuità nel paesaggio dando origine ad un habitat non accessibile alle attività umane (Xirouchakis and Mylonas, 2005). Questo habitat è ben adatto per il grifone ed è utilizzato dal 44% dei rapaci diurni presenti in Europa (Mateo-Tomás and Olea, 2011). Le pareti rocciose incoraggiano il decollo dei grifoni dal nido e forniscono le migliori condizioni per il volo, sia per la presenza delle correnti ascensionali di aria termica, che per il sollevamento orografico dell'aria quando incontragli ostacoli (Pennycuick, 2008). La disponibilità di cibo rappresenta un altro elemento fondamentale per mantenere la colonia di grifoni in un'isola (van Beest et al., 2008). Parra and Tellería (2004) hanno descritto una relazione tra la grande disponibilità di cibo e l'abbondante presenza di grifoni nel territorio. Allo stesso modo, la disponibilità di cibo è stata considerata una condizione molto importante per la crescita della popolazione nel corso del tempo da parte di Donázar and Fernández (1990).

In passato, il cibo di base del grifone era rappresentato da grandi specie selvatiche che popolavano le isole. In seguito all'estinzione verificatasi subito dopo l'ultima glaciazione, il cibo di base del grifone ha subito un cambiamento. Infatti nel Neolitico, arrivarono nelle isole del Mediterraneo le prime specie domestiche rappresentate da bovini, maiali, capre e pecore, trasportate dai primi coloni dalla Mezzaluna Fertile attraverso il Mar Mediterraneo (Zeder, 2008, Levine, 1983). E' probabile che l'arrivo del grifone abbia seguito il trasporto degli animali addomesticati, capre e pecore, verso le isole del Mediterraneo. Entrambe le specie vengono allevate mediante un sistema di tipo estensivo e da sempre costituiscono la principale fonte alimentare di grifoni nell'area mediterranea (Xirouchakis and Mylonas, 2005, Schenk et al., 2007). Nel presente studio Hpt-A è stato trovato in tutte le popolazioni delle isole studiate e, pertanto, è probabilmente l'aplotipo più comune e diffuso tra i grifoni europei. Questo aplotipo è stato anche rilevato in una delle due sequenze recuperate da GenBank e appartenente ad un grifone proveniente dal Gambia, ciò implica una prevalenza dell'Hpt-A nel bacino del Mediterraneo. L'altra sequenza su GenBank è stata ottenuta da un individuo proveniente dal Pakistan, questa conteneva l'Hpt-C, anch'esso presente in Sardegna, con basse frequenze, e a Creta dove mostrava una frequenza più alta. In base a questo risultato, possiamo supporre che l'Hpt-C sia più diffuso nelle aree del Vicino Oriente mentre la sua frequenza diminuisce gradualmente verso l'Europa occidentale. La presenza di aplotipi di mtDNA esclusivi sia nelle popolazioni di grifoni Sardi (Hpt-B) che Cretesi (Hpt-D) suggerisce che è presente una percentuale

di dispersione limitata tra le popolazioni di grifone dell'isola e del continentale, probabilmente dovuto al loro stile di volo (Pennycuick, 2008). Un'ulteriore conferma è fornita da studi precedentemente condotti su popolazioni continentali della regione mediterranea (Spagna, Francia, Israele e Croazia) dove sono state osservate basse strutture genetiche e alti scambi tra popolazioni (Le Gouar et al., 2008). Nel presente studio abbiamo osservato una diversità genetica superiore rispetto alle loro controparti continentali.

4.5 Conclusioni

In conclusione, i nostri dati hanno mostrato che le popolazioni isolate qui analizzate hanno mostrato un buon livello di variabilità genetica, come confermato dall'individuazione di quattro aplotipi. Gli aplotipi insulari provengono nella maggior parte dei casi dalla vicina terraferma e occasionalmente gli stessi lignaggi ritornano e ricolonizzano la terraferma, fornendo uno scambio di HTP e migliorando la biodiversità sia sul continente che nelle isole (James et al., 2016). Data la grande somiglianza tra gli ecosistemi delle isole del Mediterraneo, potremmo aspettarci che il grifone proveniente dalla terraferma abbia un'alta adattabilità ai requisiti ambientali e alle nicchie ecologiche delle isole. I risultati del successo riproduttivo in entrambe le isole di Creta (Xirouchakis, 2010) e Sardegna (il nostro monitoraggio personale) in termini di pulli/ coppie di riproduttori / anno sono stati abbastanza simili ai tassi di Spagna e Francia. L'attuale condizione della popolazione del grifone appare relativamente fragile, in particolare per le isole della Sardegna e di Cipro nelle quali si trova in "grave pericolo di estinzione", ma anche a Creta dove la specie è considerata "vulnerabile". Sulla base di quanto appena evidenziato, le popolazioni isolate passeranno progressivamente da polifiletiche a parafiletiche e infine monofiletiche (Avice, 2001). La perdita di variazione genetica della piccola popolazione può ridurre la fitness e limitare la capacità di rispondere alle mutevoli sfide ambientali. Per evitare il rischio di estinzione della popolazione, è necessario valutare in anticipo le possibili azioni di ripristino, mantenendo, se possibile, l'introduzione di grifoni geneticamente simili a quelli osservati nelle isole del Mediterraneo.

5. Esperimento 4: Caratteristiche strutturali delle sezioni trasversali delle ossa dell'ala nel grifone come predizione dello stile di volo.

5.1 Scopo

La classe Aves ha sviluppato una serie di cambiamenti fisiologici ed anatomici che gli hanno consentito di volare, adattamenti dei sistemi respiratori, circolatori, sviluppo di piume ed ali aerodinamiche, ossa forti e leggere, forti muscoli pettorali. Il risultato di questa evoluzione ossea negli uccelli volanti, ha creato una struttura sufficientemente forte e rigida per resistere alle forze espresse durante il decollo, il volo e l'atterraggio, con una riduzione del peso (Proctor and Lynch, 1993, Clark, 1979).

Il volo può avvenire in diversi modi correlati alle dimensioni dell'animale e sviluppati in relazione ad una specifica biologia, il volo può essere descritto come veleggiato (statico e dinamico), battente e ronzato (colibrì). E' un sistema di locomozione ad alto fabbisogno energetico con forti pressioni selettive sulle ossa delle ali, la selezione spinge all'ottenimento di un elevato rapporto tra portanza / peso (Sullivan et al., 2017). Le correlazioni trovate tra la forma dell'ala e la sua funzione in termini di tipologia di volo, indicando che la morfologia delle ali è soggetta a pressioni selettive associate a migliori prestazioni aerodinamiche (Rayner, 1988). Negli uccelli, ogni osso appare adattato strutturalmente a particolari sollecitazioni fisiche e le forze generate durante il volo variano in relazione allo stile di volo, producendo schemi di carico specifici che richiedono un diverso adattamento strutturale delle ossa delle ali (Chin et al., 2017)

Precedenti studi hanno analizzato le caratteristiche morfologiche delle ossa per comprendere i loro schemi di carico in relazione allo stile di volo. Con un diametro più grande e pareti corticali più sottili rispetto ad altri vertebrati le ossa dei volatili offrono una maggiore resistenza alla flessione e alla torsione per unità di peso (Lindhe Norberg, 2002). Le proprietà strutturali più utilizzate in termini di valutazione della rigidità/forza delle ossa includono:

- L'area corticale (CA), questa misura rappresenta la quantità di osso corticale in una sezione trasversale, è un indicatore della forza di resistenza o di rigidità della diafisi di un osso lungo sotto puri carichi assiali.
- Il secondi momenti dell'area corticale sono delle proprietà che misurano l'efficienza, di una determinata forma, nel resistere alle forze di curvatura (forze flettenti). I secondi momenti includono il massimo e minimo secondo momento dell'area corticale (I_{max} e I_{min}).
- Il momento polare dell'area corticale (J) è dato dalla somma di $I_{max} + I_{min}$ e misura la forza di resistenza ai carichi di torsione, mentre il rapporto tra il secondo momento massimo e minimo dell'area (I_{max}/I_{min}) è un indice di forma usato per quantificare la forma della diafisi. Quando l'indice di forma è uguale a 1 la sezione dell'osso al livello considerato è circolare. Più l'indice di forma è grande più la sezione dell'osso è ellittica (Carlson et al., 2006, Demes et al., 1991, Ruff, 2002, Jungers and Minns, 1979, Ruff and Hayes, 1983).

Gli scheletri di uccelli devono essere leggeri per minimizzare il costo metabolico del volo, allo stesso tempo forti e rigidi per resistere alle forze esercitate in volo (Dumont, 2010). La densità ossea riflette il contenuto di minerali e, insieme alla forma e allo spessore dell'osso, è correlata con la rigidità e la resistenza dell'osso (Currey, 2002). Le ossa delle ali sono formate da una parete corticale densa ed una cavità midollare fornita di scarse strutture di sostegno (trabecole e creste) che conferiscono resistenza alle deformazioni (Pennycuick, 2008, Proctor and Lynch, 1993). Ciò suggerisce che l'aumento della rigidità e della forza per unità di massa del tessuto osseo è uno dei modi in cui gli scheletri si sono evoluti acquisendo leggerezza. La densità delle ossa delle ali dipende dalle forze a cui sono sottoposte, ad esempio, le ossa degli uccelli volatori sono in genere meno dense di quelle degli uccelli non volatori e pescatori, nei quali le pareti più spesse possono servire come rinforzo o zavorra (Currey and Alexander, 1985, Dumont, 2010, Evans and Heiser, 2004, Habib and Ruff, 2008). Lo stress biomeccanico influisce anche sulla microstruttura ossea, gli osteoni primari infatti si depositano intorno ai canali vascolari secondo un orientamento spaziale (longitudinale, radiale, circolare e obliqua) anche in relazione allo spessore corticale, alla forma della sezione trasversale, all'orientamento delle fibre collagene ed in relazione al tipo di forze di carico applicate all'osso (de Margerie, 2002, de Margerie et al., 2005, Enlow and Brown, 1957, Simons and O'Connor, 2012, Skedros and Hunt, 2004, de Ricqlés et al., 1991).

Nel volo statico, caratteristico dell'avvoltoio grifone, l'ala può essere divisa anatomicamente in tre parti, una parte prossimale, il brachium, una parte centrale denominata antebrachium e una parte distale, la manus. L'omero è l'osso del brachium ed è l'osso più grande e forte dell'ala degli avvoltoi. L'antebrachium, costituito dal radio e dall'ulna, è il segmento più lungo dell'ala. L'osso più corto nell'ala è la CMC, che costituisce la principale struttura scheletrica della manus (Figura 29).



Figura 29. L'immagine mostra i tipi di ossa utilizzate, in questa specie l'ulna e il radio mostrano una lunghezza maggiore dell'omero. Dall'alto verso il basso CMC, radio, ulna ed omero. Sono ben evidenti le papille ulnari (piccole escrescenze dove sono attaccate le penne remiganti).

Nel grifone, il diverso angolo di inserzione delle remiganti tra antebrachium e manus può portare a carichi primari diversi sulle ossa delle ali. Nell'ulna, dove le remiganti secondarie sono inserite perpendicolarmente rispetto l'asse lungo dell'osso, prevalgono i carichi torsionali, mentre nel CMC, dove le remiganti primarie sono inserite in maniera obliqua rispetto all'asse maggiore dell'osso, i carichi flettenti diventano prevalenti rispetto a quelli torsionali. Il radio sperimenta primariamente le forze di trazione e, giacendo parallelamente all'ulna, rafforza la resistenza del segmento antebrachium alla flessione (Norberg, 1990). In volo, poiché l'ulna assume una posizione perpendicolare rispetto all'omero ed è priva della possibilità di ruotare su e giù, i momenti flettenti applicati al segmento distale dell'ala vengono trasferiti all'omero come momenti torsionali (Pennycuick, 2008). In questo esperimento abbiamo analizzato gli aspetti macro e micro strutturali delle ossa dell'ala del grifone per valutare la presenza di adattamenti anatomo-fisiologici in reazione alle differenti sollecitazioni meccaniche dei tre segmenti dell'ala. In particolare abbiamo valutato le possibili differenze presenti nelle caratteristiche microstrutturali della parete corticale (LI), tra le proprietà biomeccaniche delle sezioni trasversali (I_{max}/I_{min} , CA/TA e J/L) e nella densità minerale tra omero, radio, ulna e CMC, ipotizzando che in questo veleggiatore statico, le quattro ossa delle ali possano mostrare delle differenze al fine di rispondere al meglio alle sollecitazioni fisiche, di torsione e di flessione. I carichi saranno prevalentemente torsionali nella parte prossimale e centrale dell'ala e diventano flettenti nella regione distale dell'ala.

5.2 Materiali e metodi

Raccolta materiale

In questo studio, abbiamo campionato quattro ossa lunghe dell'ala (Figura 30) di otto grifoni raccolti dal Dipartimento di Medicina Veterinaria del Università di Sassari e dal centro di riabilitazione della fauna selvatica (Bonassai, Agenzia Regionale Fo.Re.Stas). L'età di questi animali è stata stimata combinando differenti caratteristiche come il colore del becco, il colore degli occhi, la forma e il colore delle penne, del piumaggio collo e delle copritrici delle ali, classificandoli in tre categorie: giovani (3), subadulti (2) e adulti (3). Tutti gli animali giovani avevano superato il periodo pre-involo e avevano almeno un mese di esperienza di volo. Sebbene il campione fosse di dimensioni ridotte, è stato eseguito il testo one-way ANOVA on rank per determinare se l'età influiva nei risultati.

Il nostro studio si è concentrato sull'analisi della regione centrale della diafisi, al fine di evitare effetti localizzati di inserzioni tendinee e legamentose sull'osso, e perché lo stress massimo associato al volo si verifica proprio nella regione centrale (Beer et al., 2006). Seguendo Nawrocki (1997), le quattro ossa principali delle ali sono state isolate da ciascun grifone, pulite accuratamente con strumenti da dissezione rimuovendo cute, piume, fasci di tendini, muscoli e legamenti, quindi immersi in soluzione acquosa contenente enzimi attivi e borace a 75 a 80 ° C per un'ora. Le ossa sono state successivamente pulite dai tessuti molli mediante raschiamento con spatole in legno e quindi disidratate per 24 ore in un forno. Prima di effettuare le analisi sono state misurate lunghezza (L) e massa (M) di ogni osso (calibro digitale Mitutoyo® IP67, bilancia elettronica Kern & Sohn® EMB 600-2) (Tabella 10)

	L (cm)		M (gr)	
	media	dev.st	media	dev.st
Omero	25,87	0,93	41,07	5,25
Ulna	32,54	1,34	30,50	4,42
Radio	30,96	1,10	13,67	3,03
CMC	13,71	0,34	9,63	0,89

Tabella 10. Media e deviazione standard di lunghezza (L) e massa (M) delle quattro ossa

analizzate.

Densitometria

Per ogni osso, il 5% della lunghezza totale (L) è stato scansionato, al centro della diafisi, con assorbimetria a raggi X a doppia energia (DXA) per misurare il contenuto di minerale (BMC) nella Unità di Geriatria e Malattie del Metabolismo osseo dell'ospedale "Molinette" (Torino, Italia). Ogni campione è stato posizionato nello scanner DXA con l'asse lungo parallelo al letto dello scanner, dopo aver identificato il punto centrale, i limiti superiore e inferiore della finestra di scansione sono stati calcolati come 2,5% della lunghezza dell'osso sopra e sotto quel punto.

Oltre alla sua utilità in ambito clinico, la DXA è una tecnica bidimensionale che misura la densità minerale ossea per area scansionata (mg/cm^2). Sebbene le sezioni ossee analizzate fossero cilindri cavi con un raggio non costante, l'area ottenuta dalla proiezione ossea su un piano usato per calcolare la densità minerale ossea (BMD) era bidimensionale (cm^2). Questo tipo di proiezione può variare a seconda di come l'osso viene posizionato sul letto dello scanner, il che può portare a interpretazioni errate della BMD, specialmente se l'osso ha una forma ellittica. Allo stesso modo, considerando che le sezioni trasversali dell'osso non hanno una corticale con spessore costante, possono dare origine a variazioni nella BMD espresse in cm^2 , anche se l'area di proiezione è la stessa. Per evitare questi problemi, la densità vera è stata calcolata in funzione del contenuto minerale osseo per volume di osso, definito come BMD volumetrico (mg/cm^3 , Baroncelli et al. (1998)). Il volume di ciascuna diafisi scansionata è stato calcolato moltiplicando l'area corticale (CA, vedi sotto) per la lunghezza utilizzata nelle finestre di scansione a DXA ($5\% * L$).

Analisi delle sezioni trasversali

Sono state utilizzate due matite colorate per marcare la regione centrale di ciascun osso al fine di identificare i quadranti (dorsale, craniale, ventrale e caudale) dopo il taglio. Per mezzo di una smerigliatrice angolare Telefunken® e un disco Inox Dexter® con spessore di 0,8 mm (Fig. 26) è stata ricavata una sezione trasversale di 1-2 mm di spessore da ogni diafisi ossea.



Figura 30. Ossa dell'ala destra dopo il campionamento della regione centrale delle diafisi.

Le sezioni di diafisi sono state appiattite e fotografate con una fotocamera digitale Canon D650, le immagini ottenute sono state importate in ImageJ (versione 1.5p) per quantificare le proprietà geometriche trasversali utilizzando il plug-in BoneJ 1.4.2 (Figura 31; Schneider et al. (2012), Doube et al. (2010)). I secondi massimi (I_{max}) e minimi (I_{min}) di inerzia, l'area subperiostale totale (TA) e l'area ossea corticale (CA) sono stati ricavati per ciascun campione. I secondi momenti dell'area (I) e il momento polare dell'inerzia (J) sono stati quindi calcolati per estrapolare le proprietà meccaniche. Il rapporto tra il secondo momento dell'area corticale nella direzione massima (I_{max}) e il secondo momento dell'area nella direzione minima (I_{min}) è stato utilizzato per quantificare la forma della sezione trasversale, in particolare la tendenza o meno ad essere circolare o ellittica. La forma della sezione trasversale determina la capacità di un dato osso di sopportare determinate sollecitazioni, si ritiene che una sezione trasversale ellittica abbia maggiore capacità di reggere carichi di flessione lungo una direzione specifica (I_{max}) (Simons et al., 2011, Marelli and Simons, 2014).

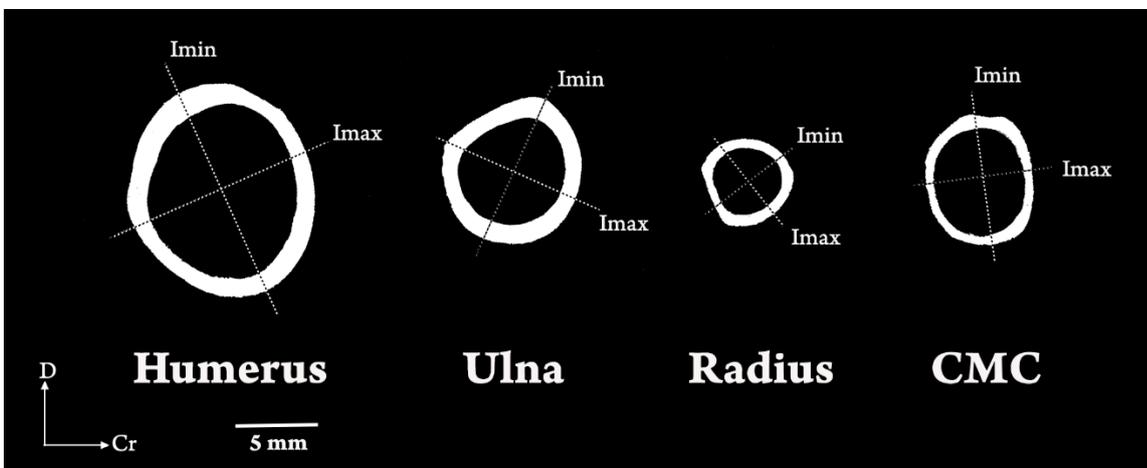


Figura 31. Risultati dei campioni elaborati con image J 1.5p. Le sezioni sono state ricavate dalla porzione centrale di omero, ulna, radio e CMC: il massimo (I_{max}) e il minimo (I_{min}) secondo momento dell'area rappresentano gli "assi" principali della rigidità alla flessione, attraverso i quali le distribuzioni della massa sono rispettivamente la più grande e la più piccola. D indica la direzione dorsale; Cr indica la direzione craniale.

Indice di laminarità

Gli anelli ossei sono stati accuratamente assottigliati con carta abrasiva (IQ2® a granulometria 80 e 180) fino a ridurli a uno spessore di circa 50 µm. Sebbene la tecnica manuale richieda più tempo di altre tecniche, è ancora un metodo adatto per ottenere un'adeguata trasparenza delle sezioni per le osservazioni microscopiche (Locke, 2004). Le sezioni erano coperte con Eukitt® (Merck, Darmstadt, Germania). Le diapositive sono state numerate e digitalizzate utilizzando PixeLINK® Capture (versione 7.12) con la fotocamera Pixelink® PL-B686 montata su un microscopio Zeiss AxioPhot® (microscopio Zeiss, Jena, Germania). L'orientazione degli osteoni primari è stata stimata sulla base della rete vascolare (de Margerie, 2002). I canali vascolari sono stati classificati per l'intera sezione ossea in quattro categorie come mostrato in Figura 32: circolare (C), quando è parallelo ($0 \pm 22,5^\circ$) alla superficie ossea della sezione; longitudinale (L), corre parallelo all'asse lungo dell'osso e quindi appare come un punto rotondo nella sezione; radiale (R), che corre perpendicolare ($90 \pm 22,5^\circ$); e obliquo (O), con un angolo di $45^\circ \pm 22,5^\circ$ rispetto alla superficie dell'osso. I canali circolari, radiali e obliqui che presentano un rapporto lunghezza / larghezza > 3 sono stati considerati giacenti sul piano di sezione, altrimenti classificati come canali longitudinali (de Margerie, 2002, de Ricqlès et al., 1991).

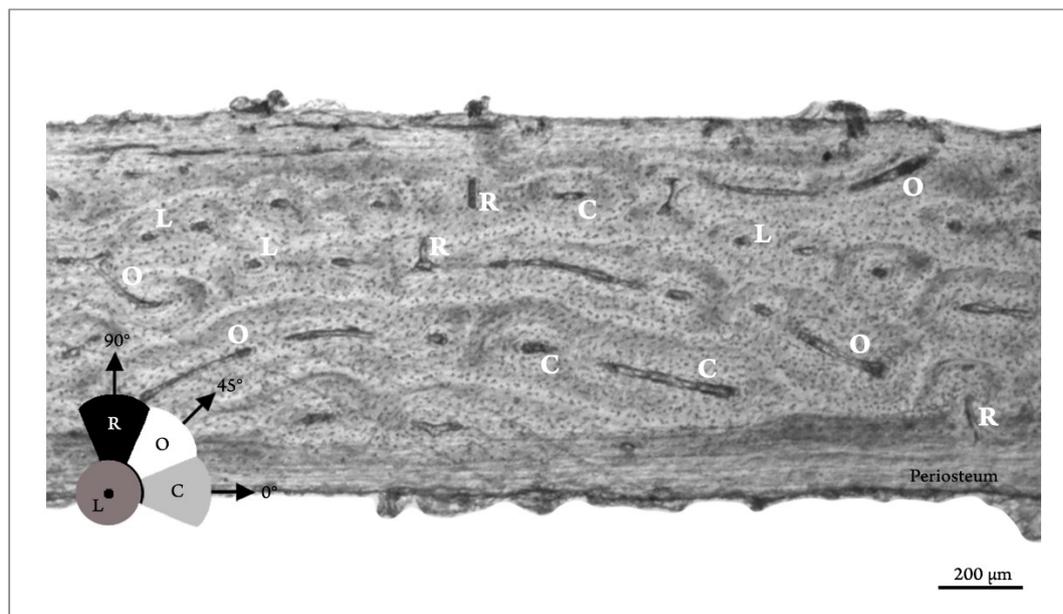


Figura 32. Esempi di canali vascolari in una sezione di CMC nel grifone: i canali possono essere orientati in senso longitudinali (L), circolari (C), radiali (R) o obliqui (O).

L'indice di laminarità (LI) è stato ottenuto per ciascuna sezione ossea secondo l'equazione $LI = \text{numero di canali circolari} / \text{numero totale dei canali}$. Tutti i valori di LI, I_{max}/I_{min} , CA/TA e J/L ottenuti per omero, ulna, radio e CMC sono stati trasformati in arcoseno, quindi valutati statisticamente utilizzando l'analisi della varianza di Kruskal-Wallis, seguita dal confronto a coppie con il Mann-Whitney post-hoc test, il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0,05$.

	Imax/Imin		J/L (*10 ²)		CA/TA		5%L Vol. (cm ³)		BMC (gr)		BMD (gr/cm ³)	
	media	dev.st.	media	dev.st.	media	dev.st.	media	dev.st.	media	dev.st.	media	dev.st.
Omero	1,376	0,095	1,858	0,267	0,339	0,042	1,010	0,140	2,515	0,521	2,530	0,510
Ulna	1,229	0,041	0,532	0,116	0,377	0,088	0,842	0,133	1,910	0,506	2,240	0,269
Radio	1,360	0,084	0,126	0,054	0,414	0,046	0,382	0,088	0,844	0,171	2,465	0,503
CMC	1,580	0,151	0,579	0,132	0,354	0,049	0,221	0,034	0,389	0,127	1,661	0,494

Tabella 11. Media e deviazione standard di Imax/Imin, momento polare dell'area (J/L), area corticale relativa (CA/TA), volume della diafisi scansionato mediante DXA, contenuto minerale osseo (BMC) e densità minerale ossea volumetrica (BMD) delle quattro ossa principali degli arti anteriori nell'avvoltoio Grifone.

5.3 Risultati

Densitometria

Il test di Kruskal-Wallis ha rivelato differenze significative nella distribuzione della densità minerale ossea (BMD) tra le quattro ossa ($H = 8,38$; d.f. = 3; $P = 0,039$). L'analisi post-hoc (M-W test) ha rivelato differenze tra omero vs. CMC ($P = 0,02$) e ulna vs CMC ($P = 0,045$). Mentre non sono emerse differenze significative tra le altre comparazioni, omero rispetto all'ulna ($P = 0,37$), omero rispetto al raggio ($P = 0,92$), ulna vs raggio ($P = 0,31$), e raggio vs CMC ($P = 0,55$; Figura 33).

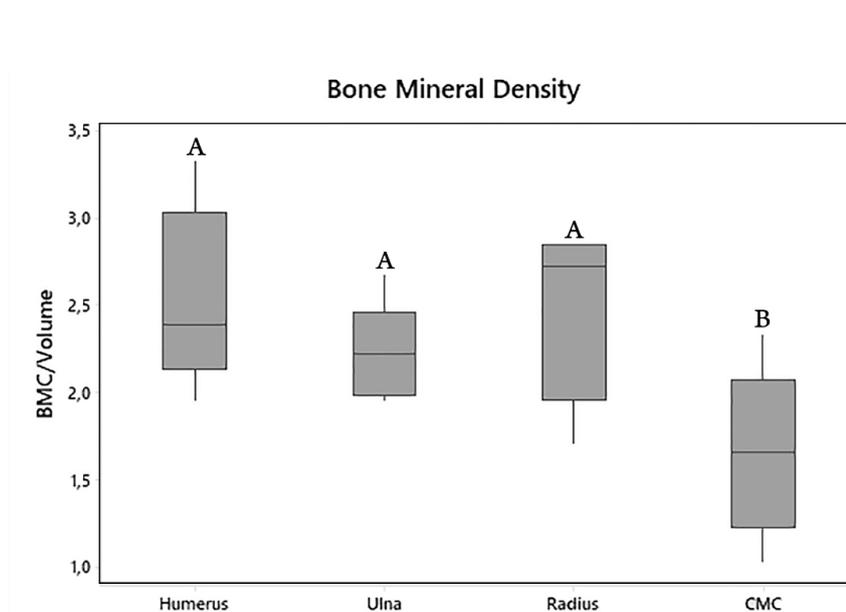


Figura 33. Risultati della BMD volumetrica (g / cm^3) in omero, ulna, radio e CMC. Differenze statisticamente significative sono state osservate tra CMC vs omero e CMC vs ulna.

Analisi delle proprietà geometriche della diafisi

Il test di Kruskal-Wallis ha mostrato differenze tra le quattro ossa dell'ala ($H = 17.29$; d.f. = 3; $P < 0.05$). Le analisi post-hoc mediante il test di Mann-Whitney hanno esibito differenze significative in ulna vs CMC ($P < 0,004$), ulna vs radio ($P < 0,008$), radio vs CMC ($P < 0,02$); omero vs CMC ($P < 0,03$) e omero vs ulna ($P < 0,005$). Nessuna differenza nella forma della sezione trasversale è stata trovata confrontando l'omero con il radio ($P > 0.9999$; Figura 34).

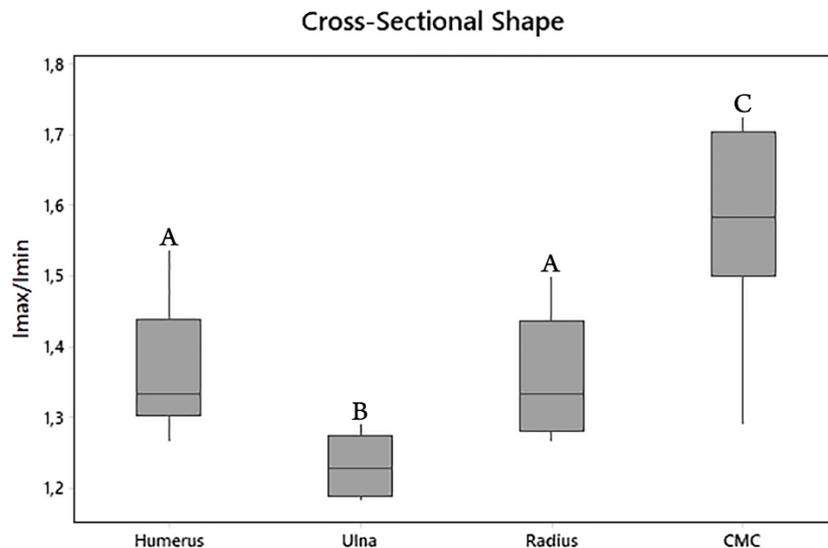


Figura 34. Variazioni del rapporto I_{max}/I_{min} nelle sezioni centrali di ulna, radio, omero e CMC. Il confronto della forma della sezione trasversale usando il test di Kruskal-Wallis ha mostrato differenze tra le ossa. CMC ha mostrato una forma più ellittica rispetto alle altre ossa. Le differenze di forma tra omero vs CMC e ulna vs omero erano anche queste statisticamente significative, così come quelle tra ulna vs CMC, ulna vs radio e radio vs CMC. Nessuna differenza è stata trovata tra l'omero e il radio.

L'analisi dei valori di J / L fra le quattro ossa indicava la presenza di una differenza statisticamente significativa (test di Kruskal-Wallis, $H = 22.90$; d.f. = 3; $P < 0.001$). I risultati del test di Mann-Whitney hanno mostrato valori significativamente più elevati nell'omero rispetto alle altre ossa ($P < 0,001$). Non sono state trovate differenze significative tra la CMC e l'ulna ($P = 0,6$), mentre il radio ha mostrato un momento polare standardizzato per la lunghezza significativamente più basso sia dell'ulna che della CMC ($P = 0,002$; Figura 35).

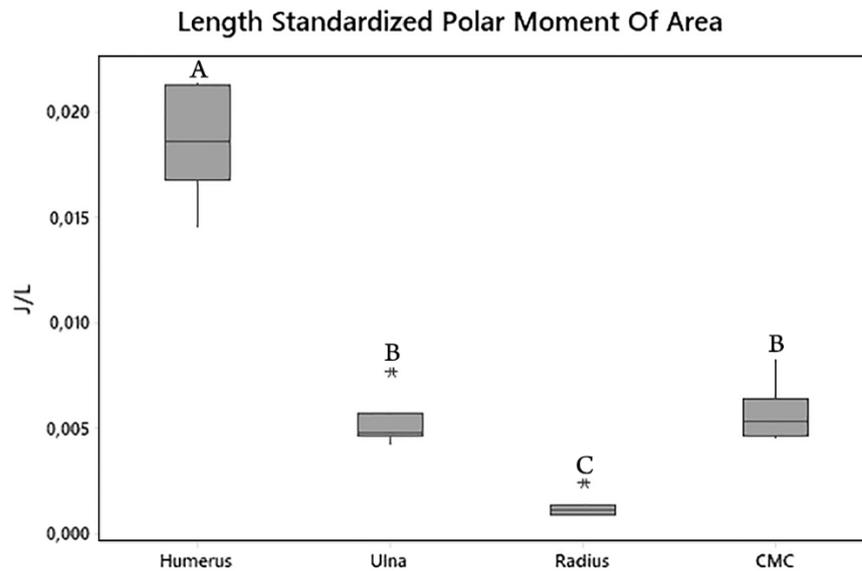


Figura 35. Variazioni del secondo momento polare dell'area standardizzato per la lunghezza. Differenze statistiche sono state trovate tra le ossa. Il confronto post-hoc ha evidenziato che l'omero ha valori più alti rispetto alle altre ossa, CMC ed ulna non hanno mostrato differenze, mentre il radio ha mostrato un momento polare significativamente più basso rispetto ai valori dell'ulna e della CMC. * rappresenta valori anomali.

Il rapporto CA/TA rappresenta la quantità di area ossea corticale rispetto alla superficie ossea totale e viene tipicamente utilizzato per valutare la resistenza a carichi assiali (di tensione o di compressione). Non sono state trovate differenze significative tra le quattro ossa (test K-W, $H = 6,32$; d.f. = 3; $P = 0,097$) (Figura 36).

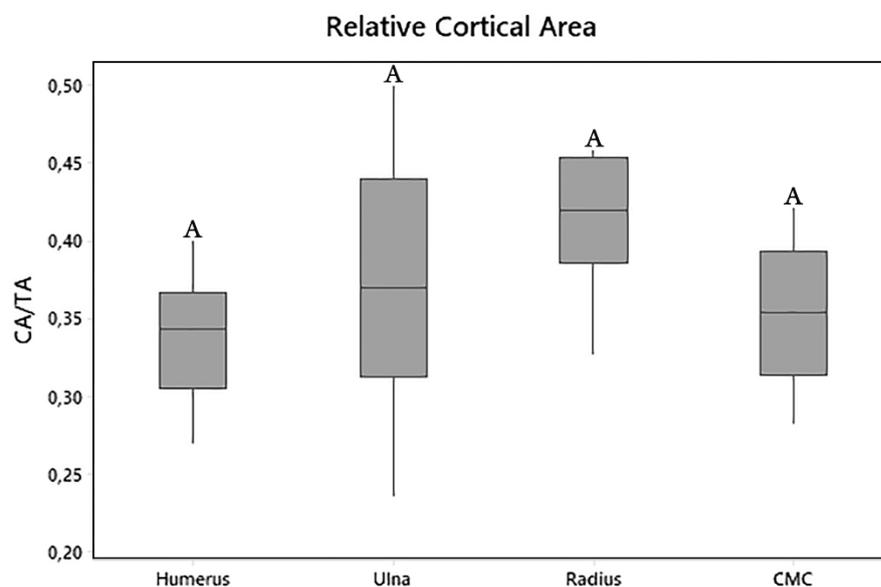


Figura 36. L'area occupata dall'osso corticale (CA/TA) nelle sezioni centrali delle ossa delle ali.

Indice della laminarità

I valori dell'indice di laminarità mostrati nella Tabella 12 sono stati calcolati come canali circolari in rapporto ai canali totali per l'intera sezione, i risultati sono stati trasformati in arcoseno per la normalità (Zar, 1999). Il test di Kruskal-Wallis ha rivelato una differenza significativa nella laminarità tra i quattro gruppi ($H = 18,54$; d.f. = 3; $P < 0,001$). L'analisi post-hoc ha mostrato differenze tra omero rispetto al radio ($P < 0,004$) e omero rispetto a CMC ($P < 0,002$). È stata inoltre riscontrata una differenza significativa tra ulna e CMC ($P < 0,006$), mentre non sono state osservate differenze significative comparando l'omero con l'ulna ($P = 0,052$), l'ulna con il radio ($P = 0,06$) o il radio con il CMC ($P = 0,12$) (Figura 37, Figura 38).

Indice di Laminarità		
	media	dev.st.
Omero	0,54	0,05
Ulna	0,49	0,04
Radio	0,44	0,05
CMC	0,39	0,06

Tabella 12. Media e deviazione standard dell'indice di laminarità nelle ossa esaminate.

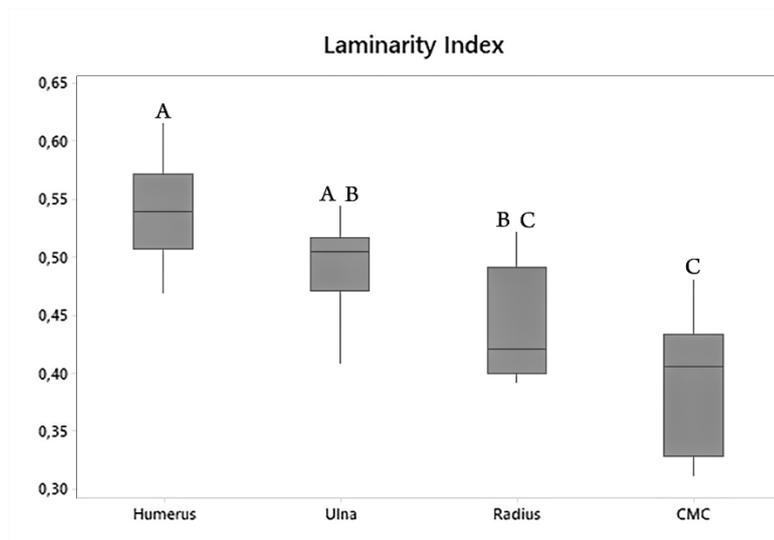


Figura 37. Box plot dell'indice di laminarità nelle diafisi ossee. Il test di Kruskal-Wallis ha rivelato una differenza significativa nella laminarità tra le quattro ossa ($P < 0,001$).

Sebbene il nostro obiettivo fosse quello di valutare eventuali differenze strutturali tra le ossa lunghe delle ali in relazione a diversi stress fisici, abbiamo eseguito un'analisi statistica delle caratteristiche biomeccaniche studiate delle tre classi di età. Le ossa di animali giovani sembravano ben formate senza apparenti differenze macroscopiche con quelle degli animali adulti. Nessuna differenza di peso,

lunghezza o spessore corticale è stata trovata confrontando le ossa per gruppi di età (i risultati del test K-W sono stati: peso: $H = 1,09$; $df = 2$; $P = 0,57$; lunghezza: $H = 2,05$; $df = 2$; $P = 0,35$; Spessore corticale: $H = 0,82$; $df = 2$; $P = 0,66$). Tra le classi di età e per tutti i parametri analizzati, il test di Kruskal-Wallis non ha mostrato differenze relativamente all'area corticale relativa ($H = 2,52$; $df = 2$; $P = 0,28$), momento polare dell'area ($H = 0,26$; $df = 2$; $P = 0,87$), forma della sezione trasversale ($H = 1,41$; $df = 2$; $P = 0,49$), indice di laminazione ($H = 1,78$; $df = 2$; $P = 0,41$), o volume minerale osseo ($H = 0,24$; $df = 2$; $P = 0,88$).

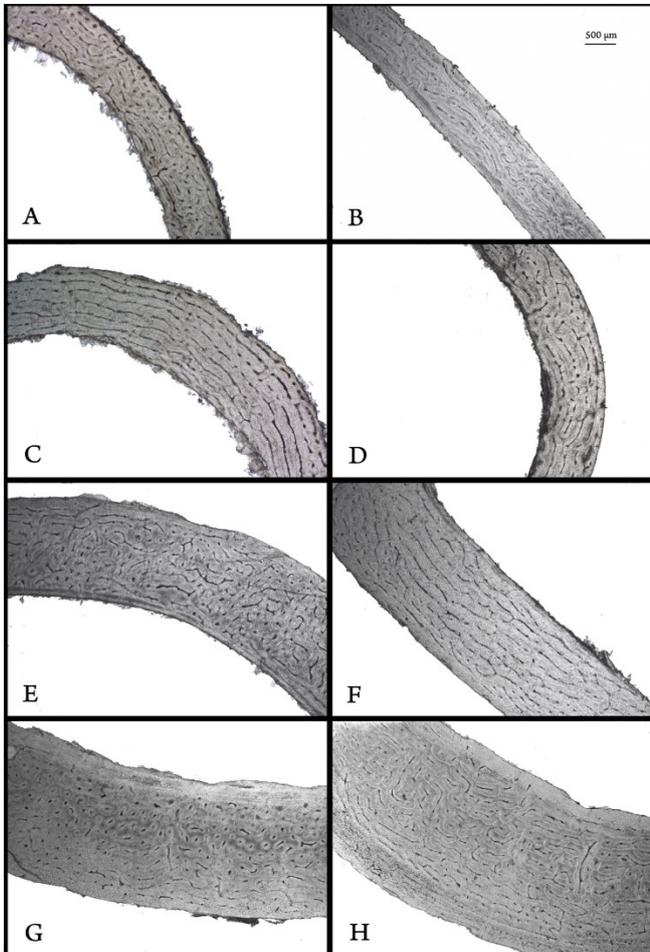


Figura 38. Sezioni istologiche ottenute dalla regione centrale della diafisi di CMC (A, B), radio(C, D), ulna (E, F) e omero (G, H) nel grifone, si può osservare la diversità nell'orientamento dei canali vascolari. La scala mostrata è la stessa per tutte le immagini.

5.4 Discussione

Si ipotizza che durante il volo, che le ossa delle ali sperimentino vari tipi di stress biomeccanici, come compressione assiale, flessione e torsione, i quali, distribuiti fra le ossa in maniera diversa (Biewener and Dial, 1995) hanno spinto per differenti evoluzioni strutturali, più adatti a rispondere ad uno specifico carico.

Una ipotesi iniziale di questo studio è stata che l'LI come descritto da de Margerie (2002) varierebbe tra omero, radio, ulna e CMC a causa dei carichi differenti esercitati su di essi. Sebbene i nostri risultati siano in contrasto con quanto ottenuto da Simons and O'Connor (2012) sul pellicano bruno (*Pelecanus occidentalis*), un uccello caratterizzato da un volo veleggiato statico, noi riteniamo che le differenze significative all'interno delle ossa lunghe dell'ala del grifone siano probabilmente dovute al diverso stile di volo. Infatti, il pellicano bruno è un cacciatore attivo e si immerge per catturare le prede, tuffandosi da 12-18 m sopra il livello del mare (Carl, 1987), e chiaro perciò che le ossa sono sottoposte a stress da forze d'impatto. Al contrario del grifone, animale spazzino, sorvola i terreni aziendali alla ricerca di carcasse, le quali vengono raggiunte di solito compiendo una lenta discesa.

Le nostre analisi hanno mostrato che la CMC aveva un LI significativamente più basso rispetto all'omero e all'ulna (Fig. 33). In relazione al loro angolo di inserzione sull'osso, le remiganti sia primarie che secondarie inducono forze di carico differenti che possono influenzare l'orientamento microstrutturale degli osteoni. L'angolo d'inserzione delle penne assieme al tipo di volo sono responsabili di carichi specifici sulle ossa. Nell'ulna, le remiganti secondarie sono attaccate quasi perpendicolarmente all'asse lungo dell'osso, inducendo così un carico torsionale sull'osso. Al contrario, le penne inserite obliquamente all'osso causano stress flessori, come avviene nella mano, dove le penne primarie si inseriscono sulla CMC con un angolo di 24° - 40° (Figura 39) (Pennycuik, 2008).

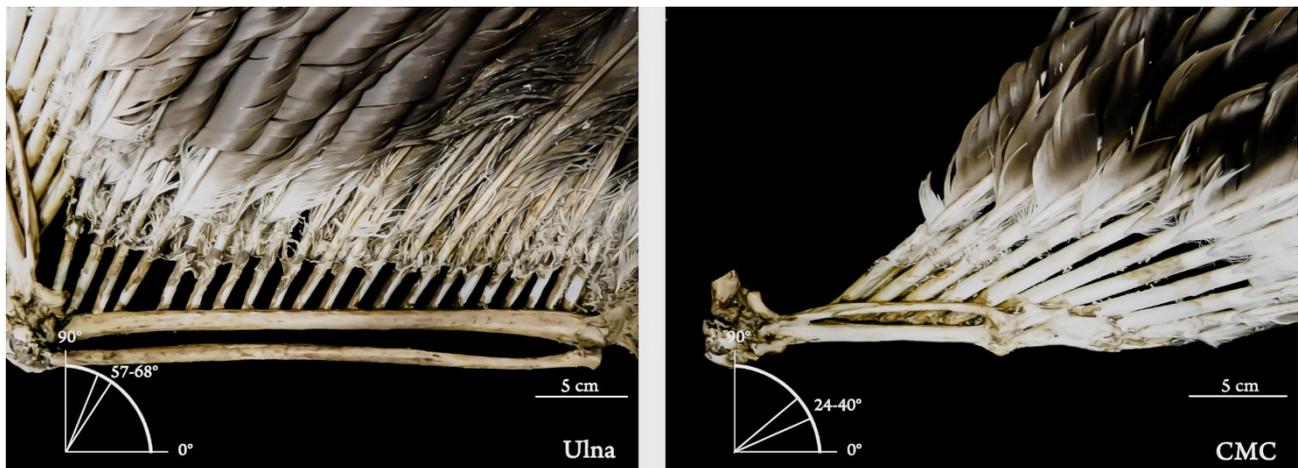


Figura 39. Ossa dell'ala e remiganti del grifone, si possono osservare i diversi angoli di inserzione delle remiganti primarie e secondarie sulle ossa. I campioni sono stati ottenuti rimuovendo tutti i tessuti molli, ad eccezione delle penne primarie e secondarie. L'immagine a destra mostra CMC e falangi con le remiganti primarie, queste sono orientate obliquamente rispetto all'asse lungo del CMC con un angolo di 24-40°. L'immagine a sinistra mostra il radio e l'ulna con le remiganti secondarie inserite nell'ulna con un angolo che è quasi perpendicolare, 57-68°. L'ulna e il radio sono sottili e quasi privi di curvatura. Il grado di curvatura laterale del radio e dell'ulna fornisce un indicatore della massa muscolare relativa collegata a queste strutture. Questo è probabilmente correlato con la quantità di manovre (decollo, atterraggio, volo ascendente verticale) che ogni specie esegue abitualmente (Dial, 1992).

L'omero, che non possiede l'inserzione di penne, ha una LI superiore al CMC, questo perché durante il volo l'ulna ha una posizione quasi perpendicolare all'omero e non può ruotare, quindi il momento flettente dell'ulna viene trasferito all'omero come momento torsionale (Biewener and Dial, 1995, Sullivan et al., 2017). Sebbene entrambe le specie, il pellicano bruno e il grifone, abbiano un numero simile di remiganti primarie e siti di inserzione sovrapponibili, sono state osservate differenze significative nella LI del CMC rispetto all'omero. Entrambe le specie utilizzano un volo veleggiato statico, tuttavia riteniamo che il diverso comportamento alimentare del grifone possa influenzare la microstruttura della CMC. Gli avvoltoi sono necrofagi esclusivi e specializzati in un'efficiente volo veleggiato statico, essendo privi della capacità di uccidere che caratterizza gli altri rapaci (Ruxton and Houston, 2004), questi avvoltoi trascorrono molto tempo in volo alla ricerca di cibo (Brown, 1988, Donazar, 1993). Nel grifone, il tempo più breve passato in volo è stato registrato a dicembre (6,4 ore al giorno) e il più lungo a giugno (9,3 ore al giorno, Xirouchakis and Andreou (2009)). Una volta che un avvoltoio trova una carcassa, continua a librarsi sopra l'area dove è presente la carogna per un po' di tempo, poi di solito atterra eseguendo continui giri verso il basso. Il comportamento di caccia del pellicano consiste invece nell'osservazione e nella selezione di un singolo pesce e successivamente in un tuffo ad immersione tentando la cattura, quando si trova sott'acqua piega le ali all'indietro per aumentare la velocità verso la preda (Schreiber et al., 1975). Il tipo di pasto consumato dai grifoni è anche diverso da quello dei pellicani, ed è solitamente così pesante da rendere visibilmente difficile il decollo.

Uno stile di volo veleggiato dovrebbe essere il più adatto per gli animali necrofagi obbligati in quanto riduce al minimo i costi energetici della ricerca di cibo, consentendo loro di coprire lunghe distanze all'interno di un vasto habitat di alimentazione, alla ricerca di carcasse (Houston, 2001, Pennycuik, 2008). Nel caso dei grifoni, la massa corporea e la forma delle ali sono in ultima analisi vincolate alle esigenze del volo. Gli avvoltoio sono caratterizzati da un profilo alare ampio, e alcune specie sono tra le più grandi fra gli uccelli, questi trovano difficile il decollo fino a quando non hanno digerito parte del loro consumo di cibo (Ruxton and Houston, 2004). Infatti, nell'Ottocento, per ottenere remiganti di avvoltoi, i Sardi usavano mettere una pecora morta in una buca di 5 x 5 metri (Figura 40), così che dopo il pasto, la maggior parte dei grifoni potevano essere catturati a mano (Caravano, 2017).



Figura 40. Antica trappola per avvoltoi utilizzata in Sardegna durante il XIX secolo.

Analizzando l'LI delle sezioni trasversali dell'osso lungo nella specie Accipitridae, de Margerie et al. (2005) hanno trovato un elevato valore di laminarità nell'omero e nell'ulna, suggerendo che i carichi torsionali potessero essere uno dei principali determinanti nella specifica composizione strutturale di queste ossa lunghe. L'alto valore di LI è stato interpretato con un'alta resistenza ai carichi torsionali, le remiganti trasmettono le forze stressorie all'osso e infine alla massa corporea attraverso la forcula. Più recentemente, è stato studiato il significato funzionale della variazione morfologica di questo osso, i risultati hanno mostrato che una forcula a forma di U è strettamente correlata allo stile di volo veleggiato (Close and Rayfield, 2012, Hui, 2002) e nell'avvoltoio grifone, la forma della furcula è simile a quella degli uccelli con stile di volo veleggiato statico (Figura 41).



Figura 41. Due esempi di forcula di grifone, a differenza di altri uccelli veleggiatori, ha una forma ad U (vista cranio-caudale).

La forma delle sezioni trasversali delle ossa degli arti anteriori è probabilmente correlata ai carichi meccanici sperimentati durante la locomozione (Biewener and Dial, 1995). Marelli and Simons (2014) hanno dimostrato che la diversa forma della sezione trasversale delle ossa delle ali tra due specie di rapaci, simili in massa e apertura alare ma con in stile di volo differente, era probabilmente correlata ai diversi carichi che ogni osso sopportava. Nello studio, l'omero e l'ulna hanno mostrato una forma quasi circolare nei veleggiatori, mentre le stesse ossa erano più ellittiche nelle specie a volo battente, dove le forze di flessione sono maggiori.

Noi abbiamo osservato, tra le ossa analizzate, come il CMC abbia una sezione trasversale diafisaria più ellittica rispetto alle altre ossa delle ali, in particolare rispetto all'ulna (Figura 31). Un osso con una sezione trasversale di forma ellittica offre una maggiore resistenza a carichi di flessione, lungo un piano specifico, rispetto a un osso con una sezione trasversale circolare. I risultati statistici hanno mostrato che, il radio presenta una bassa resistenza alla torsione: un rapporto J/L inferiore rispetto alle altre ossa, una forma meno ellittica a confronto con il CMC ma più ellittica dell'ulna e un LI che non differisce da quello del CMC. Questi risultati sul radio sono in linea con quanto descritto da de Margerie (2002), de Margerie et al. (2005), i quali hanno identificato questo osso come progettato per tollerare sforzi longitudinali causati da compressione, tensione o flessione. Il radio ha pochissima libertà di rotazione rispetto all'ulna, e scivolando parallelamente all'ulna flette o estende la mano, controllando alcuni aspetti del volo, soprattutto l'atterraggio (Vazquez, 1994). Inoltre, i carichi di volo

trasmessi attraverso le remiganti influiscono sulla struttura dell'ulna ma non del radio (de Margerie, 2002).

Esiste una relazione diretta tra le proprietà meccaniche e il BMD in campioni di ossa umane e animali (Ammann and Rizzoli, 2003, Lelovas et al., 2008). L'analisi della densità può essere utile per chiarire meglio le relazioni specifiche tra la forma dell'osso, le proprietà geometriche delle sezioni trasversali, l'area corticale relativa e l'LI, così come la tipologia di forma dell'ala. La BMD è correlata positivamente alla resistenza ossea (Wachter et al., 2002) e può essere associata alla quantità di carico che l'osso può sostenere. Le significative differenze di densità ossea, documentati in questo studio, tra le ossa lunghe dell'ala suggeriscono la presenza di differenti carichi di sollecitazione sulle ossa delle ali durante il volo (Figura 33). La modulazione della densità e delle caratteristiche dell'osso corticale dipende dalla zona sulla quale carichi di torsione e flessione vengono esercitati. Il CMC mostrava una minore densità minerale, una inferiore laminarità ed una sezione centrale di forma più ellittica rispetto all'omero e all'ulna, combinazione che rende questo osso proporzionalmente più leggero e meno forte rispetto alle altre ossa analizzate. Allo stesso tempo, la forma del CMC è ottimizzata per affrontare le forze di flessione (Lochmuller et al., 2000, Sullivan et al., 2017). Al contrario, sia l'omero che l'ulna mantengono una densità maggiore, una sezione centrale di forma circolare e una laminarità più elevata per resistere meglio ai carichi torsionali (Dumont, 2010, Marelli and Simons, 2014, Simons and O'Connor, 2012).

Le indagini sulle ossa di uccelli estinti hanno evidenziato l'importanza della pneumatizzazione ossea per l'evoluzione dello scheletro assiale con una conseguente diminuzione della massa ossea (O'Connor, 2009). Questo è stato interpretato come un meccanismo di specializzazione legato alle strategie di alimentazione e allo stile di volo che potrebbe aver modificato l'evoluzione della pneumatizzazione ossea in alcuni cladi (Gutzwiller et al., 2013). Gli avvoltoi e altri volatili caratterizzati da una corporatura grande si sono specializzati nel volo veleggiato, le ossa dell'ala possiedono una corticale di spessore relativamente ridotto così da migliorare la leggerezza dell'osso, a differenza delle ossa più spesse degli uccelli pescatori (Fajardo et al., 2007). Gli uccelli più grandi hanno remiganti primarie relativamente più corte e più flessibili rispetto agli uccelli più piccoli (Nudds et al., 2011, Worcester, 1996). Questo è stato correlato alla necessità di ridurre lo stress sullo scheletro dell'ala durante il decollo e l'atterraggio quando le forze prodotte dai movimenti dell'ala sono molto elevate. Essendo tali forze concentrate sulle remiganti primarie, diventa particolarmente rischioso, in termini di eccesso di stress, sia per le ossa che per la muscolatura delle ali. Questa caratteristica flessibilità delle penne genera proporzionalmente minori forze e momenti flettenti sulle ossa (Worcester, 1996). La presenza di spazi tra le penne primarie all'estremità dell'ala aiuta a ridurre la resistenza a basse velocità, perché le singole piume funzionano come singole piccole ali (Tucker, 1995). Le lunghe remiganti primarie, attaccate alle falangi e al CMC, si deformano durante il volo, trasmettendo con un carico modesto sull'osso (Figura 42). Ciò significa che il picco di forza generato, durante alcune attività di volo, non può essere sostenuto dalle ossa, infatti durante le attività di atterraggio e decollo, la flessibilità della piuma consente loro di operare entro i limiti del fattore di sicurezza (rapporto tra lo sforzo massimo che si verifica durante l'attività e il punto di snervamento), al fine di evitare il punto di rottura dell'osso alare. Quindi, la maggiore flessibilità delle penne può essere vista come un fattore di sicurezza contro il possibile danno perché lo stress da rottura delle ossa è quasi indipendente dalla taglia e dalla tassonomia degli animali (Alexander, 1981, Biewener, 1982, Kirkpatrick, 1994, Norberg and Aldrin, 2010).



Figura 42. Per limitare il problema della resistenza dei vortici che si sviluppano alle estremità delle ali, un terzo dell'ala nella parte esterna mostra una marcata fessurazione tra le remiganti primarie che, avendo un rachide elastico, sono in grado di inflettersi verso l'alto rallentando l'intensità dei vortici. Studiando le caratteristiche degli uccelli la NASA nel 1980 modificò le estremità delle ali degli aerei, piegandole verso l'alto, ottenendo una riduzione delle turbolenze e dei consumi di carburante.

La quantità di osso corticale in una sezione trasversale può essere utilizzata per stimare la capacità dell'osso di resistere alla compressione assiale (Young, 1989). In alcuni uccelli pescatori è stato trovato uno spessore relativamente elevato dell'osso corticale, che potrebbe ben rappresentare una modificazione scheletrica correlata alla migrazione idrica negli uccelli che si immergono (Habib and Ruff, 2008; Simons et al., 2011). Nel nostro studio, gli arti anteriori del grifone hanno mostrato un rapporto CA/TA inferiore a 0,46 e non sono state riscontrate differenze tra le ossa degli arti anteriori esaminate.

L'omero ha mostrato il momento polare dell'area più alto rispetto alle altre ossa, offrendo così una resistenza maggiore ai carichi torsionali (Alexander, 1983, Swartz et al., 1992). Non sono state trovate differenze statistiche tra l'ulna e il CMC, tuttavia è importante notare che J, una misura della resistenza alla torsione, è maggiore quando la forma della sezione (I_{max}/I_{min}) è quasi circolare (Daegling, 2002). Presi insieme, questi risultati supportano l'idea che le differenze in LI, nella forma della sezione trasversale, nel momento polare dell'area corticale e nella densità ossea potrebbero essere viste come un adattamento evolutivo ai diversi carichi alle quali le ossa sono sottoposte durante il volo. L'architettura di tutto l'osso si adatta ai suoi carichi biomeccanici per mezzo della microstruttura ossea (Currey, 2003), tuttavia, non è chiaro come lo stile di volo possa influenzare la microanatomia delle ossa delle ali. Gli uccelli con un profilo alare ampio, come i veleggiatori statici, possiedono ossa dell'ala con un LI maggiore rispetto agli uccelli con ali lunghe e strette come i veleggiatori dinamici (de Margerie, 2002) e con tassi di crescita del tessuto osseo che variano a seconda dell'osso lungo considerato (de Margerie et al., 2004). Gli stessi autori hanno osservato come, nei pulli di pinguino reale (*Aptenodytes patagonicus*), i tassi di crescita fossero inferiori del 38% nel radio rispetto alle altre ossa lunghe e più alti quanto la microarchitettura delle ossa fibro-lamellari aveva un orientamento radiale (de Margerie et al., 2004). Sebbene la correlazione tra le caratteristiche strutturali e laminarità delle ossa alari e la meccanica funzionale del volo sia stata discussa in molti studi, non è stato ancora chiarito se questo adattamento derivi dalla selezione naturale, dalla

accomodazione genetica (l'adattamento funzionale durante l'ontogenesi), o entrambi (Carter et al., 1991, de Margerie, 2002, Habib and Ruff, 2008, Starck and Chinsamy, 2002).

Per quanto riguarda il confronto tra le classi di età, non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative nelle caratteristiche della sezione trasversale, densità e laminarità - tuttavia, le dimensioni dei campioni messi a confronto erano ridotte. Durante il periodo di pre-involo, l'arto anteriore della maggior parte dei volatili è debole, ma quando i giovani uccelli sono prossimi al periodo di involo, la struttura ossea dell'ala cambia rapidamente assumendo le caratteristiche dell'adulto. Ciò si verifica contemporaneamente all'accrescimento del muscolo pettorale, in questo periodo i nidiacei compiono esercizi di preparazione al volo (Carrier and Leon, 1990). Watanabe (2011) ha studiato la crescita delle lunghe ossa delle ali nei pulcini che si schiudono in condizioni semi-altriciali e ha scoperto che la crescita longitudinale delle ossa lunghe probabilmente cessa alla fine (o poco dopo) della fase pre-involo, quando gli uccelli diventano capaci di volare e lasciare le colonie di nascita, perciò quando i giovani grifoni sono in grado di esprimere un volo veleggiato statico e mostrano una dispersione giovanile molto alta (Griesinger, 1996).

Durante la vita di un uccello, il tessuto Haversiano secondario può essere rimodellato, ma l'osso corticale di solito mantiene la sua struttura primaria (Currey, 1960, Enlow and Brown, 1957). Il rimodellamento non influenza le dimensioni o la forma complessiva dell'osso, ma piuttosto aree specifiche associate ad un danno da stress meccanico con lo sviluppo di osteoni secondari in relazione alla frequenza, ampiezza e tipo di forze sperimentate sull'osso corticale (Martin et al., 1998, Ponton et al., 2007, Robling et al., 2006). Sebbene durante il nostro esame istologico siano stati osservati rari osteoni secondari (Haversiani), la nostra analisi si è basata solo sulla struttura primaria.

5.5 Conclusioni

I nostri risultati suggeriscono che l'omero e l'ulna dei grifoni possiedono caratteristiche adatte a resistere meglio ai carichi torsionali (alta laminarità, alto momento polare dell'area e sezione circolare), mentre il CMC meglio si presta a rispondere ai carichi di flessione. Gli studi futuri terranno conto di una più dettagliata analisi dei fattori filogenetici e funzionali che potenzialmente guidano alti livelli di variabilità delle ossa delle ali. Speriamo di sfruttare queste osservazioni sulla microstruttura delle ossa delle ali al fine di ottenere una migliore comprensione degli stress biomeccanici negli uccelli con stili di volo diversi. Miriamo quindi a studiare la microstruttura degli arti anteriori in avvoltoi sia del Nuovo (Cathartidae) che del Vecchio Mondo (Accipitridae) i quali mostrano un comune stile di volo e di alimentazione. Una più ampia conoscenza delle caratteristiche delle ossa dell'ala di entrambi questi avvoltoi potrebbe chiarire se la morfologia dell'ala è correlata allo stile di volo o, invece, a fattori filogenetici (Wang and Clarke, 2015).

6. Esperimento 5: Concentrazioni di Cortisolo e DHEA nelle penne di grifone per valutare la condizione di stress sanitario.

6.1 Scopo

Durante la loro vita, gli uccelli affrontano continuamente diverse sfide che possono minacciare la stabilità delle funzioni fisiologiche in termini di condizioni emotive, metaboliche, di salute, e infine comprometterne le prestazioni fisiche e la sopravvivenza (Romero and Fairhurst, 2016). Queste situazioni tipicamente innescano una cascata di secrezioni endocrine che coinvolgono l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), con conseguente rilascio di ormoni glucocorticoidi (GCs) (McEwen, 2007). Il rilascio di GC, innescato da fattori ambientali e antropogenici, aiuta l'animale a contrastare i fattori stressanti adottando comportamenti di risparmio energetico che gli consentono di far fronte all'evento negativo (Wingfield, 2013, Wingfield and Sapolsky, 2003). Le concentrazioni basali sistemiche dei GC aiutano a regolare il metabolismo, l'attività fisica e il comportamento alimentare. Un temporaneo incremento delle concentrazioni di questi ormoni offre il vantaggio di mobilitare riserve di energia e glucosio per far fronte allo stress. Quando invece lo stress è di tipo cronico, questi ormoni raggiungono elevati livelli andando a costituire la componente principale nella risposta a stimoli negativi ripetuti o prolungati (Landys et al., 2006, Sapolsky et al., 2000). Nonostante i benefici immediati, l'attivazione cronica dell'asse HPA è stata implicata nella diminuzione del tasso di crescita, della difesa immunitaria, delle condizioni del corpo e delle funzioni di sopravvivenza nel tentativo di far fronte alla sfida ambientale (Kitaysky et al., 2003, Sapolsky et al., 2000). I GC regolano la riassegnazione delle risorse energetiche di un individuo ottimizzandole per adattare la risposta alle condizioni ambientali sfavorevoli (McEwen and Wingfield, 2003, Ranabir and Reetu, 2011). Dall'altro lato, sono state descritte anche variazioni stagionali dei GC.

Sebbene negli uccelli, come nei roditori, il principale ormone dello stress sia il corticosterone, esiste relazione diretta tra i livelli ematici di corticosterone e cortisolo. Nelle penne dei passeri domestici (*Passer domesticus*) le concentrazioni del corticosterone e cortisolo, non differiscono statisticamente. Entrambi gli ormoni danno origine ad una simile risposta alle diverse condizioni fisiologiche degli uccelli (Koren et al., 2012). Il deidroepiandrosterone (DHEA) e il suo metabolita solfato sono steroidi endogeni secreti dalla corteccia surrenale in risposta allo stimolo dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH). In diversi modelli animali e nell'uomo, il DHEA ha mostrato effetti neuro-protettivi, anti-ossidanti, anti-infiammatori e anti-anti-glucocorticoidi (Blauer et al., 1991, Maninger et al., 2009, Wright et al., 1992), assumendo un significativo ruolo nella protezione contro le conseguenze negative dello stress (Hu et al., 2000). Al momento, gli effetti del DHEA sono ben descritti nei mammiferi, ma molto meno negli uccelli (Newman et al., 2013). Alte concentrazioni ematiche di DHEA sono state descritte nel passero cantore fuori dalla stagione riproduttiva (Newman et al., 2008, Newman and Soma, 2009) e nella specie gregaria di oca colombaccio (*Branta bernicla bernicla*) dove le concentrazioni plasmatiche di DHEA nella erano negativamente correlate al punteggio di dominanza (Poisbleau et al., 2009). Gli uccelli possono ridurre la risposta adrenocorticale allo stress durante la stagione riproduttiva come strategia per massimizzare il successo riproduttivo (P Love et al., 2004, Wingfield et al., 1995, Wingfield and Romero, 2000). Poiché nei mammiferi il DHEA ha effetti anabolici e anti-glucocorticoidi e, quindi, protegge dagli effetti catabolici del cortisolo (Kalimi

et al., 1994, Labrie et al., 2006), contemporaneamente una misura comune utilizzata per testare l'impatto di entrambi gli ormoni è il rapporto tra DHEA e cortisolo (Hechter et al., 1997, Qiao et al., 2017, Goodyer et al., 1998)

La valutazione dell'attività dell'asse HPA può essere fornita valutando le concentrazioni di cortisolo e DHEA. Nonostante l'analisi del prelievo di sangue sia il metodo più comune per misurare le concentrazioni ormonali, presenta alcune limitazioni informative (Mormede et al., 2007) e, specialmente negli uccelli selvatici, il prelievo di sangue non è sempre possibile. Sebbene sia evidente l'importanza dello studio endocrinologico nelle specie selvatiche, risulta di difficile attuazione rispetto agli studi su animali da laboratorio o animali domestici. L'uso di un approccio non invasivo utilizzando campioni di materiale biologico derivante da popolazioni naturali rappresenta una grande combinazione per migliorare le conoscenze biologiche sulla specie.

L'esecuzione delle analisi su un tessuto che accumula ormoni per un periodo relativamente lungo, come le piume, offre un'alternativa ai campioni di sangue, fornendo una immagine retrospettiva dell'animale all'esposizione ormonale. Durante la fase anagena, la penna è fornita di una ricca rete di capillari all'interno della base del calamo, irrorazione che assicura un rapido accrescimento (la penna è definita penna sanguigna o polposa). Una volta che la penna è matura, la polpa si atrofizza e la penna si trova in fase di riposo (telogena). La muta, avviene una volta all'anno, la nuova penna in crescita alla base del follicolo spinge via quella vecchia e la rimpiazza. La misurazione degli ormoni da penne è un approccio particolarmente potente nella biologia della conservazione ed è relativamente facile da eseguire poiché una volta raccolte le piume non si richiedono condizioni speciali per lo stoccaggio e il trasporto. Gli ormoni accumulati nel piumaggio vengono forniti principalmente dalla ricca rete di capillari presente all'interno della base del calamo, e riflettono la concentrazione ormonale ematica presente nel periodo di crescita del piumaggio stesso (Bortolotti et al., 2009), per questo motivo questo materiale si presta bene per valutare l'esposizione cronica allo stress (Jenni-Eiermann et al., 2015).

Il piumaggio si deteriora principalmente attraverso l'azione di agenti fisici e quindi deve essere rinnovato periodicamente. Durante la muta, in grandi specie di uccelli come il grifone, le piume vengono generalmente sostituite sequenzialmente, in un ordine predeterminato, creando diverse ondate di muta consecutive (Newton, 2009, Zuberogoitia et al., 2013). Le ondate di muta non si verificano nei primi mesi dell'anno a causa delle cattive condizioni del corpo derivanti da un basso apporto di cibo e un'elevato dispendio di energia richiesta per accoppiarsi, nidificare, incubare e per via del limitato tempo disponibile (fotoperiodo) per l'alimentazione (Xirouchakis e Mylonas, 2007, Zuberogoitia et al., 2013). Il più alto tasso di muta si registra a luglio e ad agosto, quando i piccoli lasciano i nidi. Grazie al processo di muta, penne e piume possono essere campionate nell'habitat frequentato da animali gregari, senza la necessità di catturarli, ed utilizzate per valutare lo stato ormonale dei soggetti che frequentano quella specifica colonia, ottenendo così una misura fisiologica e non invasiva in termini di benessere animale (Bortolotti et al., 2008). Inoltre, non vi è evidenza che il contenuto di ormoni nel piumaggio raccolto diminuisca con il tempo, rendendo possibile l'analisi delle concentrazioni di ormoni steroidei in campioni provenienti da archivi e collezioni museali (Bortolotti et al., 2009, Kennedy et al., 2013).

L'ipotesi è che, conoscendo la storia clinica degli animali e, in particolare, i fenomeni patologici potenzialmente responsabili di stress cronico, le concentrazioni ormonali riscontrate nel piumaggio riflettano, in media, la diversa attività HPA in due gruppi di animali presi in esame. Le concentrazioni

più alte di cortisolo e DHEA dovrebbero essere osservate nel gruppo che ha subito un periodo di compromissione dello stato fisiologico (stress cronico) rispetto a quelle registrate nel gruppo di controllo e dal rapporto cortisolo / DHEA. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la fattibilità nell'utilizzo delle concentrazioni di cortisolo e DHEA nel piumaggio, per fornire una valutazione retrospettiva dell'attività dell'asse HPA nei grifoni in relazione al loro stato clinico.

6.2 Materiali e metodi

Scelta degli animali

In questo studio abbiamo utilizzato 17 grifoni: 4 di loro, recuperati morti, sono stati sottoposti a necropsia presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari, mentre 13 erano tenuti in cattività presso il Centro di riabilitazione della fauna selvatica (Bonassai, Agenzia Fo.Re. S.T.A.S., Italia) in voliere esterne, fornite di cibo ed acqua ad libitum. Alcuni di questi animali vivevano in gabbie da più di 3 anni e mostravano fiducia verso gli operatori durante le periodiche operazioni di gestione.

I grifoni sono stati divisi in 2 gruppi in relazione alla loro esposizione a fattori stressanti: un gruppo era composto da grifoni che avevano subito un lungo periodo di compromissione dello stato sanitario (gruppo PC, n = 8) mentre l'altro gruppo era composto da individui che non aveva subito alcuna evidente situazione di stress (gruppo CTRL; n = 9). La decisione di introdurre un animale nel gruppo PC o CTRL è stata presa sulla base della storia clinica individuale per animali tenuti in cattività. Gli animali fisiologicamente compromessi erano animali che mostravano problematiche/patologie, sia fisiche che comportamentali, che potevano essere correlate ad una esposizione cronica allo stress. Abbiamo scelto di inserire tutti gli animali giovani nel gruppo CTRL perché le penne di questi animali rispecchiano le concentrazioni ormonali riguardanti il periodo pre-involo e, quindi, non in grado di esprimere alcun fenomeno di stress correlato alla prima esperienza di volo.

Campionamento del piumaggio

Per valutare se l'analisi della concentrazione ormonale nel piumaggio fosse adatta o meno all'applicazione sul campo, abbiamo deciso di utilizzare diversi tipi di piumaggio, raccogliendo sia penne che piume, e randomizzando il numero e la tipologia (Figura 43).

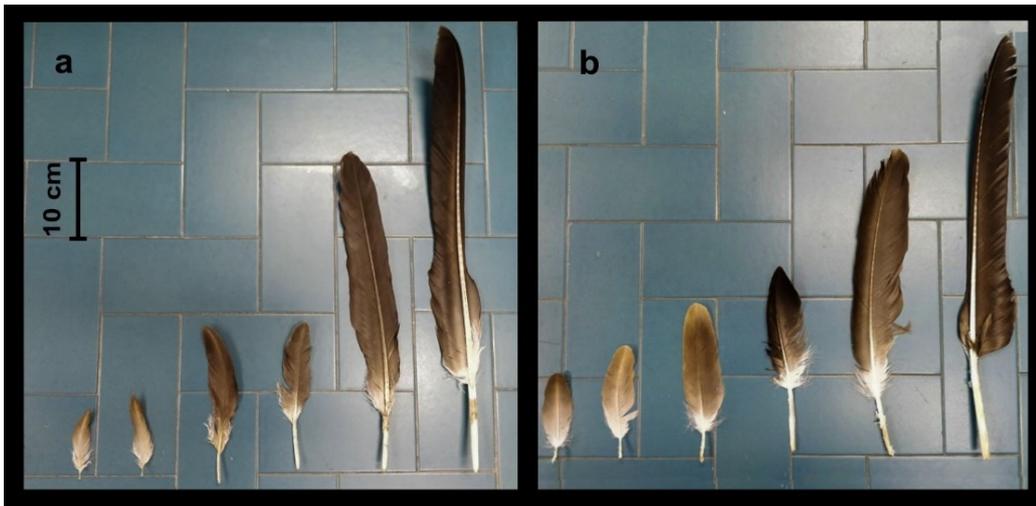


Figura 43. Le immagini mostrano due campioni di piumaggio appartenenti a due grifoni di età diversa, disposte secondo un ordine di grandezza. Penne e piume di un giovane animale (a, 1 anno) appaiono più appuntite e scure di un soggetto adulto (b, > 5 anni), dove sono invece più pallide e con punta arrotondata.

Un totale di 56 elementi, sono stati raccolti durante il periodo estivo dai 2 gruppi di animali. Il pool era composto da 12 penne, 31 piume e 13 di piumino. I campioni di piumaggio degli animali tenuti in gabbie singole è stato raccolto da terra, mentre per gli altri direttamente dall'animale. I campioni sono stati conservati a temperatura ambiente, in buste di carta, fino all'analisi.

Valutazione delle concentrazioni di cortisolo

Il calamo è stato rimosso e le barbe sono state tritate, con le forbici, in pezzi di dimensioni inferiori a 5 mm. Il materiale ottenuto è stato lavato due volte in 3 ml di isopropanolo per un minuto e circa 35 mg di barbe è stato sottoposto ad estrazione con 4 ml di metanolo. I materiali ottenuti sono stati incubati a 37 °C per 16 ore. Successivamente, il liquido è stato fatto evaporare a secco a 37 °C sotto una cappa ad aspirazione. Il residuo rimanente è stato sciolto in 0,8 ml di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), 0,05 M, pH 7,5 (RIA buffer). Il cortisolo è stato misurato usando una procedura RIA per microtitolazione in fase solida. In breve, una piastra per microtitolazione a 96 pozzetti (OptiPlate, Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA, USA) è stata ricoperta con siero di γ -globulina di capra anti-coniglio, diluito 1: 1.000 in tampone di sodio acetato 0,15 mM, pH 9, e incubato per una notte a 4 °C. La piastra è stata lavata due volte con tampone RIA, pH 7,4 e incubata per una notte a 4 °C con 200 μ L di siero anti-cortisolo diluito 1: 12.000. L'anticorpo anti-cortisolo di coniglio utilizzato è stato ottenuto da Biogenesis (Poole, Regno Unito). Le reazioni crociate di questo anticorpo con altri steroidi sono le seguenti: cortisolo 100%, corticosterone 1,8% e aldosterone <0,02%. Dopo aver lavato la piastra con tampone RIA, gli standard (5-300 pg per pozzetto), un estratto di controllo di qualità, gli estratti da analizzare e il tracciante (Hydrocortisone [Cortisol, (1,2,6,7-3H [N]) -], Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) sono stati aggiunti e la piastra è stata incubata per una notte a 4 °C. L'ormone legato è stato separato dall'ormone libero decantando l'estratto e lavando i pozzetti nel tampone RIA. Dopo l'aggiunta di 200 μ L di cocktail di scintillazione, i risultati sono stati letti su un contatore beta (Top-Count, Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA). I coefficienti di variazione intra- e inter-assay erano 3,7 e 9,4%, rispettivamente. La sensibilità

del dosaggio (definita come la concentrazione ormonale risultante in uno spostamento dell'ormone marcato di almeno 2 deviazioni standard dal legame massimo) era di 0,98 pg per pozzetto.

Per valutare l'accuratezza del dosaggio, ed esaminare possibili interferenze dei componenti all'interno dell'estratto con il sito di legame anticorpale, è stato valutato il recupero del cortisolo esogeno aggiunto agli estratti di piumaggio. Ciascuno dei quattro estratti di piuma ricostituiti è stato diviso in tre aliquote indipendenti e arricchito con tre diverse concentrazioni di cortisolo note, miscelate e dosate. La percentuale di recupero è stata determinata come segue: quantità osservata / quantità attesa $\times 100$, in cui la quantità osservata è il valore ottenuto dal campione arricchito e la quantità attesa è la quantità calcolata di ormone standard aggiunto più la quantità di ormone endogeno non addizionata campione. Il tasso di recupero era $100,7 \pm 7,3\%$ (media \pm DS). Le concentrazioni dell'ormone misurate nei campioni arricchiti erano correlate alle concentrazioni ormonali previste: r era 0,99 e il modello era dato dall'equazione $y = 1.125 x - 1.744$.

Per determinare il parallelismo tra standard di cortisolo e cortisolo endogeno in campioni di piume contenenti alte concentrazioni di cortisolo endogeno (100 μ L) sono stati diluiti in serie in PBS 0,05 M, pH 7,5, per ottenere volumi di 50, 25 e 10 μ L. La relazione tra le concentrazioni di cortisolo nelle penne e la curva standard di cortisolo determinata mediante regressione lineare era lineare: il coefficiente di correlazione (r) era 0,99 e il modello era dato dall'equazione $y = 0,976 x + 2,253$.

Valutazione delle concentrazioni di deidroepiandrosterone

Gli estratti ottenuti secondo la tecnica soprariportata sono stati usati anche per misurare le concentrazioni di deidroepiandrosterone (DHEA), mediante la tecnica di microtitolazione RIA in fase solida precedentemente descritta per le analisi del cortisolo. Il siero anticorpale utilizzato era diluito 1:2.000 per DHEA. L'anticorpo anti-DHEA del coniglio è stato ottenuto da Sigma-Aldrich (Darmstadt, DE). Le reazioni crociate dell'anticorpo anti-DHEA con altri steroidi erano le seguenti: DHEA, 100%; pregnenolone, 0,1%; androstenediolo, 0,08%; diidrotestosterone, 0,05%; solfato DHEA, 0,02%; testosterone, $<0,01\%$; 5 α -androstano-diolo-3 β , 3 α , $<0,01\%$; 5 β -androstano-3 α , $<0,01\%$; estradiolo, $<0,01\%$; progesterone, $<0,01\%$; estrone, $<0,01\%$; colesterolo, $<0,01\%$. La piastra è stata trattata e le analisi ormonali sono state effettuate secondo la stessa metodica sopra descritta per analisi del cortisolo, ma utilizzando come tracciante il DHEA [1,2,6,7-3H (N)]. La piastra è stata quindi analizzata sul β contatore. I coefficienti di variazione intra e inter-dosaggio erano 4,3 e 10,1% per DHEA. La sensibilità del dosaggio era di 0,41 pg / pozzetto per DHEA. La percentuale di recupero per DHEA era $89,8 \pm 15,9\%$ (media \pm DS). Le concentrazioni ormonali misurate nei campioni arricchiti erano correlate alle concentrazioni previste per DHEA: r era 0,99 e il modello era dato dall'equazione $y = 0,838 x + 1,812$. La relazione tra la concentrazione delle penne di DHEA e la rispettiva curva standard, determinata mediante regressione, era lineare con coefficiente di correlazione di $r = 0,99$. Il modello è stato descritto dall'equazione $y = 1.017 x - 0.200$.

Analisi statistiche

Il test di Kruskal-Wallis è stato effettuato per rilevare le differenze nelle concentrazioni ormonali nel piumaggio tra i due gruppi animali considerati. La significatività statistica è stata raggiunta nei casi di $P < 0.05$ con un intervallo di confidenza del 95%. L'indice di correlazione di Pearson (r) è stato calcolato per valutare la forza e la direzione di una possibile relazione lineare esistente tra le concentrazioni di cortisolo e DHEA nei due gruppi (Hinkle et al., 2003). Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software statistico Minitab®.

6.3 Risultati

L'analisi delle mediane ha mostrato delle concentrazioni di cortisolo più alto nel gruppo PC rispetto al CTRL ($P < 0,001$), mentre nessuna differenza nella concentrazione di DHEA nel piumaggio era presente tra i due gruppi ($P = 0,10$). I valori medi del rapporto cortisolo / DHEA tra i due gruppi non hanno mostrato differenze statisticamente significative ($P = 0,35$).

I Box plot di cortisolo, DHEA e cortisolo/DHEA sono illustrati rispettivamente nelle Figura 44, Figura 45, Figura 46. Nella Tabella 13 sono mostrati mediana, primo e terzo intervallo interquartile (IQR) di cortisolo, DHEA e rapporto cortisolo/DHEA in entrambi i gruppi di grifoni CTRL e PC.

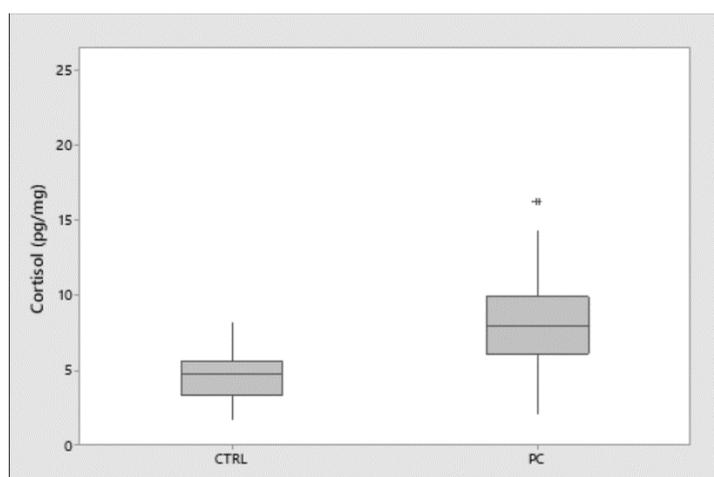


Figura 44. Concentrazione di cortisolo riscontrate nel piumaggio dei gruppi CTRL e PC di grifoni ($n = 17$). Tra i 2 gruppi è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa (test di Kruskal-Wallis, $P < 0,001$). Il box rappresenta l'intervallo interquartile, in cui la linea orizzontale rappresenta la mediana, la linea verticale inferiore e quella superiore sono il 25% superiore e inferiore della distribuzione rispettivamente, il simbolo dell'asterisco identifica i valori anomali.

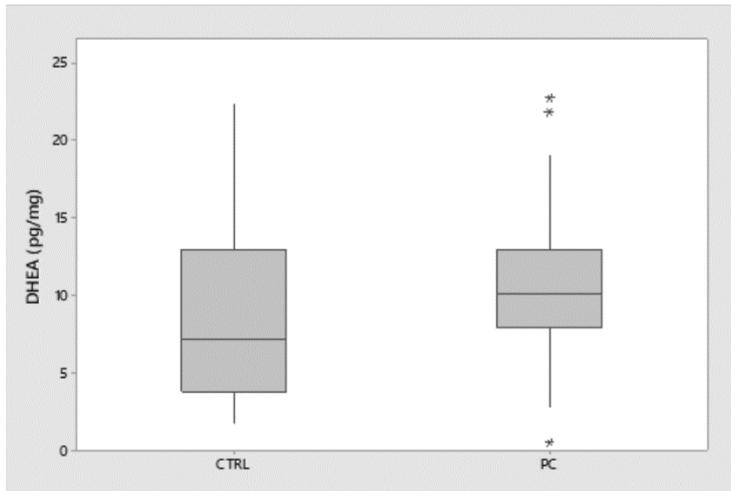


Figura 45. Concentrazione di DHEA nel piumaggio dei gruppi di grifoni CTRL e PC (n = 17). Il test di Kruskal-Wallis non ha mostrato alcuna differenza statistica (P = 0.10) tra i 2 gruppi.

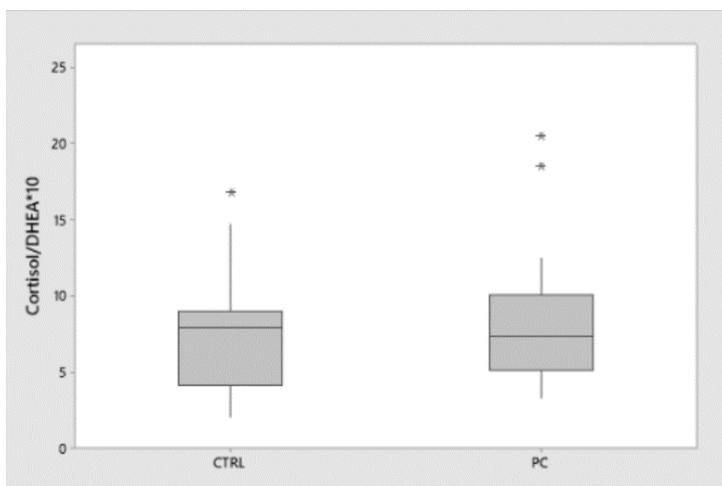


Figura 46. Rapporto Cortisolo/DHEA nel piumaggio riscontrato nei due gruppi di animali CTRL e PC (n = 17). Il test di Kruskal-Wallis non ha mostrato alcuna differenza statistica (P = 0,35) tra i 2 gruppi.

	Cortisolo (pg/mg)		DHEA (pg/mg)		Cortisolo/DHEA*10	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
CTRL	4.76	(3.49 – 5.55)	7.21	(4.36 – 12.89)	7.95	(4.29 – 8.99)
PC	7.94	(6.53 – 9.88)	10.19	(8.06 – 12.70)	7.42	(5.35 – 10.21)

Tabella 13. Mediana, primo e terzo range interquartile (IQR) nelle concentrazioni ormonali valutate nel piumaggio di grifone e rapporto cortisolo / DHEA fra i due gruppi CTRL e PC (n = 17).

I coefficienti di correlazione di Pearson sono stati utilizzati per esaminare le associazioni tra cortisolo e DHEA: i risultati non hanno mostrato alcuna correlazione tra le concentrazioni di cortisolo e di DHEA nel gruppo PC ($r = 0,24$, $P = 0,20$), mentre una correlazione positiva e moderata è stata riscontrata nel gruppo CTRL ($r = 0,57$, $P < 0,01$) (Figura 47).

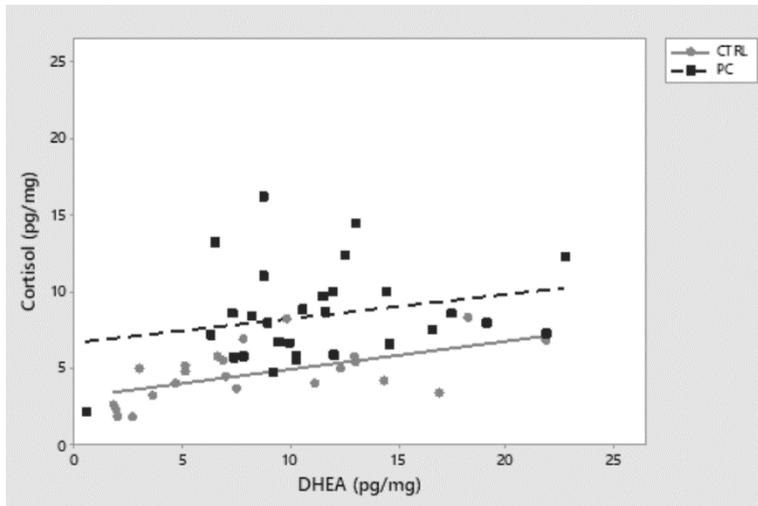


Figura 47. Correlazione delle concentrazioni di cortisolo con le concentrazioni di DHEA nel piumaggio. Nel gruppo CTRL il coefficiente di correlazione di Pearson ha mostrato una correlazione positiva moderata ($r = 0,57$; $P < 0,01$); nel gruppo PC non era presente alcuna correlazione tra le concentrazioni di cortisolo e di DHEA ($r = 0,24$; $P = 0,20$).

6.4 *Discussione*

Sebbene la risposta allo stress sia fondamentalmente un meccanismo biologico di adattamento, vi sono conseguenze negative associate alla esposizione prolungata o frequente agli stressors (Sapolsky et al., 2000). Le concentrazioni degli ormoni steroidei nel piumaggio sono in relazione con le concentrazioni ormonali sistemiche relative ad un determinato periodo di tempo, essi rispecchiano quelle che erano le condizioni ormonali dell'animale, durante la fase di crescita della penna. Per questo motivo il piumaggio può essere utilizzate per comprendere meglio le interazioni tra animali ed l'ambiente (Fairhurst et al., 2011, Kennedy et al., 2013, Kouwenberg et al., 2013, Harms et al., 2015). Tra questi, la valutazione dell'attività dell'asse HPA potrebbe essere utilizzata per comprendere lo stato di benessere dell'animale. È stato dimostrato che le concentrazioni di GC nel piumaggio variano in risposta a diversi fenomeni ambientali o di interazioni tra specie, incluso lo stato di salute (Harriman et al., 2014, Meitern et al., 2013, Mougeot et al., 2010, Sild et al., 2014). Le variazioni delle concentrazioni del DHEA, ben descritti nelle specie di mammiferi, sono meno noti negli uccelli (Newman et al., 2008), concentrazioni ematiche di DHEA sono state valutate in relazione ai comportamenti riproduttivi degli uccelli (Poisbleau et al., 2009, Newman and Soma, 2009, Newman

et al., 2013) ma, per quanto ne sappiamo, non è stato condotto alcuno studio sulle concentrazioni di DHEA sul piumaggio in nessuna specie.

Penne e piume offrono, in termini di valutazione ormonale, una finestra temporale ampia e flessibile, che varia da giorni a mesi a seconda della velocità di crescita del tipo di piumaggio. Pertanto, sembra che l'analisi delle concentrazioni dell'ormone negli annessi tegumentari dei volatili sia l'unico metodo disponibile per ottenere una misura a lungo termine e retrospettiva dell'attività dell'asse HPA. Considerando che, la sovrastimolazione dell'asse HPA può derivare da una situazione di compromissione fisiologica dell'animale, abbiamo valutato le concentrazioni ormonali nel piumaggio di due gruppi di grifoni sapendo quella che era la loro condizione di salute.

In questo lavoro abbiamo voluto approfondire le conoscenze su una metodica non invasiva, con l'utilizzo di materiale relativamente facile da reperire, per studiare una specie minacciata d'estinzione come l'avvoltoio grifone, questa analisi ci fornirà inoltre, per la prima volta, delle indicazioni sulla attività endocrina dell'animale. I risultati ottenuti hanno mostrato che, in questa specie, le concentrazioni di cortisolo e DHEA nel piumaggio possono essere misurate ed utilizzate per valutare lo stato di salute degli animali in modo attendibile, inoltre a nostra conoscenza, questo è il primo studio che riporta con successo le misurazioni di entrambi questi due ormoni negli uccelli selvatici. L'analisi del campione, il metodo di estrazione dell'ormone e la tecnica analitica descritta in questo documento hanno permesso di rilevare le concentrazioni di cortisolo e DHEA in tutti i campioni di piume e penne di grifone raccolte. Inoltre, il rilevamento di questo ormone è stato convalidato biochimicamente, dimostrando l'idoneità della metodica RIA nella quantificazione di cortisolo e DHEA in campioni trattati attraverso la metodologia sopra descritta. Questo passaggio è di primaria importanza quando si stanno sviluppando nuove tecniche per misurare gli ormoni steroidei.

Tecniche di analisi simili, eseguite su un campione biologico non invasivo come i capelli e i peli, hanno mostrato come le concentrazioni di cortisolo appaiono significativamente più elevate in soggetti umani e animali esposti a malattie croniche e subcliniche protratte rispetto ai controlli (Comin et al., 2013, Galuppi et al., 2013, Novak et al., 2014, Van Uum et al., 2008). In linea con questo, anche il nostro studio ha mostrato come le concentrazioni di cortisolo nel piumaggio fossero significativamente più alte per il gruppo PC rispetto al gruppo CTRL. Gli animali fisiologicamente compromessi erano animali che mostravano patologie, che potevano essere correlate all'esposizione cronica allo stress, quindi, ad una maggiore attività dell'asse HPA con un conseguente rilascio marcato di GC per far fronte alla situazione. Altri autori hanno osservato come un altro GC, il corticosterone, raggiunge concentrazioni differenti nelle piume in relazione allo stato fisiologico dell'animale (Bortolotti et al., 2008, Harriman et al., 2014, Sild et al., 2014).

È interessante notare che le più alte concentrazioni di cortisolo nel piumaggio sono state trovate nei due animali che a causa di gravi problemi fisici hanno sofferto un lungo periodo di inedia. Elevate concentrazioni di cortisolo sono state osservate anche in un grifone con una vecchia lesione ossea all'ala (Figura 48), questo sebbene fosse ancora in grado di volare, presentava grosse limitazioni in questa attività, considerando che il grifone passa molto tempo in volo, compiendo in media 50 km al giorno in cerca di cibo (Spiegel et al., 2013). Gli animali in via di guarigione da infezioni virali hanno mostrato concentrazioni di cortisolo nel piumaggio superiori al valore medio registrato per il gruppo CTRL. Nel gruppo CTRL, il valore più alto della concentrazione di cortisolo è stato registrato in un individuo morto improvvisamente dopo il suo ritrovamento, sebbene in apparenti buone condizioni

fisiche. Mentre, i valori più bassi nel gruppo CTRL sono stati osservati in tre giovani grifoni recuperati nei primi mesi di esperienza di volo.



Figura 48. Risultati radiologici che mostrano il risultato di una frattura ulnare, la lesione ossificata non risulta perfettamente in asse.

Sebbene la valutazione del cortisolo nel piumaggio risulti sempre più diffusa, questo è il primo lavoro che valuta la concentrazione di DHEA. Il nostro studio non ha mostrato alcuna differenza statistica tra i valori mediani di DHEA riscontrati nei due gruppi studiati, probabilmente a causa del più ampio intervallo di valori registrati in entrambi i gruppi. I grifoni presi in esame hanno probabilmente reagito ai diversi fattori di stress mettendo in atto risposte individuali con variazioni delle concentrazioni circolanti di DHEA che potrebbero essere dipendenti dal tempo e dalle caratteristiche individuali. Un risultato simile tra i due gruppi è stato ottenuto anche nel calcolo del rapporto cortisolo/DHEA. Tuttavia, il basso valore medio registrato in questo lavoro per entrambi i gruppi potrebbe dipendere, considerando anche quanto già descritto per altre specie, da uno stato fisiologico di resilienza nel quale gli animali già rispondevano agli agenti stressanti al momento della crescita del piumaggio. Nel valutare le reazioni degli animali ai vari fattori di stress potrebbe aiutare anche l'informazione sulla mancata correlazione tra le concentrazioni di cortisolo e DHEA nel gruppo PC e la correlazione positiva e moderata riscontrata invece nel gruppo CTRL.

È interessante notare come i due animali che avevano sofferto un lungo periodo di digiuno, mostravano oltre alle alte concentrazioni di cortisolo, già descritte sopra, i più bassi valori di DHEA e il più alto rapporto cortisolo/DHEA. Valori bassi di DHEA sono stati trovati anche nel piumaggio di tre giovani grifoni durante i primi mesi di esperienza di volo, assieme a basse concentrazioni di cortisolo, risultando così in un alto rapporto cortisolo/DHEA. Un altro dato interessante, è quello

riscontrato in un adulto che viveva in cattività insieme ad altri adulti ed era gerarchicamente subordinato. Questo ha mostrato un rapporto cortisolo/DHEA molto basso. Allo stesso modo, un animale resiliente, risultato secondo le analisi in un periodo post-infezione dai virus dell'influenza aviaria e della west Nile, ha mostrato elevate concentrazioni di DHEA. Nel gruppo CTRL, gli adulti che vivevano insieme in una grande voliera da più di sei anni, ed apparivano ben adattati alla vita in cattività, mostravano alte concentrazioni di DHEA e un basso rapporto cortisolo/DHEA. I livelli ormonali riscontrati, se considerati caso per caso, possono suggerire un ruolo del DHEA nella protezione contro le conseguenze negative dello stress come descritto nell'uomo (Hu et al., 2000) considerando che, più avanti nel tempo, le concentrazioni di DHEA potrebbero avere un calo come segno iniziale di esaurimento surrenale.

6.5 Conclusioni

Con questo lavoro, abbiamo per la prima volta dimostrato che, sia il cortisolo che il DHEA possono essere misurati con successo nel piumaggio del grifone con la metodologia presentata sopra, mettendo così a disposizione un metodo per ottenere una valutazione retrospettiva a lungo termine dello stato ormonale in questa specie. Le concentrazioni di cortisolo, DHEA e di altri ormoni nelle penne potrebbe rappresentare uno strumento per valutare il benessere delle specie a rischio, pertanto è necessario eseguire ulteriori studi sulla valutazione della concentrazione ormonale dell'asse HPA.

Ringraziamenti: Si ringrazia per la collaborazione il Prof. Leoni Giovanni, il dottor Mereu Paolo, la dottoressa Satta Valentina, il dottor Muzzeddu Marco, il Sig. Campus Alfonso.

Bibliografia

- AGOSTINI, N. 2004. Additional observations of age-dependent migration behaviour in western honey buzzards *Pernis apivorus*. *Journal of Avian Biology*, **35**: 469-470.
- AGOSTINI, N., G. PREMUDA, U. MELLONE, M. PANUCCIO, D. LOGOZZO, E. BASSI AND L. COCCHI. 2005. Influence of Wind and Geography on Orientation Behavior of Adult Honey Buzzards *Pernis apivorus* During Migration Over Water. *Acta Ornithologica*, **40**: 71-74.
- ALEXANDER, R. M. 1981. Factors of safety in the structure of animals. *Sci Prog*, **67**: 109-30.
- ALEXANDER, R. M. 1983. *Animal mechanics*, Blackwell Scientific, Oxford.
- AMMANN, P. AND R. RIZZOLI. 2003. Bone strength and its determinants. *Osteoporosis International*, **14**: 13-18.
- ANASTASIOS, L. AND M. PANAGIOTA. 2009. *The Red Book of endangered animals of Greece*, Athens, GR : Hellenic Zoological Society, 2009.
- ANDERS, A. D., D. C. DEARBORN, J. FAABORG AND F. R. THOMPSON III. 1997. Juvenile survival in a population of Neotropical migrant birds. *Conservation Biology*, **11**: 698-707.
- ARNOLD, K. E., K. J. ORR AND R. GRIFFITHS. 2003. Primary sex ratios in birds: problems with molecular sex identification of undeveloped eggs. *Mol Ecol*, **12**: 3451-8.
- ARSHAD, M., I. PEDALL, J. GONZALEZ, M. WINK, O. HATZOFE, A. A. KHAN AND T. OSBORNE. 2009. Genetic Variation of Four Gyps Species (*Gyps bengalensis*, *G. africanus*, *G. indicus* and *G. fulvus*) Based on Microsatellite Analysis. *Journal of Raptor Research*, **43**: 227-236.
- AVISE, J. C. 2001. *Phylogeography: the history and formation of species*, Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- BARONCELLI, G. I., S. BERTELLONI, C. CECCARELLI AND G. SAGGESE. 1998. Measurement of volumetric bone mineral density accurately determines degree of lumbar undermineralization in children with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**: 3150-4.
- BEER, F. P., E. R. JOHNSTON AND J. T. DEWOLF. 2006. *Mechanics of materials*, McGraw-Hill Higher Education, Boston.
- BERNIS, F. 1983. *Migration of the Common Griffon Vulture in the Western Palearctic*, University of California Press, Berkeley.
- BIBER, E. 2002. Patterns of endemic extinctions among island bird species. *Ecography*, **25**: 661-676.
- BIEWENER, A. A. 1982. Bone strength in small mammals and bipedal birds: do safety factors change with body size? *J Exp Biol*, **98**: 289-301.
- BIEWENER, A. A. AND K. P. DIAL. 1995. In-Vivo Strain in the Humerus of Pigeons (*Columba-Livia*) during Flight. *Journal of Morphology*, **225**: 61-75.
- BIJLSMA, R. G. (1987) Bottleneck areas for migratory birds in the Mediterranean region : an assessment of the problems and recommendations for action. (INTERNATIONAL COUNCIL FOR BIRD, P., ed.). ICBP, Cambridge.
- BILDSTEIN, K. L. 2006. *Migrating raptors of the world : their ecology & conservation*, Cornell University Press, Ithaca, N.Y.
- BILDSTEIN, K. L., M. J. BECH, C. FARMER AND L. NEWCOMB. 2009. Narrow sea crossings present major obstacles to migrating Griffon Vultures *Gyps fulvus*. *Ibis*, **151**: 382-391.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL (2018) Species factsheet: *Gyps fulvus*.
- BLACKBURN, T. M., P. CASSEY, R. P. DUNCAN, K. L. EVANS AND K. J. GASTON. 2004. Avian extinction and mammalian introductions on oceanic islands. *Science*, **305**: 1955-8.
- BLAUER, K. L., M. POTH, W. M. ROGERS AND E. W. BERNTON. 1991. Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinology*, **129**: 3174-9.

- BOEV, Z. (2010) Disappeared mammals of Bulgaria. In: *Educational Program 2010*. National Museum of Natural History, Bulgarian Academy of Sciences.
- BOHRER, G., D. BRANDES, J. T. MANDEL, K. L. BILDSTEIN, T. A. MILLER, M. LANZONE, T. KATZNER, C. MAISONNEUVE AND J. A. TREMBLAY. 2012. Estimating updraft velocity components over large spatial scales: contrasting migration strategies of golden eagles and turkey vultures. *Ecol Lett*, **15**: 96-103.
- BORTOLOTTI, G. R., T. MARCHANT, J. BLAS AND S. CABEZAS. 2009. Tracking stress: localisation, deposition and stability of corticosterone in feathers. *J Exp Biol*, **212**: 1477-82.
- BORTOLOTTI, R. G., T. A. MARCHANT, J. BLAS AND T. GERMAN. 2008. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology*, **22**: 494-500.
- BROOK, B. W., D. W. TONKYN, J. J. O'GRADY AND R. FRANKHAM. 2002. Contribution of Inbreeding to Extinction Risk in Threatened Species. *Conservation Ecology*, **6**.
- BROWN, C. J. 1988. A study of the Bearded vulture in Southern Africa. Unpublished PhD thesis., University of Natal.
- BRUFORD, M. W., D. G. BRADLEY AND G. LUIKART. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, **4**: 900.
- BRUFORD, M. W. AND S. J. TOWNSEND. 2006. *Mitochondrial DNA diversity in modern sheep: Implications for domestication*, University of California Press, CA, USA.
- CAMIÑA, A., J. MAYOL AND J. MUNTANER. 2015. *El Buitre leonado Gyps fulvus en islas del Mediterráneo: Colonización y asentamiento en las Islas Baleares*, Govern de les Illes Balears. Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient i Territori.
- CARAVANO, L. (2017) Aritzò: ecco le fosse-trappola dove venivano catturati i grifoni. In: *La Nuova Sardegna*.
- CARENTI, G. AND B. WILKENS. 2006. La colonizzazione fenicia e punica e il suo influsso sulla fauna sarda. *Sardinia, Corsica Et Baleares Antiquae: An International Journal of Archaeology*, **4**: 17.
- CARL, R. A. 1987. Age-Class Variation in Foraging Techniques by Brown Pelicans. *The Condor*, **89**: 525-533.
- CARLSON, K. J., D. M. DORAN-SHEEHY, K. D. HUNT, T. NISHIDA, A. YAMANAKA AND C. BOESCH. 2006. Locomotor behavior and long bone morphology in individual free-ranging chimpanzees. *J Hum Evol*, **50**: 394-404.
- CARRIER, D. AND L. R. LEON. 1990. Skeletal growth and function in the California gull (*Larus californicus*). *Journal of Zoology*, **222**: 375-389.
- CARTER, D. R., M. WONG AND T. E. ORR. 1991. Musculoskeletal ontogeny, phylogeny, and functional adaptation. *J Biomech*, **24 Suppl 1**: 3-16.
- CHIAPPE, L. M. 2004. The closest relatives of birds. *Ornitologia Neotropical*, **15**: 101-116.
- CHIN, D. D., L. Y. MATLOFF, A. K. STOWERS, E. R. TUCCI AND D. LENTINK. 2017. Inspiration for wing design: how forelimb specialization enables active flight in modern vertebrates. *Journal of the Royal Society Interface*, **14**.
- CLARK, G. A. 1979. Body Weights of Birds: A Review. *The Condor*, **81**: 193-202.
- CLOSE, R. A. AND E. J. RAYFIELD. 2012. Functional Morphometric Analysis of the Furcula in Mesozoic Birds. *Plos One*, **7**.
- COMIN, A., T. PERIC, M. CORAZZIN, M. C. VERONESI, T. MELONI, V. ZUFFERLI, G. CORNACCHIA AND A. PRANDI. 2013. Hair cortisol as a marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in Friesian dairy cows clinically or physiologically compromised. *Livestock Science*, **152**: 36-41.
- CRAMP, S. AND K. E. L. SIMMONS. 1980. *Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa: the birds of the Western Palearctic*, Oxford University Press.
- CURREY, J. D. 1960. Differences in the blood-supply of bone of different histological types. *J Microscopical Sci*, **101**: 351-370.
- CURREY, J. D. 2002. *Bones : structure and mechanics*, Princeton University Press, Princeton, NJ.

- CURREY, J. D. 2003. The many adaptations of bone. *J Biomech*, **36**: 1487-95.
- CURREY, J. D. AND R. M. ALEXANDER. 1985. The Thickness of the Walls of Tubular Bones. *Journal of Zoology*, **206**: 453-468.
- DAEGLING, D. J. 2002. Estimation of torsional rigidity in primate long bones. *J Hum Evol*, **43**: 229-239.
- DANCHIN, E., D. HEG AND B. DOLIGEZ. 2001. *Public information and breeding habitat selection*.
- DE MARGERIE, E. 2002. Laminar bone as an adaptation to torsional loads in flapping flight. *Journal of Anatomy*, **201**: 521-526.
- DE MARGERIE, E., S. SANCHEZ, J. CUBO AND J. CASTANET. 2005. Torsional resistance as a principal component of the structural design of long bones: Comparative multivariate evidence in birds. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, **282A**: 49-66.
- DE RICQLÉS, P., F. J. MEUNIER, C. J. AND F.-V. H. 1991. *Comparative microstructure of bone*, Boston, MA: CRC Press.
- DEL MORAL, J. C. 2001. *El buitre leonado en la Península Ibérica.*, SEO/BirdLife, Madrid.
- DEMES, B., W. L. JUNGERS AND K. SELPIEN. 1991. Body size, locomotion, and long bone cross-sectional geometry in indriid primates. *Am J Phys Anthropol*, **86**: 537-47.
- DIAL, K. P. 1992. Activity patterns of the wing muscles of the pigeon (*Columba livia*) during different modes of flight. *Journal of Experimental Zoology*, **262**: 357-373.
- DONÁZAR, J. AND C. FERNÁNDEZ. 1990. Population trends of the Griffon Vulture *Gyps fulvus* in northern Spain between 1969 and 1989 in relation to conservation measures. *Biol. Conserv.*, **53**: 83-91.
- DONÁZAR, J. A. 1993. *Los Buitres Ibericos, Biología y Conservacion*, Madrid.
- DOUBE, M., M. M. KLOSOWSKI, I. ARGANDA-CARRERAS, F. P. CORDELIERES, R. P. DOUGHERTY, J. S. JACKSON, B. SCHMID, J. R. HUTCHINSON AND S. J. SHEFELBINE. 2010. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*, **47**: 1076-9.
- DRUMMOND, A. J., M. A. SUCHARD, D. XIE AND A. RAMBAUT. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol*, **29**: 1969-73.
- DUMONT, E. R. 2010. Bone density and the lightweight skeletons of birds. *Proc Biol Sci*, **277**: 2193-8.
- DURIEZ, O., B. ELIOTOUT AND F. SARRAZIN. 2011. Age identification of Eurasian Griffon Vultures *Gyps fulvus* in the field. *Ringing & Migration*, **26**: 24-30.
- DURIEZ, O., A. KATO, C. TROMP, G. DELL'OMO, A. L. VYSSOTSKI, F. SARRAZIN AND Y. ROPERT-COUDERT. 2014. How Cheap Is Soaring Flight in Raptors? A Preliminary Investigation in Freely-Flying Vultures. *Plos One*, **9**.
- ENLOW, D. H. AND S. O. BROWN. 1957. A comparative histological study of fossil and recent bone tissue. Part II. *Texas Journal of Science* **9**: 186-214.
- EVANS, H. E. AND J. B. HEISER. 2004. *What's inside: Anatomy and physiology.*, Princeton University Press.
- FAIRHURST, G. D., M. D. FREY, J. F. REICHERT, I. SZELEST, D. M. KELLY AND G. R. BORTOLOTTI. 2011. Does Environmental Enrichment Reduce Stress? An Integrated Measure of Corticosterone from Feathers Provides a Novel Perspective. *PLOS ONE*, **6**.
- FAJARDO, R. J., E. HERNANDEZ AND P. M. O'CONNOR. 2007. Postcranial skeletal pneumaticity: a case study in the use of quantitative microCT to assess vertebral structure in birds. *J Anat*, **211**: 138-47.
- FERGUSON-LEES, J. AND D. A. CHRISTIE. 2001. *Raptors of the World*, Harcour.
- FERRER, M., M. DE LUCAS, G. F. E. JANSS, E. CASADO, A. R. MUÑOZ, M. J. BECHARD AND C. P. CALABUIG. 2012. Weak relationship between risk assessment studies and recorded mortality in wind farms. *Journal of Applied Ecology*, **49**: 38-46.
- FORSMAN, D. 1999. *The raptors of Europe and the Middle East: a handbook of field identification*, Christopher Helm, London.

- FRANKHAM, R. 1995. Inbreeding and Extinction: A Threshold Effect. *Conservation Biology*, **9**: 792-799.
- FRANKHAM, R. 2005. Conservation Biology: Ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity. *Heredity*, **95**: 183.
- FRANKHAM, R. AND J. KINGSOLVER. 2004. Responses to environmental change: adaptation or extinction. *Evolutionary conservation biology*: 85-100.
- GALUPPI, R., J. F. LEVEQUE, V. BEGHELLI, C. BONOLI, M. MATTIOLI, F. OSTANELLO, M. P. TAMPIERI AND P. A. ACCORSI. 2013. Cortisol levels in cats' hair in presence or absence of *Microsporium canis* infection. *Res Vet Sci*, **95**: 1076-80.
- GONZÁLEZ-SOLÍS, J. AND P. BECKER. 2002. Mounting frequency and number of cloacal contacts increase with age in common terns *Sterna hirundo*. *Journal of Avian Biology*, **33**: 306-310.
- GOODYER, I. M., J. HERBERT AND P. M. ALTHAM. 1998. Adrenal steroid secretion and major depression in 8- to 16-year-olds, III. Influence of cortisol/DHEA ratio at presentation on subsequent rates of disappointing life events and persistent major depression. *Psychol Med*, **28**: 265-73.
- GRIESINGER, J. (1998) Juvenile dispersion and migration among Griffon Vultures *Gyps fulvus* in Spain. In: *Holarctic birds of prey* (CHANCELLOR R. D., M. B.-U., FERRERO J. J., ed.), pp. 680. ADENEX & WWGBP, Mérida & Berlin.
- GUTZWILLER, S. C., A. SU AND P. M. O'CONNOR. 2013. Postcranial pneumaticity and bone structure in two clades of neognath birds. *Anat Rec (Hoboken)*, **296**: 867-76.
- HABIB, M. B. AND C. B. RUFF. 2008. The effects of locomotion on the structural characteristics of avian limb bones. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **153**: 601-624.
- HAIG, S. M. 1998. Molecular Contributions to Conservation. *Ecology*, **79**: 413-425.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95-98.
- HARD, D. L. AND A. G. CLARK. 1997. *Principles of Population Genetics*, USA: Sinauer Associate.
- HAREL, R., N. HORVITZ AND R. NATHAN. 2016. Adult vultures outperform juveniles in challenging thermal soaring conditions. *Scientific Reports*, **6**: 27865.
- HARMS, N. J., P. LEGAGNEUX, H. GILCHRIST, J. BÉTY, O. P. LOVE, M. FORBES, G. R. BORTOLOTTI AND C. SOOS. 2015. Feather corticosterone reveals effect of moulting conditions in the autumn on subsequent reproductive output and survival in an Arctic migratory bird. *Proc Biol Sci*, **282**.
- HARRIMAN, V. B., R. D. DAWSON, R. G. CLARK, G. D. FAIRHURST AND G. R. BORTOLOTTI. 2014. Effects of ectoparasites on seasonal variation in quality of nestling Tree Swallows (*Tachycineta bicolor*). *Canadian Journal of Zoology*, **92**: 87-96.
- HARRISON, S. AND R. NOSS. 2017. Endemism hotspots are linked to stable climatic refugia. *Annals of Botany*, **119**: 207-214.
- HECHTER, O., A. GROSSMAN AND R. T. CHATTERTON, JR. 1997. Relationship of dehydroepiandrosterone and cortisol in disease. *Med Hypotheses*, **49**: 85-91.
- HEDRICK, P. W. 1995. Elephant Seals and the Estimation of a Population Bottleneck. *Journal of Heredity*, **86**: 232-235.
- HEDRICK, P. W. 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution*, **16**: 629-636.
- HINKLE, D. E., S. G. JURIS AND W. WIERSMA. 2003. *Applied statistics for the behavioral sciences*, Houghton Mifflin, Boston, Mass.
- HOUSTON, D. 1983. The adaptive radiation of the Griffon vultures. *Vulture Biology and management University of California Press, Berkley*: pp. 135-152.
- HOUSTON, D. 2001. *Vultures and Condors*, Colin Baxter Ltd., Grantown on Spey, Scotland.
- HOYO, J. D., N. J. COLLAR, D. A. CHRISTIE, A. ELLIOTT, L. D. C. FISHPOOL, R. ALLEN AND BIRDLIFE INTERNATIONAL (2014) HBW and BirdLife International illustrated checklist of the birds of the world. Lynx Edicions,, Barcelona.

- HU, Y., A. CARDOUNEL, E. GURSOY, P. ANDERSON AND M. KALIMI. 2000. Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone: protection of rats against repeated immobilization stress-induced weight loss, glucocorticoid receptor production, and lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*, **59**: 753-62.
- HUI, C. A. 2002. Avian furcula morphology may indicate relationships of flight requirements among birds. *Journal of Morphology*, **251**: 284-293.
- IUCN (2018) The IUCN Red List of Threatened Species. In: *Version 2018-1*.
- JAMES, J. E., R. LANFEAR AND A. EYRE-WALKER. 2016. Molecular Evolutionary Consequences of Island Colonization. *Genome biology and evolution*, **8**: 1876-1888.
- JENNI-EIERMANN, S., F. HELFENSTEIN, A. VALLAT, G. GLAUSER AND L. JENNI. 2015. Corticosterone: effects on feather quality and deposition into feathers. *Methods in Ecology and Evolution*, **6**: 237-246.
- JOHNSON, J. A., H. R. L. LERNER, P. C. RASMUSSEN AND D. P. MINDELL. 2006. Systematics within Gyps vultures: a clade at risk. *BMC Evolutionary Biology*, **6**: 65.
- JOHNSON, T. H. AND A. J. STATTERSFIELD. 1990. A global review of island endemic birds. *Ibis*, **132**: 167-180.
- JUNGERS, W. L. AND R. J. MINNS. 1979. Computed tomography and biomechanical analysis of fossil long bones. *Am J Phys Anthropol*, **50**: 285-90.
- KALIMI, M., Y. SHAFAGOJ, R. LORIA, D. PADGETT AND W. REGELSON. 1994. Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mol Cell Biochem*, **131**: 99-104.
- KALMAR, A. AND D. CURRIE. 2006. A global model of island biogeography. *Global Ecology and Biogeography*, **15**: 72-81.
- KELLER, L. F. AND D. M. WALLER. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**: 230-241.
- KENNEDY, E. A., C. LATTIN, L. ROMERO AND D. DEARBORN. 2013. Feather coloration in museum specimens is related to feather corticosterone. *Behav Ecol Sociobiol*, **67**: 341-348.
- KERLINGER, P. 1989. *Flight strategies of migrating hawks*, University of Chicago Press, Chicago.
- KIER, G., H. KREFT, T. M. LEE, W. JETZ, P. L. IBISCH, C. NOWICKI, J. MUTKE AND W. BARTHLOTT. 2009. A global assessment of endemism and species richness across island and mainland regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**: 9322-7.
- KIRKPATRICK, S. J. 1994. Scale Effects on the Stresses and Safety Factors in the Wing Bones of Birds and Bats. *Journal of Experimental Biology*, **190**: 195-215.
- KITAYSKY, A. S., E. V. KITAIKAIA, J. F. PIATT AND J. C. WINGFIELD. 2003. Benefits and costs of increased levels of corticosterone in seabird chicks. *Horm Behav*, **43**: 140-9.
- KOREN, L., S. NAKAGAWA, T. BURKE, K. K. SOMA, K. E. WYNNE-EDWARDS AND E. GEFFEN. 2012. Non-breeding feather concentrations of testosterone, corticosterone and cortisol are associated with subsequent survival in wild house sparrows. *Proc Biol Sci*, **279**: 1560-6.
- KOUWENBERG, A.-L., J. MARK HIPFNER, D. W. MCKAY AND A. E. STOREY. 2013. Corticosterone and stable isotopes in feathers predict egg size in Atlantic Puffins *Fratercula arctica*. *Ibis*, **155**: 413-418.
- KREFT, H., W. JETZ, J. MUTKE, G. KIER AND W. BARTHLOTT. 2008. Global diversity of island floras from a macroecological perspective. *Ecol Lett*, **11**: 116-27.
- KSEPKA, D. AND J. CLARKE. 2015. Phylogenetically vetted and stratigraphically constrained fossil calibrations within Aves. *Palaeontologia Electronica*, **18**.
- KUMAR, S., G. STECHER AND K. TAMURA. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**: 1870-1874.
- L'ALTRA BOSA (2006) <http://laltrabosa.com/> ; Alfonso Campus.
- LABRIE, F., V. LUU-THE, C. MARTEL, A. CHERNOMORETZ, E. CALVO, J. MORISSETTE AND C. LABRIE. 2006. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an anabolic steroid like dihydrotestosterone (DHT), the most potent natural androgen, and tetrahydrogestrinone (THG). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **100**: 52-58.

- LANDYS, M. M., M. RAMENOFSKY AND J. C. WINGFIELD. 2006. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *Gen Comp Endocrinol*, **148**: 132-49.
- LARKIN, M. A., G. BLACKSHIELDS, N. P. BROWN, R. CHENNA, P. A. MCGETTIGAN, H. MCWILLIAM, F. VALENTIN, I. M. WALLACE, A. WILM, R. LOPEZ, J. D. THOMPSON, T. J. GIBSON AND D. G. HIGGINS. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**: 2947-2948.
- LE GOUAR, P., F. RIGAL, M. C. BOISSELIER-DUBAYLE, F. SARRAZIN, C. ARTHUR, J. P. CHOISY, O. HATZOFE, S. HENRIQUET, P. LÉCUYER, C. TESSIER, G. SUSIC AND S. SAMADI. 2008. Genetic variation in a network of natural and reintroduced populations of Griffon vulture (*Gyps fulvus*) in Europe. *Conservation Genetics*, **9**: 349-359.
- LELOVAS, P. P., T. T. XANTHOS, S. E. THOMA, G. P. LYRITIS AND I. A. DONTAS. 2008. The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comparative Medicine*, **58**: 424-430.
- LEVINE, M. (1983) La fauna di Filiestru (trincea D). In: *La grotta di Filiestru a Bonu Ighinu, Mara (SS)* (TRUMP, D. H., ed.), pp. 109-131. Sassari.
- LI, B., G. LIU, L. ZHOU AND C. GU. 2015. Complete mitochondrial genome of Cinereous vulture *Aegyptius monachus* (Falconiformes: Accipitridae). *Mitochondrial DNA*, **26**: 910-911.
- LIBRADO, P. AND J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**: 1451-1452.
- LINDHE NORBERG, U. M. 2002. Structure, form, and function of flight in engineering and the living world. *J Morphol*, **252**: 52-81.
- LOCHMULLER, E. M., P. MILLER, D. BURKLEIN, U. WEHR, W. RAMBECK AND F. ECKSTEIN. 2000. In situ femoral dual-energy X-ray absorptiometry related to ash weight, bone size and density, and its relationship with mechanical failure loads of the proximal femur. *Osteoporos Int*, **11**: 361-7.
- LOCKE, M. 2004. Structure of long bones in mammals. *J Morphol*, **262**: 546-65.
- LOEHLE, C. AND W. ESCHENBACH. 2012. Historical bird and terrestrial mammal extinction rates and causes. *Diversity and Distributions*, **18**: 84-91.
- LOHSE, M., O. DRECHSEL, S. KAHLAU AND R. BOCK. 2013. OrganellarGenomeDRAW--a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. *Nucleic Acids Res*, **41**: W575-81.
- LOUCHAR, A. (2002) Les oiseaux du Pléistocène de Corse y de quelques localités sardes. Écologie, évolution, biogéographie e extinctions. In: *Documents des Laboratoires de Géologie*, pp. 288. Lyon
- LYDEKKER, R. 1890. On the remains of some large extinct birds from the cavern-deposits of Malta. *Proc. Zool. Soc. London*, **28**: 9.
- LYDEKKER, R. 1891. *Gyps melitensis*, Lydekker - *Catalogue of the fossil birds in the British Museum (Natural History)*, Printed by order of the Trustees, London.
- MADSEN, T., R. SHINE, M. OLSSON AND H. WITZELL. 1999. Restoration of an inbred adder population. *Nature*, **402**: 34.
- MANINGER, N., O. M. WOLKOWITZ, V. I. REUS, E. S. EPEL AND S. H. MELLON. 2009. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol*, **30**: 65-91.
- MANSFIELD, K. G. AND E. D. LAND. 2002. Cryptorchidism in Florida panthers: prevalence, features, and influence of genetic restoration. *Journal of Wildlife Diseases*, **38**: 693-698.
- MARELLI, C. A. AND E. L. SIMONS. 2014. Microstructure and cross-sectional shape of limb bones in Great Horned Owls and Red-tailed Hawks: how do these features relate to differences in flight and hunting behavior? *PLoS One*, **9**.
- MARGALIDA, A. AND P. OLIVA-VIDAL. 2017. The shadow of diclofenac hangs over European vultures. *Nature Ecology & Evolution*, **1**: 1050-1050.

- MARKANDYA, A., T. TAYLOR, A. LONGO, M. N. MURTY, S. MURTY AND K. DHAVALA. 2018. Counting the Cost of Vulture Declines - Economic Appraisal of the Benefits of the Gyps Vulture in India. *Ecol. Econ.*, **67**: 194-204.
- MARTIN, G., S. PORTUGAL, CAMPBELL AND C. MURN. 2012. Visual fields, foraging and collision vulnerability in Gyps vultures. *Ibis*, **154**: 626-631.
- MARTIN, R. B., D. B. BURR AND N. A. SHARKEY. 1998. *Skeletal tissue mechanics*, Springer, New York.
- MARUSSI. 2002. *La fauna in Italia*.
- MATEO-TOMÁS, P. AND P. OLEA. 2011. The importance of social information in breeding site selection increases with population size in the Eurasian Griffon Vulture *Gyps fulvus*. *Ibis*, **153**: 832–845.
- MC EWEN, B. AND C. J. WINGFIELD. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav*, **43**: 2-15.
- MC EWEN, B. S. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, **87**: 873-904.
- MCKAY, J. K., C. E. CHRISTIAN, S. HARRISON AND K. J. RICE. 2005. “How Local Is Local?”—A Review of Practical and Conceptual Issues in the Genetics of Restoration. *Restoration Ecology*, **13**: 432-440.
- MEITERN, R., E. SILD, M.-A. LIND, M. MÄNNISTE, T. SEPP, U. KARU AND P. HÖRAK. 2013. Effects of Endotoxin and Psychological Stress on Redox Physiology, Immunity and Feather Corticosterone in Greenfinches. *PLOS ONE*, **8**: e67545.
- MEREU, P., V. SATTÀ, G. N. FRONGIA, F. BERLINGUER, M. MUZZEDDU, A. CAMPUS, L. DECANDIA, M. PIRASTRU, L. MANCA, S. NAITANA AND G. G. LEONI. 2017. The complete mtDNA sequence of the griffon vulture (*Gyps fulvus*): Phylogenetic analysis and haplotype frequency variations after restocking in the Sardinian population. *Biological Conservation*, **214**: 195-205.
- MLÍKOVSKÝ, J. 2018. Middle Pleistocene birds of Hundsheim, Austria. *Journal of the National Museum (Prague). Natural History Series*, **177**: 69-82.
- MO, C. 2015. A Fascinating Example for Convergent Evolution: Endangered Vultures. *J Biodivers Endanger Species*, **2**.
- MORMEDE, P., S. ANDANSON, B. AUUPERIN, B. BEERDA, D. GUEMENE, J. MALMKVIST, X. MANTECA, G. MANTEUFFEL, P. PRUNET, C. G. VAN REENEN, S. RICHARD AND I. VEISSIER. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav*, **92**: 317-39.
- MOUGEOT, F., J. MARTINEZ-PADILLA, G. R. BORTOLOTTI, L. M. WEBSTER AND S. B. PIERTNEY. 2010. Physiological stress links parasites to carotenoid-based colour signals. *J Evol Biol*, **23**: 643-50.
- MUNDY, P., D. BUTCHART, J. LEDGER AND S. E. PIPER. 1992. *The Vultures of Africa*, Academic Press.
- NAIDOO, V. AND G. E. SWAN. 2009. Diclofenac toxicity in Gyps vulture is associated with decreased uric acid excretion and not renal portal vasoconstriction. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **149**: 269-74.
- NAWROCKI, S. (1997) *Cleaning Bones*. Archeology & Forensics Laboratory, University of Indianapolis.
- NEWMAN, A. E., D. S. PRADHAN AND K. K. SOMA. 2008. Dehydroepiandrosterone and corticosterone are regulated by season and acute stress in a wild songbird: jugular versus brachial plasma. *Endocrinology*, **149**: 2537-45.
- NEWMAN, A. E. AND K. K. SOMA. 2009. Corticosterone and dehydroepiandrosterone in songbird plasma and brain: effects of season and acute stress. *Eur J Neurosci*, **29**: 1905-14.
- NEWMAN, A. E., L. Y. ZANETTE, M. CLINCHY, N. GOODENOUGH AND K. K. SOMA. 2013. Stress in the wild: chronic predator pressure and acute restraint affect plasma DHEA and corticosterone levels in a songbird. *Stress*, **16**: 363-7.

- NEWMAN, B. G. 1958. Soaring and Gliding Flight of the Black Vulture. *Journal of Experimental Biology*, **35**: 280-285.
- NEWTON, I. 1979. *Population Ecology of Raptors*, Buteo Books, Vermillion, SD.
- NEWTON, I. 2009. Moulting and plumage. *Ringed & Migration*, **24**: 220-226.
- NORBERG, R. Å. AND B. S. W. ALDRIN. 2010. Scaling for stress similarity and distorted-shape similarity in bending and torsion under maximal muscle forces concurs with geometric similarity among different-sized animals. *Journal of Experimental Biology*, **213**: 2873-2888.
- NORBERG, U. M. (1990) Vertebrate flight: mechanics, physiology, morphology, ecology and evolution. In: *Zoophysiology*, pp. xiv, 291. Springer-Verlag, Berlin.
- NOVAK, M. A., A. F. HAMEL, K. COLEMAN, C. K. LUTZ, J. WORLEIN, M. MENARD, A. RYAN, K. ROSENBERG AND J. S. MEYER. 2014. Hair loss and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, **53**: 261-6.
- NUDDS, R. L., G. W. KAISER AND G. J. DYKE. 2011. Scaling of avian primary feather length. *PLoS One*, **6**: e15665.
- O'CONNOR, P. M. 2009. Evolution of archosaurian body plans: skeletal adaptations of an air-sac-based breathing apparatus in birds and other archosaurs. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, **311**: 629-46.
- OAKS, J. L., M. GILBERT, M. Z. VIRANI, R. T. WATSON, C. U. METEYER, B. A. RIDEOUT, H. L. SHIVAPRASAD, S. AHMED, M. J. IQBAL CHAUDHRY, M. ARSHAD, S. MAHMOOD, A. ALI AND A. AHMED KHAN. 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, **427**: 630.
- OGADA, D. L., F. KEESING AND M. Z. VIRANI. 2012. Dropping dead: causes and consequences of vulture population declines worldwide. *Ann N Y Acad Sci*, **1249**: 57-71.
- ORTA, J., G. M. KIRWAN, P. BOESMAN AND E. F. J. GARCIA. 2015. *Griffon Vulture (Gyps fulvus) - Handbook of the Birds of the World Alive*, Barcelona.
- P LOVE, O., C. BREUNER, F. VÉZINA AND T. D WILLIAMS. 2004. Mediation of a corticosterone-induced reproductive conflict. *Horm Behav*, **46**: 59-65.
- PAIN, D., A. CUNNINGHAM, P. F. DONALD, J. W. DUCKWORTH, D. C. HOUSTON, T. KATZNER, J. PARRY-JONES, C. POOLE, V. PRAKASH, P. ROUND AND R. TIMMINS. 2003. Causes and Effects of Temporospatial Declines of Gyps Vultures in Asia. *Cons Biol*, **17**: 661-671.
- PARRA, J. AND J. L. TELLERÍA. 2004. The increase in the Spanish population of Griffon Vulture *Gyps fulvus* during 1989–1999: effects of food and nest site availability. *Bird Conservation International*, **14**: 33-41.
- PENNYCUICK, C. J. 1983. Thermal Soaring Compared in Three Dissimilar Tropical Bird Species, *Fregata Magnificens*, *Pelecanus Occidentalis* and *Coragyps Atratus*. *Journal of Experimental Biology*, **102**: 307-325.
- PENNYCUICK, C. J. 2008. *Modelling the flying bird*, Academic Press, Amsterdam and London.
- PENNYCUICK, C. J. AND K. D. SCHOLEY. 1984. Flight behavior of Andean Condors *Vultur gryphus* and Turkey Vultures *Cathartes aura* around the Paracas Peninsula, Peru. *Ibis*, **126**: 253-256.
- PIMM, S. L., H. L. JONES AND J. DIAMOND. 1988. On the Risk of Extinction. *The American Naturalist*, **132**: 757-785.
- POISBLEAU, M., A. LACROIX AND O. CHASTEL. 2009. DHEA levels and social dominance relationships in wintering brent geese (*Branta bernicla bernicla*). *Behav Processes*, **80**: 99-103.
- PONTON, F., L. MONTES, J. CASTANET AND J. CUBO. 2007. Bone histological correlates of high-frequency flapping flight and body mass in the furculae of birds: a phylogenetic approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**: 729-738.
- PRAKASH, V., D. PAIN, A. CUNNINGHAM, P. F. DONALD, N. PRAKASH, A. VERMA, R. GARGI, S. S AND A. RAHMANI. 2003. Catastrophic collapse of Indian White-backed *Gyps bengalensis* and Long-billed *Gyps indicus* Vulture populations. *Biol Conserv*, **109**: 381-390.

- PRINZINGER, R., B. NAGEL, O. BAHAT, R. BÖGEL, E. KARL, D. WEIHS AND C. WALZER. 2002. Energy metabolism and body temperature in the Griffon Vulture (*Gyps fulvus*) with comparative data on the Hooded Vulture (*Necrosyrtes monachus*) and the White-backed Vulture (*Gyps africanus*). *Journal für Ornithologie*, **143**: 456-467.
- PROCTOR, N. S. AND P. J. LYNCH. 1993. *Manual of ornithology: avian structure & function*, Yale University Press, New Haven and London.
- QIAO, S., X. LI, S. ZILIOLO, Z. CHEN, H. DENG, J. PAN AND W. GUO. 2017. Hair Measurements of Cortisol, DHEA, and DHEA to Cortisol Ratio as Biomarkers of Chronic Stress among People Living with HIV in China: Known-Group Validation. *PLoS One*, **12**: e0169827.
- R. FRANKHAM, J. D. BALLOU AND D. A. BRISCOE. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge University Press.
- RAMBAUT, A., A. J. DRUMMOND, D. XIE, G. BAELE AND M. A. SUCHARD. 2018. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst Biol*, **67**: 901-904.
- RANABIR, S. AND K. REETU. 2011. Stress and hormones. *Indian J Endocrinol Metab*, **15**: 18-22.
- RAYNER, J. M. V. 1988. The Evolution of Vertebrate Flight. *Biological Journal of the Linnean Society*, **34**: 269-287.
- REED, D. H. AND R. FRANKHAM. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*, **17**: 230-237.
- ROBERTSON, B. AND C. MEATHREL. 2006. Do sampling rigor and methodology affect the genetic differentiation of threatened populations and resultant conservation strategies? A case study using Australia's Pacific Gull. *J. Ornithol.*, **147**: 18.
- ROBLING, A. G., A. B. CASTILLO AND C. H. TURNER. 2006. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*, **8**: 455-98.
- ROMERO, L. M. AND G. D. FAIRHURST. 2016. Measuring corticosterone in feathers: Strengths, limitations, and suggestions for the future. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **202**: 112-122.
- RONQUIST, F. AND J. P. HUELSENBECK. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**: 1572-4.
- RUFF, C. B. 2002. Long bone articular and diaphyseal structure in old world monkeys and apes. I: locomotor effects. *Am J Phys Anthropol*, **119**: 305-42.
- RUFF, C. B. AND W. C. HAYES. 1983. Cross-sectional geometry of Pecos Pueblo femora and tibiae--a biomechanical investigation: II. Sex, age, side differences. *Am J Phys Anthropol*, **60**: 383-400.
- RUXTON, G. D. AND D. C. HOUSTON. 2004. Obligate vertebrate scavengers must be large soaring fliers. *J Theor Biol*, **228**: 431-6.
- SÁNCHEZ MARCO, A. 2007. New occurrences of the extinct vulture *Gyps melitensis* (Falconiformes, Aves) and a reappraisal of the paleospecies. *Journal of Vertebrate Paleontology*, **27**: 1057-1061.
- SANNA, D., M. BARBATO, E. HADJISTERKOTIS, P. COSSU, L. DECANDIA, S. TROVA, M. PIRASTRU, G. G. LEONI, S. NAITANA, P. FRANCALACCI, B. MASALA, L. MANCA AND P. MEREU. 2015. The First Mitogenome of the Cyprus Mouflon (*Ovis gmelini ophion*): New Insights into the Phylogeny of the Genus *Ovis*. *PLOS ONE*, **10**: e0144257.
- SAPOLSKY, R. M., L. M. ROMERO AND A. U. MUNCK. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, **21**: 55-89.
- SARRAZIN, F., C. BAGNOLINP, J. L. PINNA AND E. DANCHIN. 1996. Breeding biology during establishment of a reintroduced Griffon Vulture *Gyps fulvus* population. *Ibis*, **138**: 315-325.
- SAVINO, N. 2018. Un progetto per salvare l'avvoltoio capovaccaio. *Il punto quotidiano*.
- SCHENK, H., A. M. AND N. S. 2007. Piano d'Azione per il Grifone (*Gyps fulvus*) in Sardegna. Cagliari.
- SCHNEIDER, C. A., W. S. RASBAND AND K. W. ELICEIRI. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth*, **9**: 671-675.

- SCHREIBER, R. W., G. E. WOOLFENDEN AND W. E. CURTSINGER. 1975. Prey Capture by the Brown Pelican *The Auk*, **92**: 649-654.
- SEKERCIOGLU, C. H. 2006. Increasing awareness of avian ecological function. *Trends Ecol Evol*, **21**: 464-71.
- SHULTZ, S., H. S. BARAL, S. CHARMAN, A. A. CUNNINGHAM, D. DAS, G. R. GHALSASI, M. S. GOUDAR, R. E. GREEN, A. JONES, P. NIGHOT, D. J. PAIN AND V. PRAKASH. 2004. Diclofenac poisoning is widespread in declining vulture populations across the Indian subcontinent. *Proc Biol Sci*, **271 Suppl 6**: S458-60.
- SILD, E., R. MEITERN, M. MANNISTE, U. KARU AND P. HORAK. 2014. High feather corticosterone indicates better coccidian infection resistance in greenfinches. *Gen Comp Endocrinol*, **204**: 203-10.
- SIMONS, E. L., T. L. HIERONYMUS AND P. M. O'CONNOR. 2011. Cross sectional geometry of the forelimb skeleton and flight mode in pelecaniform birds. *J Morphol*, **272**: 958-71.
- SIMONS, E. L. AND P. M. O'CONNOR. 2012. Bone laminarity in the avian forelimb skeleton and its relationship to flight mode: testing functional interpretations. *Anat Rec (Hoboken)*, **295**: 386-96.
- SKEDROS, J. G. AND K. J. HUNT. 2004. Does the degree of laminarity correlate with site-specific differences in collagen fibre orientation in primary bone? An evaluation in the turkey ulna diaphysis. *J Anat*, **205**: 121-34.
- SLACK, K. E., C. M. JONES, T. ANDO, G. L. HARRISON, R. E. FORDYCE, U. ARNASON AND D. PENNY. 2006. Early Penguin Fossils, Plus Mitochondrial Genomes, Calibrate Avian Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **23**: 1144-1155.
- SNOW, D., C. M. PERRINS AND R. GILLMOR. 1998. *The birds of the western Palearctic*, Oxford University Press, Oxford and New York.
- SORENSEN, M. D., J. C. AST, D. E. DIMCHEFF, T. YURI AND D. P. MINDELL. 1999. Primers for a PCR-Based Approach to Mitochondrial Genome Sequencing in Birds and Other Vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **12**: 105-114.
- SPIEGEL, O., R. HAREL, W. GETZ AND R. NATHAN. 2013. Mixed strategies of grifon vultures' (*Gyps fulvus*) response to food deprivation lead to a hump-shaped movement pattern. *Movement Ecology*, **1**.
- STARCK, J. M. AND A. CHINSAMY. 2002. Bone microstructure and developmental plasticity in birds and other dinosaurs. *Journal of Morphology*, **254**: 232-246.
- SULLIVAN, T. N., B. WANG, H. D. ESPINOSA AND M. A. MEYERS. 2017. Extreme lightweight structures: avian feathers and bones. *Materials Today*, **20**: 377-391.
- SUSIČ, E. AND I. GRABEC. 2000. Characterization of the grinding process by acoustic emission. *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, **40**: 225-238.
- SUŠIĆ, G. 2000. Regular Long-distance Migration of Eurasian Griffon *Gyps fulvus*.
- SWARTZ, S. M., M. B. BENNETT AND D. R. CARRIER. 1992. Wing Bone Stresses in Free Flying Bats and the Evolution of Skeletal Design for Flight. *Nature*, **359**: 726-729.
- TERBORGH, J. 1973. On the Notion of Favorableness in Plant Ecology. *The American Naturalist*, **107**: 481-501.
- TERRASSE, M. 2006. The movements of Griffon Vulture in France and Europe. *Ornithos* **13**: 273-299.
- TUCKER, V. A. 1995. Drag Reduction by Wing Tip Slots in a Gliding Harris Hawk, Parabuteo-unicinctus. *Journal of Experimental Biology*, **198**: 775-781.
- TURVEY, S. T. AND S. A. FRITZ. 2011. The ghosts of mammals past: biological and geographical patterns of global mammalian extinction across the Holocene. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **366**: 2564-76.
- VAN BEEST, F., L. VAN DEN BREMER, W. F. DE BOER, I. HEITKONIG AND A. E. MONTEIRO. 2008. Population dynamics and spatial distribution of Griffon Vultures (*Gyps fulvus*) in Portugal. *Bird Conservation International*, **18**: 102-117.

- VAN UUM, S. H., B. SAUVE, L. A. FRASER, P. MORLEY-FORSTER, T. L. PAUL AND G. KOREN. 2008. Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain: a novel biomarker for stress. *Stress*, **11**: 483-8.
- VAZQUEZ, R. J. 1994. The Automating Skeletal and Muscular Mechanisms of the Avian Wing (Aves). *Zoomorphology*, **114**: 59-71.
- WACHTER, N. J., G. D. KRISCHAK, M. MENTZEL, M. R. SARKAR, T. EBINGER, L. KINZL, L. CLAES AND P. AUGAT. 2002. Correlation of bone mineral density with strength and microstructural parameters of cortical bone in vitro. *Bone*, **31**: 90-5.
- WANG, X. AND J. A. CLARKE. 2015. The evolution of avian wing shape and previously unrecognized trends in covert feathering. *Proc Biol Sci*, **282**: 20151935.
- WARD, J., D. MCCAFFERTY, D. C. HOUSTON AND G. D. RUXTON. 2008. Why do vultures have bald heads? The role of postural adjustment and bare skin areas in thermoregulation. *Journal of Thermal Biology*, **33**: 168-173.
- WATANABE, J. 2011. Ontogenetic Changes of Morphology and Surface Texture of Long Bones in the Extant Gray Heron, *Ardea Cinerea* (Aves, Ardeidae)-a Fundamental Study for Ontogenetic Ageing. *Journal of Vertebrate Paleontology*, **31**: 212-212.
- WEICK, F. 1980. *Birds of prey of the world - in collaboration with Leslie H. Brown.*, Collins, London.
- WHITTAKER, R., K. TRIANTIS AND R. LADLE. 2008. A general dynamic theory of oceanic island biogeography. *Journal of Biogeography*, **35**: 977-994.
- WILKENS, B. 2003. La fauna sarda durante l'Olocene: le conoscenze attuali. Sardinia, Corsica et Baleares Antiquae. *Int. J. Archaeol.*, **1**: 17.
- WILLIAMS, S. E. AND D. W. HILBERT (Eds.) (2006) *Climate change as a threat to the biodiversity of tropical rainforests in Australia.*, Chicago, USA, University of Chicago Press.
- WINGFIELD, J. C. 2013. Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. *Functional Ecology*, **27**: 37-44.
- WINGFIELD, J. C., K. M. O'REILLY AND L. B. ASTHEIMER. 1995. Modulation of the Adrenocortical Responses to Acute Stress in Arctic Birds: A Possible Ecological Basis. *American Zoologist*, **35**: 285-294.
- WINGFIELD, J. C. AND L. ROMERO. 2000. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. *Comprehensive Physiology*, **4**: 211-236.
- WINGFIELD, J. C. AND R. M. SAPOLSKY. 2003. Reproduction and resistance to stress: when and how. *J Neuroendocrinol*, **15**: 711-24.
- WINK, M. (1995) Phylogeny of Old and New World Vultures (Aves: Accipitridae and Cathartidae) Inferred from Nucleotide Sequences of the Mitochondrial Cytochrome b Gene. In: *Zeitschrift für Naturforschung C*, pp. 868.
- WORCESTER, S. E. 1996. The scaling of the size and stiffness of primary flight feathers. *Journal of Zoology*, **239**: 609-624.
- WRIGHT, B. E., J. R. PORTER, E. S. BROWNE AND F. SVEC. 1992. Antigluco-corticoid action of dehydroepiandrosterone in young obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **16**: 579-83.
- WWF (2014) Il ritorno del monaco. In: <https://www.wwf.it/news/notizie/>. Roma.
- XIROUCHAKIS, S. M. 2010. Breeding biology and reproductive performance of Griffon Vultures *Gyps fulvus* on the island of Crete (Greece). *Bird Study*, **57**: 213-225.
- XIROUCHAKIS, S. M. AND G. ANDREOU. 2009. Foraging behaviour and flight characteristics of Eurasian griffons *Gyps fulvus* in the island of Crete, Greece. *Wildlife Biology*, **15**: 37-52.
- XIROUCHAKIS, S. M. AND M. MYLONAS. 2005. Status and structure of the griffon vulture (*Gyps fulvus*) population in Crete. *European Journal of Wildlife Research*, **51**: 223-231.
- YOUNG, W. C. 1989. *Roark's formulas for stress and strain*, McGraw-Hill, New York ; London.
- ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*, Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.
- ZEDER, M. 2008. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**: 11597-604.

ZUBEROGOITIA, I., J. DE LA PUENTE, J. ELORRIAGA, R. ALONSO, L. E. PALOMARES AND J. E. MARTÍNEZ. 2013. The Flight Feather Molt of Griffon Vultures (*Gyps fulvus*) and Associated Biological Consequences. *Journal of Raptor Research*, **47**: 292-303.

Tutta la documentazione fotografica è originale.