



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**Scuola di Dottorato di Ricerca in
SCIENZE BIOMOLECOLARI E BIOTECNOLOGICHE**

Indirizzo in BIOCHIMICA, BIOCHIMICA CLINICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

XXII Ciclo

Direttore: Prof. Bruno Masala



**STUDIO DELLA VARIABILITÀ GENETICA DI
SPECIE ANIMALI AUTOCTONE DELLA
SARDEGNA**



DOTTORANDA

Dott.ssa Valentina Satta

TUTOR

Dott. Giovanni Giuseppe Leoni

Anno Accademico 2008-2009

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	Metodi per la valutazione della variabilità genetica	4
1.1.1	I microsatelliti.	5
1.1.2	Vantaggi dello studio di genetica di popolazione mediante l'utilizzo di microsatelliti	6
1.1.3	Svantaggi dell'utilizzo dei microsatelliti per studi genetici	7
1.2	Determinazione del sesso negli uccelli	8
2	MATERIALI E METODI	11
2.1	Estrazione del DNA	12
2.1.1	Estrazione del DNA da sangue	12
2.1.2	Estrazione del DNA da tessuto	13
2.1.3	Estrazione del DNA da piume	13
2.1.4	Valutazione del DNA estratto	14
2.2	Reazione di polimerizzazione a catena del DNA	15
2.2.1	Analisi dei prodotti di PCR	15
2.2.2	Analisi dei frammenti amplificati: dimensionamento degli alleli e assegnazione del genotipo	15
2.3	Analisi statistiche	16
2.3.1	Frequenze alleliche	16
2.3.2	Diversità genetica	17
2.3.3	Equilibrio di Hardy -Weinberg	17
2.3.4	F_{ST}	18
2.3.5	Bottleneck test	18
2.3.6	Analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC)	19
2.3.7	R_{ST}	19
2.3.8	Analisi del Linkage Disequilibrium	20
2.3.9	Distanze genetiche	20
2.3.10	Alberi filogenetici	21
2.3.11	Valutazione della presenza di strutture nella popolazione	23
	MUFLONE	25
1	INTRODUZIONE	26
1.1	Morfologia	31
1.2	Habitat	32
1.3	Abitudini alimentari	33
1.4	Aspetti riproduttivi	34
1.5	Eco -Etologia	34
2	SCOPO DEL LAVORO	36

I

3	MATERIALI E METODI	37
3.1	Analisi microsatelliti	37
4	RISULTATI	41
5	DISCUSSIONE	49
<i>LEPRE</i>		54
1	INTRODUZIONE	56
1.1	Morfologia	57
1.2	Habitat	58
1.3	Abitudini alimentari	59
1.4	Aspetti riproduttivi	59
1.5	Eco-Etologia	61
2	SCOPO DEL LAVORO	64
3	MATERIALI E METODI	65
3.1	Analisi microsatelliti	66
4	RISULTATI	68
5	DISCUSSIONE	77
<i>MARANGONE DAL CIUFFO</i>		81
1	INTRODUZIONE	82
1.1	Morfologia	82
1.2	Habitat	83
1.3	Aspetti riproduttivi	84
1.4	Abitudini alimentari	85
1.5	Eco-Etologia	86
2	SCOPO DEL LAVORO	87
3	MATERIALI E METODI	88
3.1	Determinazione del sesso	90
4	RISULTATI	91
5	DISCUSSIONE	96
6	Analisi microsatelliti	101
7	RISULTATI	102

II

Dott.ssa Valentina Satta – Studio della variabilità genetica di specie animali autoctone della Sardegna
Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli studi di Sassari

8	DISCUSSIONE	116
	GRIFONE	118
1	INTRODUZIONE	119
1.1	Morfologia	120
1.2	Habitat	120
1.3	Aspetti riproduttivi	121
1.4	Abitudini alimentari	122
1.5	Eco-etologia	123
2	MATERIALI E METODI	125
2.1	Determinazione del sesso	125
3	RISULTATI	128
3.1	Analisi dei microsatelliti	128
4	RISULTATI	131
5	DISCUSSIONE	132
	CONCLUSIONI	135
	BIBLIOGRAFIA	136

1 INTRODUZIONE

In questi ultimi anni, sotto la spinta sia di una opinione pubblica sempre più preoccupata del deterioramento della qualità della vita, sia di diverse associazioni ambientaliste particolarmente attente nel segnalare in modo continuo la situazione di degrado degli habitat naturali, i governi regionali, nazionali ed internazionali si sono attivati per promulgare leggi in materia di tutela ambientale, istituire parchi o aree protette, ripristinare siti inquinati da residui di attività industriali e difendere specie floristiche e faunistiche in pericolo d'estinzione. Il fenomeno dell'estinzione è considerato parte naturale del processo dell'evoluzione delle specie animali e come tale è considerato irreversibile. Negli ultimi decenni, però, il fenomeno dell'estinzione si è manifestato con una frequenza notevolmente maggiore rispetto al passato e alla nascita di nuove specie. Secondo la Lista Rossa pubblicata nel 2009 dalla Commissione per la Sopravvivenza delle Specie (IUCN - International Union for the Conservation of Nature) il 21% dei mammiferi conosciuti è a rischio di estinzione. Una minaccia che riguarda anche il 30% degli anfibi e il 12% degli uccelli che conosciamo, oltre al 28% dei rettili, il 37% dei pesci d'acqua dolce, il 70% delle piante e il 35% degli invertebrati finora esaminati dagli esperti conservazionisti. Su un totale di 47.677 specie studiate, ben 17.291 corrono il rischio di sparire per sempre dalla faccia della Terra. I dati, preoccupanti, rivelano che 79 delle 5.490 specie di mammiferi presenti sulla Terra sono già estinte o estinte in natura (in questo caso, sopravvivono quindi soltanto in cattività). Altre 188 sono classificate dalla IUCN come "gravemente minacciate", 449 come "minacciate" e addirittura 505 come "vulnerabili". Le ragioni di quest'attuale situazione sono numerose e legate a diversi fattori. In particolare, sono state identificate sei principali cause (Soulè 1991) che contribuiscono alla progressiva diminuzione della biodiversità e sono tutti direttamente relazionati alle attività dell'uomo: 1) perdita degli habitat; 2) frammentazione dei territori; 3) depauperamento delle risorse; 4) diffusione di specie esotiche e di nuove patologie; 5) inquinamento; 6) cambiamenti climatici. L'importanza di preservare la biodiversità all'interno del nostro pianeta è stata ormai universalmente riconosciuta. Un diffuso consenso, sia nel mondo scientifico sia in quello pubblico ha portato i governi ad attribuire un'alta priorità al mantenimento della diversità biologica, sia attraverso la protezione degli habitat che attraverso programmi per la conservazione delle specie. Molti paesi hanno quindi risposto alla gravità della situazione attuale investendo ingenti risorse

1

Dott.ssa Valentina Satta – Studio della variabilità genetica di specie animali autoctone della Sardegna
Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli studi di Sassari

economiche per il ripristino di aree particolarmente degradate e per interventi volti alla realizzazione di programmi di salvaguardia di specie animali di grande interesse faunistico. La sparizione di una singola specie, infatti, può avere gravi ripercussioni su tutto l'equilibrio dell'ecosistema che le apparteneva. Ci sono due principali proposte per la conservazione delle specie selvatiche minacciate. La prima comprende la preservazione dell'habitat, generalmente su larga scala, proteggendo in questo modo le specie al suo interno (Margules e Pressey, 2000; Hanks, 2001). La seconda si concentra sulla riproduzione e la propagazione delle specie individuali in cattività (ex situ; Holt e Pickard 1999; Wildt e Wemmer 1999; Wildt et al., 2001; Loskutoff, 2003; Pukazhenthil e Wildt 2004).

In un mondo ideale la preservazione dell'habitat dovrebbe sempre essere la priorità. In teoria, la strategia conservazionista più efficace dovrebbe prevedere la protezione dell'intero habitat e quindi di tutte le specie autoctone lì presenti (Wildt, 1997a). Purtroppo, come è facile intuire, le possibilità di una sua effettiva applicazione sono, spesso limitate. Alla conservazione in situ, allora, spesso si sostituisce il tradizionale metodo dell'allevamento in cattività, che però presenta numerose limitazioni che ne impediscono il successo, soprattutto nel caso in cui riguardi specie seriamente minacciate. In particolare, alcune di queste limitazioni includono (Lasley et al., 1994):

- 1) la disponibilità di spazio sufficiente ad ospitare un numero adeguato di individui in modo da preservare la variabilità genetica;
- 2) la capacità di assicurare il benessere e la salute animale di specie selvatiche in cattività, soprattutto quando le informazioni sulle loro abitudini di vita sono molto limitate;
- 3) la possibilità di assicurare determinati moduli comportamentali, che spesso risultano fondamentali per il successo dell'accoppiamento;
- 4) la disponibilità di apportare una dieta varia ed equilibrata, rispettando il rapporto costo-beneficio;
- 5) l'abilità di identificare e trattare adeguatamente gli insuccessi riproduttivi, identificando quelli che derivano unicamente da cattiva gestione;
- 6) la capacità di gestire adeguatamente la genetica delle piccole popolazioni. In certi casi, di conseguenza, sono necessarie azioni più mirate per assicurare la salvaguardia di specie seriamente minacciate.

Molto spesso, inoltre, al problema della limitata consistenza numerica di alcune popolazioni animali, si aggiunge il fatto che queste risultano composte da piccole popolazioni isolate senza possibilità di interscambio. In quest'ultimo caso, infatti, il pericolo principale è rappresentato dal fatto

che l'accoppiamento ripetuto tra gli stessi individui aumenta il grado di inbreeding e di omozigosi. La variabilità genetica, infatti, diminuisce ad ogni generazione secondo un valore inversamente proporzionale all'effettiva dimensione numerica della popolazione (Ballou, 1992). Inoltre, fluttuazioni random nel rapporto tra le nascite e le morti o distorsioni nella sex ratio, se risultano insignificanti in popolazioni numerose, possono portare, invece, popolazioni di ridotte dimensioni all'estinzione semplicemente a causa della riduzione del loro numero al di sotto della capacità di recupero. Di conseguenza, la salvaguardia delle specie in pericolo di estinzione o composte da piccole popolazioni isolate dovrebbe prevedere uno sforzo multidisciplinare, comprendente una caratterizzazione sia genetica che ecologica, in modo da garantire non solo l'aumento nel numero degli individui, ma anche il mantenimento della variabilità genetica. In questo contesto e per le ragioni sopraelencate, appare sempre più evidente il motivo per il quale negli ultimi anni, all'interno di programmi di conservazione delle specie selvatiche, abbia acquisito un ruolo sempre più determinante l'applicazione della biologia molecolare. Infatti gestire le risorse nel modo più corretto possibile significa unire alle conoscenze sulla biologia generale delle singole specie studi più specifici di dinamica di popolazione e di struttura degli stock; trascurare tali studi potrebbe produrre drammatici cambiamenti sulla variabilità genetica. E' proprio la variabilità genetica quel fattore che consente alle popolazioni di adattarsi ai cambiamenti ambientali e di reagire a fenomeni di disturbo antropico; attività di prelievo indiscriminate ed irrazionali, che non tengano conto dei livelli di diversità genetica intra e tra popolazioni appartenenti alla stessa specie, conducono necessariamente ad una riduzione di tale diversità. Di conseguenza, le popolazioni sono gestite con lo scopo di minimizzare la perdita di variabilità genetica dovuta a processi casuali, e di evitare l'inbreeding e il successivo rischio di espressione di tratti genetici sfavorevoli o addirittura letali, così come la perdita di caratteristiche vantaggiose dovute ad una selezione innaturale. Conservare il 90% di variabilità per 200 anni è relativamente facile per mammiferi dalla vita lunga come l'elefante (5-10 generazioni). Per gli uccelli, invece, con intervalli generazionali corti, questo obiettivo è molto difficile senza ricorrere alle biotecnologie (Saint Jalme et al., 2003). In questo studio sono stati impiegati marcatori genetici molecolari altamente polimorfici (loci microsatelliti) al fine di attuare un'analisi sulla variabilità genetica di 4 specie autoctone della Sardegna, il Muflone (*Ovis gmelini musimon*, Cugnasse, 1994), la Lepre Sarda (*Lepus capensis mediterraneus*, Wagner 1841), il Marangone dal Ciuffo (*Phalacrocorax*

aristotelis desmarestii, Payraudeau 1826) e il Grifone (*Gyps fulvus fulvus*, Linneo 1758) inoltre sul Marangone dal Ciuffo e sul Grifone sono stati effettuati studi per mettere a punto un metodo valido, veloce, facilmente applicabile ed atraumatico per la determinazione del sesso nelle popolazioni in esame col fine di avere uno strumento per la determinazione della sex ratio da utilizzare in piani di conservazione di queste specie. I differenti sessi presentano infatti differenti caratteristiche fisiologiche e di comportamento e quindi interagiscono in maniera diversa con l'ambiente e reagiscono diversamente alle modificazioni ambientali. La valutazione della sex ratio è perciò un marcatore utile per la determinazione di influenze esterne e ambientali su una popolazione animale.

1.1 Metodi per la valutazione della variabilità genetica

I principali strumenti utilizzati per studiare la variazione genetica all'interno delle popolazioni o tra popolazioni sono i marcatori genetici. Un marcatore genetico è una qualsiasi caratteristica morfologica, biochimica o molecolare che venga ereditata attraverso le generazioni, e che può essere monitorata nel tempo (Booke, 1999). I marcatori genetici vengono utilizzati in un gran numero di applicazioni nello studio dell'ecologia e dell'evoluzione (modalità di accoppiamento, struttura di popolazione e flusso genico, fitness, etc.). In questi anni, gli scienziati che utilizzano un 'approccio molecolare' agli studi di popolazione hanno a disposizione un'ampia gamma di metodologie di studio; ciò accade perché la continua scoperta e la messa a punto di tecniche di indagine via via più sofisticate non sostituisce mai del tutto le meno recenti. Infatti, i numerosi marcatori molecolari (RAPD, RFLP, AFLP, minisatelliti e microsatelliti) e biochimici (allozimi), disponibili al giorno d'oggi, differiscono nel tipo e nel grado di variabilità che individuano, nella facilità di impiego e, per ultimo, ma non per questo meno importante, nei costi di sviluppo e applicazione (Ouborg et al., 1999). Fanno eccezione le analisi condotte con allozimi (enzimi codificati da differenti alleli di un singolo locus, con diversa mobilità elettroforetica dovuta alle alterazioni nella carica ionica complessiva della proteina) che oggi vengono impiegate sempre meno, in quanto questi marcatori sono indicatori indiretti della variabilità genetica. Essi non sono in grado di rivelare alterazioni a livello del DNA se queste non comportano alterazioni della carica ionica complessiva della proteina e quindi della mobilità in campo elettrico. Tra le numerose caratteristiche che

differenziano un marcatore molecolare dall'altro è opportuno evidenziarne tre in particolare:

1. dominanza/codominanza: I marcatori dominanti (es. RAPD, AFLP) sono quelli in cui un allele è dominante sull'altro ed il profilo dell'eterozigote è essenzialmente indistinguibile da quello dell'omozigote dominante, per questo motivo consentono di classificare solo due fenotipi, dominante o recessivo. I marcatori codominanti (RFLP, allozimi, microsatelliti) invece, sono quelli il cui profilo omozigote può essere distinto dai profili degli eterozigoti permettendo una facile stima delle frequenze alleliche in una popolazione.
2. ereditarietà: Il DNA nucleare è ereditato da entrambi i genitori, mentre il DNA degli organelli ha più spesso un'eredità uniparentale.
3. ricombinazione: Il DNA nucleare è soggetto a ricombinazione durante il processo di riproduzione sessuale, il DNA degli organelli in genere no.

Il grado di variazione che un marcatore deve avere per essere utilizzabile dipende dalla domanda specifica alla quale si vuole rispondere ed anche dal tipo di popolazioni e di organismi che si intende studiare. In questo studio si è deciso di condurre un'analisi della variabilità genetica a livello nucleare delle 4 specie elencate precedentemente, utilizzando come marcatori molecolari i microsatelliti.

1.1.1 I microsatelliti.

Il DNA nucleare degli animali è un genoma diploide che viene trasmesso seguendo una segregazione mendeliana ed è quindi soggetto a ricombinazione. Le sue regioni più polimorfiche, i loci microsatelliti, studiate inizialmente in relazione a malattie genetiche, risultano le più informative negli studi di struttura e dinamica di popolazione per le caratteristiche che le contraddistinguono (Zhang e Hewitt, 2003).

I microsatelliti, conosciuti anche come SSRs (Simple Sequences Repeats), come STRs (Short Tandem Repeats) o ancora come SSLPs (Simple Sequences Length Polymorphism), sono essenzialmente sequenze genomiche contenenti un modulo di 2-5 nucleotidi ripetuto per decine di volte, fino ad una lunghezza massima della successione di circa 200 bp (Rassmann et al., 1991). I microsatelliti sono distribuiti nel genoma di tutti gli eucarioti, con grande prevalenza nelle regioni non codificanti e presentano un elevato grado di polimorfismo nella lunghezza. Infatti, per un singolo locus microsatellite, è possibile individuare polimorfismi di lunghezza tra i diversi alleli, dovuti a differenze nel numero di ripetizioni del modulo interno.

Studi su alberi genealogici e su pedigree hanno dimostrato che la loro

trasmissione è di tipo mendeliano. Si ritiene inoltre che siano neutrali, ovvero non soggetti a selezione. Sembra però esistere una sorta di selezione a livello dimensionale del numero di repeats, infatti è interessante notare che la lunghezza delle sequenze microsatellite presenta un limite massimo non superabile, determinato probabilmente da un meccanismo selettivo che impedirebbe la formazione di alleli eccessivamente lunghi i quali destabilizzerebbero l'appaiamento meiotico tra individui eterozigoti, aumentando il numero di crossing over aberranti (Samadi et al., 1998).

In base alla loro composizione, i microsatelliti si distinguono in perfetti, composti ed interrotti (Jarne et al., 1996). I microsatelliti perfetti sono quelli costituiti esclusivamente da un solo tipo di modulo ripetuto, quelli composti sono costituiti da due o più tipi di moduli ripetuti, mentre quelli interrotti contengono tra un modulo ripetuto e l'altro una o più basi che interrompono la continuità. Un esempio delle tre diverse tipologie è mostrato nella tabella in tabella 1.

TIPOLOGIA	SEQUENZA ESEMPIO
Perfetti	<u>CACACACACACACACACA</u>
Composti	<u>CACACACAGAGAGAGAGA</u>
Interrotti	<u>CACATTCACACATTCATTCA</u>

TABELLA 1: diverse tipologie di microsatelliti

1.1.2 Vantaggi dello studio di genetica di popolazione mediante l'utilizzo di microsatelliti

Questi marcatori nucleari sono ipervariabili: sono stati identificati fino a 50 alleli per singolo locus, l'eterozigosità media è del 50% e per alcuni loci raggiunge picchi del 100%. Il grado elevato di variabilità dipende da un tasso di mutazione molto alto, fino a 1×10^2 eventi mutazionali per generazione (Amos et al., 1996), con un valore di retromutazione altrettanto consistente che può permettere il ritorno all'allele di partenza in poche generazioni. L'alto tasso di mutazione è stato imputato ad errori della DNA polimerasi, che può andare incontro ad una sorta di 'balbuzie' durante la replicazione, scivolando indietro e replicando una seconda copia dello stesso dinucleotide oppure saltando oltre uno o più dinucleotidi e determinando la perdita di uno o più moduli. Un altro fattore che determina l'alto tasso di mutazione, forse ancora più dell'azione della DNA polimerasi (se si considera che esiste un sistema di correzione che opera in

vivo e che riduce gli errori di duplicazione), è stato riconosciuto nei meccanismi di ricombinazione tra alleli di diversa lunghezza che, durante l'appaiamento meiotico dei cromosomi omologhi, danno crossing over diseguale generando nuovi alleli. L'elevato polimorfismo fa di questi marcatori nucleari un potente mezzo di indagine nelle analisi di variabilità intraspecifica su scala microgeografica, inoltre, poichè le regioni fiancheggianti la sequenza ripetuta tendono al contrario ad essere assai più conservate, i microsatelliti possono venire impiegati per studiare il differenziamento genetico anche tra specie filogeneticamente vicine (Goldstein et al., 1995).

1.1.3 Svantaggi dell'utilizzo dei microsatelliti per studi genetici

Utilizzando i microsatelliti per uno studio di genetica di popolazione si possono riscontrare alcuni problemi. Il primo di questi è l'omoplasia, ossia la condizione di uguaglianza nella tipologia e nel numero di repeats tra due alleli che hanno diversa discendenza ma che si presentano 'identici in stato' (non distinguibili elettroforeticamente). Questo fenomeno induce a sottostimare il reale livello di divergenza tra due popolazioni. Un altro problema che causa lo stesso errore è la presenza di alleli nulli. Infatti, se nella regione di appaiamento dei primers per l'amplificazione del locus esiste una mutazione che impedisce l'appaiamento stesso dell'oligonucleotide alla sequenza bersaglio, l'amplificazione non avviene. Ne risulta una sottostima del reale numero di omozigoti per l'allele nullo (in quanto non verranno amplificati) e degli eterozigoti (che daranno un profilo omozigote). Il più grande ostacolo che si incontra quando si decide di utilizzare i microsatelliti come marcatori nucleari per una specie non ancora studiata è rappresentato dalla necessità di isolarli de novo. Infatti, nonostante le regioni fiancheggianti siano conservate, si tratta generalmente di regioni non codificanti dove il più alto tasso di sostituzione nucleotidica rende problematico il disegno di 'primers universali' (Kocher et al., 1989). I tradizionali protocolli di isolamento (Rassmann et al., 1991) consistevano nello screening di librerie genomiche con appropriate sonde. La percentuale dei cloni positivi (contenenti microsatelliti) riscontrata varia da 12% a meno dello 0.04% (Zane et al., 2002). Queste strategie di isolamento oggi vengono ancora utilizzate, ma applicate solo in quei taxa che possiedono un'elevata frequenza di microsatelliti (in alcuni pesci o in altri vertebrati) oppure quando è sufficiente avere a disposizione un numero relativamente basso di loci da analizzare. Nei taxa che possiedono una bassa frequenza di loci

microsatellite (uccelli, piante, etc.) o quando si necessita di un grande numero di loci per analisi di distanze genetiche tra popolazioni (Zhivotovsky e Feldman, 1995) allora è di certo preferibile applicare i nuovi protocolli di isolamento, apparsi in letteratura negli ultimi anni.

1.2 Determinazione del sesso negli uccelli

Alcune specie degli appartenenti alla classe Aves presentano, in età adulta, un chiaro dimorfismo sessuale (specie dimorfiche) che rende possibile il riconoscimento del sesso, in altri casi, il maschio e la femmina della stessa specie sono morfologicamente indistinguibili (specie monomorfiche). Dal punto di vista genetico la determinazione del sesso è del tipo a eterogametia femminile, al contrario dei mammiferi che sono ad eterogametia maschile, per cui gli individui di sesso maschile presentano due cromosomi sessuali uguali (ZZ) mentre gli individui di sesso femminile presentano due cromosomi sessuali diversi, uno Z, uguale a quello maschile, e uno W (Fig. 1).

Per il controllo e la salvaguardia delle popolazioni di uccelli selvatici assume notevole importanza la conoscenza della dinamica della sex ratio in una popolazione. Infatti i due sessi presentano generalmente differenti moduli comportamentali per cui interagiscono con l'ambiente in cui vivono in maniera differente. Le alterazioni ambientali molto spesso influenzano maggiormente uno dei due sessi, determinando uno squilibrio negli accoppiamenti e una alterazione delle caratteristiche genetiche presenti nella popolazione, in quanto vengono alterate le frequenze alleliche, specialmente nel caso di alleli rari che possono addirittura essere persi dalla popolazione (fenomeno denominato deriva genica dovuta alla diminuzione della popolazione riprodotte reale). Nei programmi di controllo e salvaguardia di una popolazione assume perciò notevole importanza la conoscenza e il monitoraggio della sex ratio, che può essere determinata facilmente in specie che presentano un dimorfismo sessuale, mentre diventa problematica in specie monomorfiche. Varie sono state le strategie messe in atto per poter determinare il sesso di specie avicole monomorfiche, quali l'esame morfologico della cloaca (Brawell, 2003), la misura dei livelli di ormoni steroidei nelle uova (Petrie et al., 2001) o nelle feci (Swengel, 1996), l'analisi morfologica del cariotipo (Archawaranon, 2004) e la visualizzazione laparoscopica degli organi sessuali (Swengel, 1996). La procedura maggiormente utilizzata è il sessaggio chirurgico mediante laparoscopia, che offre indubbi vantaggi in quanto, tramite la

visualizzazione delle gonadi, garantisce l'immediatezza della risposta e la possibilità di diagnosi dello stato di maturazione gonadica, oltre a permettere l'osservazione di eventuali processi patologici (Harlin, 1996). Il principale svantaggio di questa tecnica è la necessità di un trattamento anestetico dell'animale e, da non sottovalutare, la possibilità di danneggiamenti accidentali di organi vitali. Negli ultimi anni è stata messa a punto una metodica molecolare, non invasiva, che risulta essere una valida alternativa alle tecniche chirurgiche in quanto non comporta nessun rischio per la salute del volatile e può essere eseguita anche in uccelli ancora presenti nel nido (Halverson, 1997), o in uccelli di piccola taglia. Questa metodica, basata sull'impiego della Polymerase Chain Reaction (PCR), ha trovato applicazione e diffusione nella determinazione del sesso in numerose specie avicole in seguito alla scoperta di geni legati ai cromosomi sessuali. La sequenza genica maggiormente utilizzata con questa tecnica è quella che codifica per la proteina Chromobox Helicase DNA binding 1 (CHD1) presente su entrambi i cromosomi sessuali W e Z in singola copia (Ellegren, 1996; Griffiths et al., 1996). Questo gene risulta molto conservato tra i vertebrati; infatti, rispetto all'omologa proteina dei mammiferi, è presente un'unica differenza aminoacidica su 180 aminoacidi che compongono il dominio dell'elicasi (Fridolfson and Ellegren, 2000).

L'utilizzo di questo gene per la determinazione molecolare del sesso si basa sul fatto che, in molte specie di uccelli, l'allele presente sul cromosoma W (CHD1W) presenta una più alta frequenza di mutazione rispetto a quello presente nel cromosoma Z (CHD1Z), che consente l'utilizzo di questa sequenza per la discriminazione tra i soggetti ZZ (maschili) e i soggetti WZ (femminili) (Sacchi et al., 2004).

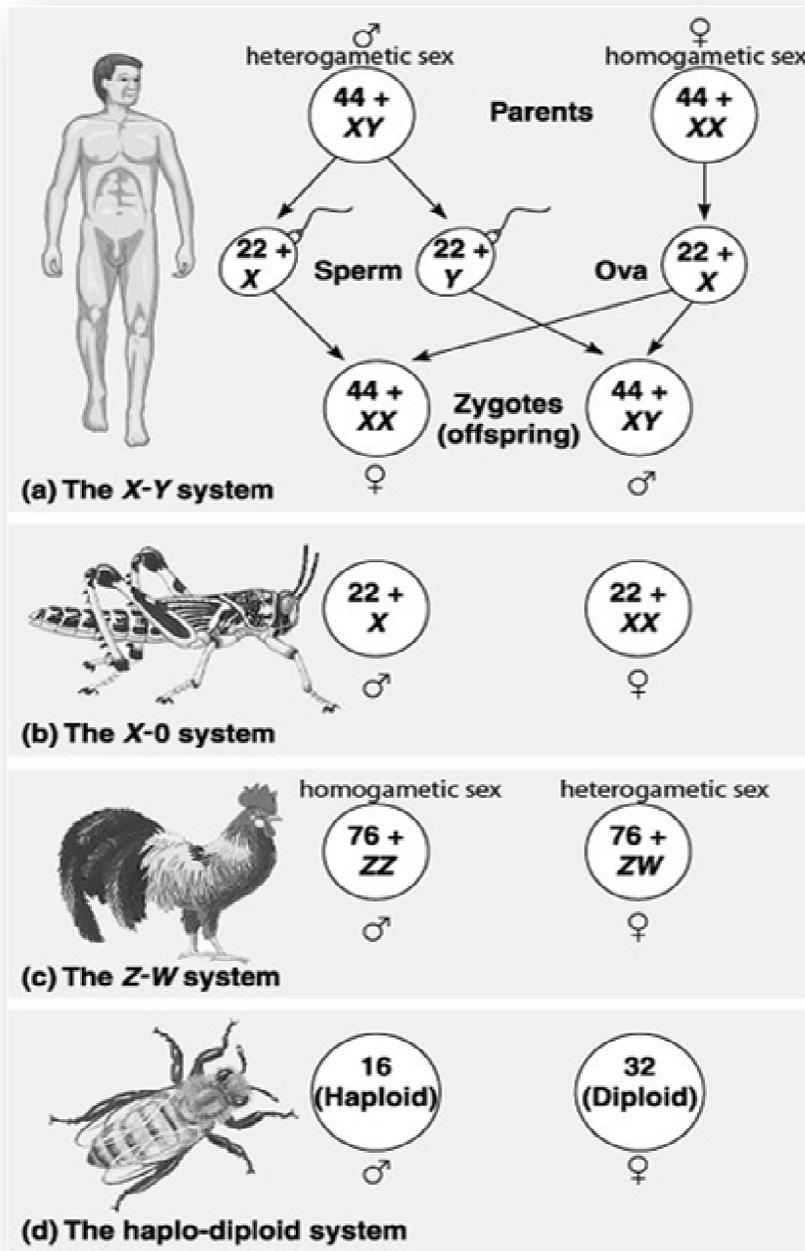


FIGURA 1. Sistemi di determinazione del sesso nelle varie specie animali

2 MATERIALI E METODI

I campioni delle 4 specie analizzate in questo studio provengono da diverse zone della Sardegna come è possibile osservare in Fig. 2.



FIGURA 2 Localizzazione dei siti di provenienza dei campioni delle quattro specie studiate . Il colore del sito identifica la specie

11

Dott.ssa Valentina Satta – Studio della variabilità genetica di specie animali autoctone della Sardegna
Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli studi di Sassari

2.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA genomico a partire dai diversi substrati è stata effettuata con metodi standardizzati che prevedono una iniziale lisi cellulare con Proteinase K ed una estrazione organica con Fenolo/Cloroformio/Isoamilalcol (Sambrook et al., 1989). La tecnica di estrazione col fenolo cloroformio si basa sulla possibilità di separazione frazionata di proteine e acidi nucleici. Le proteine dei lisati cellulari si sciolgono in solventi organici quali il fenolo e il cloroformio mentre gli acidi nucleici rimangono nella fase acquosa polare.

2.1.1 Estrazione del DNA da sangue

L'estrazione del DNA da sangue intero è stata eseguita su sangue fresco prelevato in tubi Vacutainer contenenti EDTA (Etilen Diamina Tetracetato) come anticoagulante. L'utilizzo dell'EDTA è connesso alla sua azione di chelante degli ioni bivalenti, la cui presenza facilita l'azione delle nucleasi, gli enzimi che degradano il DNA. Previa scongelamento ogni campione è stato trasferito in una Falcon da 15 ml contenente 0,4 volumi di Buffer d'estrazione (50 mM Tris HCl pH 8, 100 mM EDTA pH8, 100 mM NaCl, 1% SDS), addizionato con 0,5 mg/ml di proteinasi K e portato alla temperatura di 55°C per 12h. Dopo centrifugazione a 4° C per 20 minuti a 3500 rpm, il surnatante è stato recuperato e trasferito in una nuova falcon da 15 ml, è stato aggiunto un volume di fenolo e tenuto in agitazione a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo centrifugazione a 4°C per 20 minuti a 3500 rpm, il surnatante è stato nuovamente trasferito in una falcon da 15 ml, sono stati aggiunti 0,5 volumi di fenolo e 0,5 volumi di cloroformio:alcool isoamilico con un rapporto 24:1. Dopo 10 minuti di agitazione a temperatura ambiente, il campione è stato centrifugato a 4°C per 20 minuti a 3500 rpm. Il surnatante è stato nuovamente trasferito, addizionato di un volume di cloroformio:alcool isoamilico 24:1 e, dopo 10 minuti di agitazione a temperatura ambiente, centrifugato per 20 minuti a 3500 rpm. Il surnatante è stato recuperato, addizionato di 0,8 volumi di isopropanolo e nuovamente centrifugato per 30 minuti a 3500 rpm. Il surnatante è stato eliminato e il pellet contenente il DNA è stato lavato due volte aggiungendo 1 ml di etanolo al 70%, agitando per far staccare il pellet dal fondo della provetta, e centrifugando per 10 minuti a 3500 rpm. Eliminato completamente l'etanolo, il pellet è stato risospeso in 800 µl di acqua sterile bidistillata.

2.1.2 Estrazione del DNA da tessuto

L'estrazione del DNA da tessuto è stata eseguita su un campione di tessuto di 1 cm x 1 cm. Ogni campione è stato aggiunto ad un eppendorf contenente 400 µl di buffer di lisi (10 mM TrisCl a pH 8, 2 mM NaEDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS, 10 mg/ml DTT e 0,5 mg/ml Proteinasi K), miscelato per inversione e lasciato in agitazione (500 rpm) a 55°C per 60 minuti; è stato quindi addizionato un uguale volume di Fenolo, il campione è stato miscelato per inversione e centrifugato per 10 minuti a 13200 rpm; il surnatante (fase acquosa) è stato trasferito in un altro eppendorf a cui sono stati addizionati 0,5 volumi di fenolo (200 µl) e 0,5 volumi di cloroformio: alcol isoamilico in rapporto di 24:1 (200 µl) il campione è stato quindi miscelato per inversione e centrifugato per 10 minuti a 13200 rpm; il surnatante è stato nuovamente trasferito in un altro eppendorf a cui è stato aggiunto un volume di cloroformio: alcol isoamilico in rapporto 24:1 (400 µl), miscelato per inversione e centrifugato per 10 minuti a 13200 rpm; il surnatante contenente il DNA è stato recuperato, trasferito in un nuovo eppendorf e addizionato con un volume di Isopropanolo (400 µl), miscelato per gentile inversione e conservato a -20°C per 2 ore; il DNA è stato fatto precipitare tramite centrifugazione per 15 minuti a 13200 rpm, il surnatante è stato eliminato e il pellet contenente il DNA è stato lavato con un volume di Etanolo al 70% (400 µl) e quindi centrifugato per 10 minuti a 13200 rpm. Eliminato completamente l'etanolo, il pellet è stato risospeso con 100 µl di acqua sterile bidistillata.

2.1.3 Estrazione del DNA da piume

L'estrazione del DNA da piume è stata effettuata con una metodica utilizzata in medicina forense che permette l'estrazione del DNA partendo da piccole quantità di materiale organico. Infatti, le cellule presenti nelle piume utilizzabili per l'estrazione del DNA sono presenti in numero ridotto nell'apice dello scapo della penna e subiscono una degradazione molto veloce. Questa metodica prevede l'isolamento del DNA mediante l'utilizzo di microsfere magnetiche che hanno la capacità di variare la carica a seconda del pH in cui sono immerse (kit forensic, Invitrogen). Le sfere magnetiche presentano una carica positiva a pH acidi, per cui possono legare il DNA carico negativamente e rilasciarlo poi a pH basici, in cui la carica diventa negativa.

Circa 1 cm dello scapo della penna è stato tagliato, sminuzzato e sottoposto a lisi mediante incubazione in 1 ml di ChargeSwitch Lysis Buffer contenente 0,2 mg/ml di proteinasi K per un'ora a 55°C o fino alla completa lisi del campione. Dopo una breve centrifugazione il supernatante è stato

trasferito in un nuovo eppendorf sterile cui vengono aggiunte 200 μ l di Purification buffer e 20 μ l di sfere magnetiche. Dopo aver incubato a temperatura ambiente per 1-5 minuti per permettere il legame del DNA alle sfere magnetiche, il campione è stato posto a contatto con un magnete (Magna Rack) per un minuto o fino a che le sfere hanno formato un pellet tirato. È stato rimosso il supernatante e le microsfere con il DNA sono state lavate per 2 volte con 500 μ l di Washing buffer. Il DNA è stato quindi eluito dalle sfere magnetiche mediante aggiunta di 150 μ l di TE buffer a pH 8,5.

2.1.4 Valutazione del DNA estratto

L'integrità del DNA estratto (sizing) è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio preparato a partire da una soluzione tampone 0,5X di TRIS-Cl 0,89M, Acido Borico 0,89M ed Na₂EDTA (TBE) a pH 8 allo 0,5%, contenente 0,8% di agarosio e Bromuro d'etidio ad una concentrazione pari a 10 μ g/ml, la soluzione è stata quindi riscaldata al microonde per permettere all'agarosio di sciogliersi nel tampone. In seguito è stata versata in uno stampo rettangolare riempito per circa un centimetro in altezza. Un pettine di plastica è stato immerso nel liquido per formare i pozzetti di deposizione del campione. Appena la soluzione si è solidificata formando il gel, 5 μ l di DNA sono stati miscelati con 1 μ l di loading buffer (0,25% blu di bromofenolo, 0,25% xilene cianolo, 40% (w/v) saccarosio in acqua) e caricati sul fondo di ciascun pozzetto del gel. Il gel, all'interno di una camera elettroforetica, è stato quindi sottoposto ad una differenza di potenziale di 90 Volt per 90 minuti. L'integrità del DNA estratto si è potuta nella valutare con la presenza di un'unica banda ad elevato peso molecolare visibile in luce ultravioletta. La concentrazione del DNA estratto è stata effettuata mediante il NanoDrop, uno Spettrofotometro UV-Visibile completamente innovativo, capace di lavorare con microvolumi di campione, fino ad 1 μ l. Inoltre la capacità di lavorare anche a concentrazioni estremamente elevate consente di eliminare totalmente l'utilizzo delle cuvette ed il ricorso a diluizioni. Il NanoDrop sfrutta una nuova tecnologia, basata sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine. In tal modo una goccia di campione posizionata sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche, che trasportano radiazioni di appropriata lunghezza d'onda e consentono una lettura semplice accurata e veloce. Dopo averne valutato la concentrazione, il DNA è stato diluito in modo da ottenere una concentrazione di 10 ng/ μ l per tutti i campioni. Il bromuro di etidio contenuto nel gel si intercala nel DNA a doppia elica e, quando

eccitato con una radiazione UV emette una radiazione nel visibile, di colore arancio-rosso, che definisce le bande elettroforetiche corrispondenti al DNA.

2.2 Reazione di polimerizzazione a catena del DNA

Le reazioni di polimerizzazione a catena (PCR) sono state eseguite in un volume totale di 15 μ l, contenenti: 20 ng di DNA genomico, 1,5 mM dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1 Unità di Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e ciascun oligonucleotide a concentrazione 4 μ M. Il programma di PCR una iniziale fase di denaturazione a 94°C, che permette la separazione dei due filamenti dell'elica rendendo così accessibile ai primers la specifica regione da amplificare, abbiamo seguita dalla fase di ibridazione alla temperatura di annealing, specifica per ogni coppia di primers, che permette l'appaiamento degli oligonucleotidi alle sequenze complementari fiancheggianti la porzione di DNA da amplificare. Infine la fase di estensione in cui la Taq DNA polimerasi catalizza la sintesi del nuovo DNA che sarà esattamente la copia della sequenza bersaglio. Una fase di estensione finale a 72°C per 5 minuti permette la completa amplificazione di tutte le sequenze. Ciascuna reazione di PCR è stata condotta in un amplificatore MJ research PTC-200 Peltier Thermal Cycler.

2.2.1 Analisi dei prodotti di PCR

La valutazione della resa della PCR è stata effettuata aggiungendo a 10 μ l dell'amplificato 2 μ l di loading buffer (0,25% blu di bromofenolo, 0,25% xilene cianolo, 40% (w/v) saccarosio in acqua) e un volume di 8 μ l è stato quindi caricato su un gel di agarosio al 3% in TBE 0,5 X (Tris base 0,89 M, acido borico 0,89 M, Na_2EDTA 20mM) contenente Bromuro d'etidid 0,002 M. Il gel è stato successivamente sottoposto a corsa elettroforetica in una camera orizzontale contenente TBE 0,5 X ad una potenza costante di 90 W. Il prodotto di reazione è poi stato visualizzato esponendo il gel a raggi UV in un transilluminatore.

2.2.2 Analisi dei frammenti amplificati: dimensionamento degli alleli e assegnazione del genotipo

L'analisi dei prodotti di PCR che riguardano le regioni microsatellitari è stata condotta successivamente mediante elettroforesi capillare su un

sequenziatore automatico (Genetic Analyzer ABI Prism 3130 XL). Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il polimero POP7 (Applied Biosystem). Su piastre da 96 pozzetti, ad ogni pozzetto contenente 10 μ L di formamide e 0,006 μ L di standard Rox-500 è stato aggiunto un 1 μ L del prodotto di amplificazione, la piastra, in seguito a centrifugazione, è stata denaturata a 94°C per 2 minuti, quindi raggiunta la temperatura di 4°C è stata caricata nella macchina. Per l'analisi degli elettroferogrammi è stato utilizzato il software GeneMapper. Questo software ci ha permesso di esaminare i profili dei microsatelliti per ogni marcatore fluoroforo; ciascun profilo è stato individuato partendo dal presupposto che ogni prodotto amplificato di un locus microsatellite, può essere visualizzato in un grafico avente per ascissa il tempo di migrazione su gel e per ordinata l'intensità del prodotto amplificato. Per ogni campione è stato possibile separare i frammenti amplificati per colore del fluoroforo e dimensionare gli alleli di ogni *locus* microsatellite. Il dimensionamento dei singoli alleli avviene per confronto con uno *standard* interno (GS 400 Hd Rox): per ogni capillare, unitamente agli amplificati da analizzare, viene infatti caricato uno standard di peso molecolare noto, formato da un insieme di frammenti di dimensione conosciuta (compresa tra 50 e 500 bp) marcati con il fluoroforo ROX. L'analisi di ogni picco allelico ed il suo dimensionamento in paia di basi ha permesso di ricavare il genotipo per ogni individuo.

2.3 Analisi statistiche

Per quanto riguarda la sex ratio, le deviazioni dei dati ottenuti dai rapporti 50/50 tra maschi e femmine sono state analizzate mediante l'utilizzo del Chi Square Test del programma Minitab 12 per Windows. L'analisi delle popolazioni per i loci microsatelliti è stata effettuata utilizzando differenti software statistici che hanno permesso di calcolare i diversi parametri che meglio hanno determinato la variabilità genetica delle popolazioni prese in esame. Di seguito si possono trovare i test che sono stati effettuati per tutte le specie .

2.3.1 Frequenze alleliche

Corrispondono al rapporto tra il numero di volte in cui un allele è presente in una popolazione ed il numero totale degli alleli. Queste sono state ottenute mediante conteggio diretto degli alleli, in quanto tutti i loci sono risultati autosomici presentando codominanza. Tale metodo può essere utilizzato in sistemi formati da due o più alleli qualora sia possibile

individuare esattamente il genotipo, quando ciascun allele è evidenziabile sia allo stato di omozigote che allo stato di eterozigote.

2.3.2 Diversità genetica

La diversità genetica (Nei, 1987) viene definita come la probabilità che due alleli presi a caso nella popolazione siano diversi tra di loro. Viene calcolata secondo la formula:

$$H = \frac{n_k}{n_k - 1} \left(1 - \sum p_{ik}^2 - \frac{H_{ok}}{2n_k} \right)$$

dove n_k è la dimensione del campione k , p_{ik} la frequenza dell'allele A_i nel campione di dimensioni k , e H_{ok} il valore di eterozigosità osservata nel campione. La diversità genetica si riferisce alla variabilità del patrimonio genetico nell'ambito di una singola specie. Essa include le variazioni genetiche tra popolazioni distinte della stessa specie, e le variazioni genetiche all'interno di una stessa popolazione. Il calcolo delle frequenze alleliche e della diversità genetica è stato eseguito con il software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

2.3.3 Equilibrio di Hardy-Weinberg

Una popolazione in equilibrio di Hardy – Weinberg, nel caso di un locus con alleli A_1, \dots, A_i , con frequenze alleliche p_1, \dots, p_i , segue l'equazione:

$$(p_i + \dots + p_j)^2 = 1$$

dalla quale gli omozigoti saranno calcolati con la formula

$$(A_i A_i) = p_i^2$$

mentre gli eterozigoti $(A_i A_j) = 2 p_i p_j$

Le condizioni necessarie affinché una popolazione sia in equilibrio di Hardy-Weinberg sono 5:

- assenza di mutazione;
- assenza di migrazione;
- popolazione sufficientemente grande in modo da rendere trascurabili gli effetti della deriva genetica;
- accoppiamento casuale;
- assenza di selezione naturale;

Analizzando le conseguenze delle violazioni ai requisiti di questa legge modello si può comprendere come i sistemi di incrocio, la mutazione, la migrazione, la deriva genetica e la selezione naturale influenzino la genetica e l'evoluzione delle popolazioni.

Per testare tale ipotesi è stata usata una procedura basata sul test

esatto della Catena di Markov, (Guo e Thompson, 1992), che assume che i genotipi diploidi osservati siano il prodotto di una unione casuale dei gameti. La procedura è stata eseguita con l'ausilio del programma Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005), utilizzando 10^6 permutazioni. Il livello di significatività è stato modificato con la procedura di Bonferroni per la presenza di test multipli (Rice, 1989), fissando una nuova soglia di significatività, questa viene calcolata portando la soglia di significatività globale del test ($\alpha=0,05$) ad una soglia per singoli confronti che è α/k dove k è il numero di test eseguiti (afferma che se uno sperimentatore sta analizzando un numero n di ipotesi, dipendenti e indipendenti, su una serie di dati, il livello di significatività statistica che dovrebbe essere utilizzato per ogni ipotesi è $1/n$ volte quello che sarebbe loro attribuito se anche solo una ipotesi fosse empiricamente testata.)

2.3.4 F_{ST}

L' F_{ST} è una delle misure standard di differenziazione genetica tra popolazioni. L' F_{ST} generalmente permette una stima più accurata della differenziazione tra popolazioni, specialmente quando viene genotipizzato un numero limitato di loci e quando le popolazioni sono debolmente strutturate (Gaggiotti et al. 1999; Balloux e Goudet 2002). L' F_{ST} (Wright, 1978), è stato stimato con l'algoritmo di Weir e Cockerham (1984). In generale, è la proporzione della varianza genetica totale contenuta in una sottopopolazione relativamente alla varianza genetica totale tra le popolazioni. I valori sono compresi tra 0 e 1, e un elevato valore corrisponde a un considerevole valore di differenziazione tra le popolazioni. La significatività è stata testata utilizzando un G-test con 1000 permutazioni. Le analisi sono state eseguite con il software FSTAT v. 2.9.3 (Goudet 2002). Il livello di significatività è stato corretto con la procedura di Bonferroni.

INTERVALLI DI F_{ST}	GRADO DI DIFFERENZIAMENTO
$0 \leq F_{ST} \leq 0.05$	Basso
$0.05 < F_{ST} \leq 0.15$	Moderato
$0.15 > F_{ST} \leq 0.25$	Alto
$0.25 < F_{ST} \leq 1$	Molto alto

2.3.5 *Bottleneck test*

Una popolazione che è stata oggetto di una drastica riduzione della taglia effettiva della popolazione (fenomeno definito *bottleneck*), mostra una riduzione del numero di alleli (k) e dell'eterozigosità. In particolare, il numero di alleli si riduce maggiormente rispetto alla diminuzione di

eterozigosità, con la conseguenza che in una tale popolazione, l'eterozigosità osservata è superiore a quella attesa in base al numero di alleli k , sotto l'assunzione di una dimensione costante della popolazione (Luikart et al., 1998). L'eccesso di eterozigosità osservata rispetto a quella attesa in base al numero di alleli è un buon indicatore di un "bottleneck" recente nella popolazione.

Per effettuare questa analisi è stato utilizzato il software "Bottleneck" (Cornuet e Luikart, 1997) che calcola per ciascun campione della popolazione e per ciascun locus l'eterozigosità attesa dal numero di alleli osservati k e dal numero di individui del campione, sotto l'equilibrio mutazione - deriva genetica, confrontandola poi con l'eterozigosità osservata. È stato utilizzato il modello *Two Phased Model* (TPM), in quanto più adatto al tasso di mutazione dei microsatelliti (Di Rienzo et al., 1994), mentre per quanto riguarda la significatività tra eterozigosità osservata e attesa è stato utilizzato il Wilcoxon sign – rank test che, come indicato dagli stessi autori del software, è quello dotato di maggior potere statistico rispetto agli altri, anche se utilizzato con pochi loci (Luikart et al., 1997).

2.3.6 Analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC)

L'analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC) è stata eseguita utilizzando il software GENETIX 4.5.02 (Belkhir et al., 2003). Questo tipo di analisi è un genere di analisi canonica, particolarmente adatta a descrivere le associazioni tra due variabili qualitative, che rappresenta, in uno spazio tridimensionale, la vicinanza genetica tra i campioni, indipendentemente dalla popolazione di appartenenza. She et al. (1987) hanno proposto una più appropriata codifica per i dati genetici derivanti da organismi diploidi, mentre altri autori (Long, 1986; Smouse e Long, 1988; Guinand, 1996) hanno verificato l'esistenza di buone correlazioni tra i risultati delle analisi e alcuni parametri convenzionali di genetica delle popolazioni.

2.3.7 R_{ST}

l' R_{ST} , come l' F_{ST} è una delle misure standard di differenziazione genetica tra popolazioni, questo però risulta più accurato nel caso in cui i markers seguano lo Stepwise Mutation Model (Ohta e Kimura, 1973), come nel caso dei microsatelliti. L' R_{ST} (Slatkin, 1995) considera la varianza nella dimensione degli alleli, quindi in base al numero di ripetizioni del microsatellite. La significatività è stata testata utilizzando 1000 permutazioni. Anche in questo caso il livello di significatività è stato corretto con la procedura di Bonferroni, per test multipli. Le analisi sono state eseguite con il software R_{ST} -CALC (Goodman, 1997).

2.3.8 Analisi del Linkage Disequilibrium

L'associazione gametica casuale tra alleli di geni differenti è detta Linkage Equilibrium, nel quale la frequenza dell'aplotipo è uguale al prodotto delle frequenze degli alleli che lo costituiscono. Se non è verificata questa condizione, si ha un disequilibrio da associazione o Linkage Disequilibrium (LD). Una misura quantitativa di questo fenomeno è data dal valore D , che indica la deviazione delle frequenze dei gameti dal prodotto delle frequenze degli alleli di cui sono composti. Consideriamo ad esempio due geni A e B , ognuno con alleli A_1, A_2 e B_1, B_2 , e la frequenza attesa per l'aplotipo A_1B_1 sia p_1q_1 . Se P_{11} è invece la frequenza osservata dell'aplotipo,

$$D = P_{11} - p_1q_1$$

Il valore D' , è dato invece da:

$$D' = D/D_{\max}$$

dove D_{\max} indica il valore massimo che può essere raggiunto da D in base alle frequenze alleliche osservate (Lewontin, 1964). In questo lavoro l'analisi del Linkage Disequilibrium è stata condotta con l'ausilio del programma FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Anche in questo caso si è resa necessaria la correzione del valore di significatività per la presenza di test multipli ($P < 0.00125$).

2.3.9 Distanze genetiche

Le distanze genetiche sono la misura, attraverso un valore numerico, delle differenze genetiche tra popolazioni o specie. La distanza è generalmente una funzione della differenza tra sostituzioni nucleotidiche di una sequenza o, come in questo caso specifico, di frequenze alleliche. In questo lavoro sono state utilizzate le distanze di Nei (1972), di Reynolds (Reynolds et al., 1983) e $\Delta\mu^2$ (Goldstein et al., 1995). Le distanze genetiche di Nei e Reynolds si basano entrambe sull'assunzione che le differenze tra popolazioni siano dovute alla deriva genetica. In particolare, le distanze di Nei seguono il modello degli alleli infiniti (Kimura e Crow, 1964), nel quale in una popolazione sussiste un equilibrio tra pressione di mutazione e deriva genetica. Considerando queste assunzioni, la distanza genetica è direttamente proporzionale al tempo trascorso dalla separazione delle due popolazioni.

In termini matematici, la distanza di Nei è data da:

$$D = -\text{Log}(I)$$

dove

$$I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_{xx}J_{yy}}}$$

e

$$J_{xx} = \sum p_{iy}^2$$

$$J_{xy} = \sum p_{ix} p_{iy}$$

e p_{ix} è la frequenza dell'allele i nella popolazione X .

La distanza genetica di Reynolds (Reynolds et al., 1983) esclude il contributo della mutazione e assume che le differenze tra le popolazioni siano dovute all'effetto della deriva genetica. Inoltre, le dimensioni della popolazione non rimangono costanti nel corso del tempo e non sono uguali tra di loro. In questo modo, la distanza genetica non varia linearmente con il tempo, ma anche in proporzione al rapporto $1/N$, dove N è la dimensione effettiva della popolazione. Quindi, se la dimensione effettiva della popolazione raddoppia, la deriva genetica avrà un effetto ridotto del 50% rispetto al periodo precedente la variazione, con conseguente riduzione del 50% dell'aumento della distanza genetica tra le popolazioni.

Le distanze genetiche $\Delta\mu^2$ sono più specifiche per i microsatelliti, in quanto la loro stima prende in considerazione il numero di ripetizioni dei vari alleli. Il confronto con le distanze di Nei non ha evidenziato differenze particolari, a parte il caso in cui si effettuano valutazioni filogenetiche su specie differenti con un elevato grado di divergenza (Goldstein et al., 1995).

Le distanze $\Delta\mu^2$ sono state calcolate con la formula:

$$D = (\mu_A - \mu_B)^2$$

dove μ_A e μ_B sono rispettivamente le dimensioni medie degli alleli nelle popolazioni A e B . In questo lavoro le matrici di distanze genetiche di Nei e Reynolds sono state calcolate con il programma PHYLIP 3.65 (Felsenstein et al., 1989), mentre le distanze $\Delta\mu^2$ sono state calcolate con il software R_{ST}CALC (Goodman, 1997).

2.3.10 Alberi filogenetici

Negli studi filogenetici le relazioni evolutive tra le specie investigate sono rappresentate graficamente mediante alberi filogenetici. Questi sono grafici costituiti da nodi, che rappresentano le unità tassonomiche operative (OTU), e da rami che uniscono i nodi, che rappresentano le distanze tra i due. I metodi per la costruzione di un albero filogenetico possono essere raggruppati in tre classi principali:

21

1. metodi basati sul calcolo della matrice delle distanze (Neighbor joining, UPGMA) (Saitou & Nei, 1987);
2. metodi di massima parsimonia (Minimum Evolution, Maximum Parsimony) (Eck & Dayhoff, 1966);
3. metodi di massima verosimiglianza (Maximum Likelihood) (Felsenstein, 1981).

Fra quelli appartenenti alla prima categoria, l'UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) è indubbiamente il più semplice. Esso consente di ottenere un albero con radice, assumendo omogeneità nelle velocità di sostituzione lungo tutti i rami dell'albero e rendendo possibile in tal modo una correlazione lineare tra distanze genetiche e tempi di divergenza secondo l'assunto dell'orologio molecolare. Sulla base del calcolo della matrice vengono individuate le OTUs più simili e raggruppate tra loro, quindi tale coppia viene clusterizzata con quella che ha distanza minore con essa.

Il metodo del Neighbor Joining (NJ), uno dei più utilizzati e precisi, consente di ottenere un albero senza radice ammettendo che la velocità di sostituzione possa variare lungo i rami dell'albero. Si parte da una topologia a stella con un unico nodo centrale al quale sono collegate tutte le OTUs. Successivamente viene individuata la coppia di taxa con distanza minima (Neighbor), raggruppata da un singolo nodo, e collegata da un nuovo ramo al nodo centrale della stella di partenza. Si ripete quindi l'inserimento di rami per tutte le coppie di OTUs considerate e, tra tutti gli alberi possibili, viene via via scelto quello che ha lunghezza dei rami minore.

Alla seconda categoria appartengono i metodi basati sul principio della massima parsimonia (ME, MP), secondo il quale l'albero filogenetico più "parsimonioso", o adatto a descrivere la dinamica evolutiva, è quello che richiede il minor numero possibile di sostituzioni per spiegare le differenze osservate tra le OTUs in esame. Non si opera su tutti i siti del multi-allineamento, ma solo su alcuni definiti "significativi", che presentino almeno 2 residui uguali. Si tratta di un metodo essenzialmente qualitativo, che non consente dunque di calcolare i tempi di divergenza, ed è particolarmente adatto per l'analisi delle sequenze aminoacidiche. Consente di utilizzare molti taxa sfruttando completamente l'informazione dei singoli caratteri, tuttavia presenta dei limiti in quanto può produrre più alberi equamente parsimoniosi non facilmente interpretabili e non tiene conto delle sostituzioni multiple.

Il Maximum likelihood (ML), conosciuto anche come metodo della massima verosimiglianza, si propone di ottenere l'albero filogenetico più

probabile sulla base dello stato dei nucleotidi (o degli aminoacidi) osservato in un gruppo di OTUs, assumendo uno specifico modello di sostituzione nucleotidica (o aminoacidica). Per ciascun sito del multi-allineamento si calcola la probabilità che esso sia generato da un preciso albero. Estendendo l'analisi di probabilità a tutti i possibili alberi, si ottiene l'albero a maggior probabilità di rappresentare il multi-allineamento. È il metodo più corretto per valutare le significatività degli alberi, consentendo l'impiego di modelli di evoluzione molecolare particolarmente sofisticati e realistici, ma ha un grosso limite rappresentato dall'enorme mole di calcolo per ottenere il risultato. È impossibile, infatti, ottenere risultati per multi-allineamenti con più di 20-30 sequenze; per tale ragione sono stati prodotti vari metodi di approssimazione, tra cui il Quartet Puzzling (QP), in cui si fanno operazioni su gruppi di 4 sequenze e i risultati vengono intersecati tra loro (Schmidt et al., 2002).

In questo lavoro gli alberi genetici sono stati costruiti con il metodo del Neighbor Joining (Saitou e Nei, 1987) dalle diverse matrici di distanza genetica. Il metodo Neighbor Joining costruisce un albero "unrooted", e fornisce risultati più attendibili di altri metodi quali UPGMA e ML (Saitou e Nei, 1987).

2.3.11 Valutazione della presenza di strutture nella popolazione

Per valutare l'origine di ogni individuo e il grado di "admixture" tra popolazioni, è stato utilizzato un modello bayesiano sviluppato nel software STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al. 2000). Si è deciso di includere questo tipo di analisi per verificare che la suddivisione in popolazioni fatta in base all'area geografica di provenienza fosse coerente con il differenziamento genetico degli individui. Questo modello consente di realizzare una serie di simulazioni atte a stimare il valore del logaritmo naturale $\ln P(D)$ della probabilità che gli individui siano ripartiti in un certo numero K di popolazioni (tutte in equilibrio HW e con loci in linkage equilibrium) ed assume la presenza di K popolazioni (dove K può essere non conosciuto), ciascuna delle quali è caratterizzata da un set di frequenze alleliche a ciascun locus. Gli individui del campione vengono assegnati probabilisticamente a un cluster o a più di un cluster, in quest'ultimo caso se i loro genotipi indicano che hanno una origine da più popolazioni (admixed). L'analisi è stata condotta utilizzando le opzioni Admixture model e Allele frequencies correlated, più adatte nel caso in cui le popolazioni, a causa della presenza di flusso genico o di una origine comune, non presentano un elevato grado di differenziazione. (Falush et al. 2003; Pritchard et al. 2007). Per stimare il numero di cluster più

probabile (K) è stata utilizzato il parametro $\text{LnP}(D)$, e sono state eseguite 10 simulazioni per ogni valore di K, ognuna con 50.000 permutazioni e 10.000 cicli di burning. Il numero di cicli di burning scelto consente la stabilizzazione del likelihood trace, per cui l'utilizzo di un numero di cicli più elevato non determina una variazione del risultato finale.

MUFLONE



1 INTRODUZIONE

Regno	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Classe	Mammalia
Sottoclasse	Neornithes
Ordine	Artiodactyla
Famiglia	Bovidae
Sottofamiglia	Caprinae
Genere	Ovis
Specie	O. gmelini
Sottospecie	O. g. musimon

Il muflone appartiene all'ordine degli Artiodattili, sottordine dei Ruminanti, famiglia dei Bovidi, tribù dei Caprini, genere Ovis. Secondo alcuni ricercatori il muflone costituisce una vera e propria specie mentre altri, inserendolo nel gruppo dei Gmelini, lo considerano come una sottospecie (Cugnasse, 1994). E' probabile che i luoghi d'origine dell'ovino siano stati le regioni centro-asiatiche e le montagne tibetane. L'Archeomeryx è il probabile antenato comune, ruminante di ridotte dimensioni con ancora le dita separate, pare scomparso circa 50 milioni di anni fa. Successivamente, l'alternarsi delle glaciazioni nel Pleistocene ha determinato la formazione di una serie di barriere naturali, portando all'isolamento geografico varie popolazioni di caprini, che adattandosi ai differenti ambienti hanno continuato la loro evoluzione con la comparsa di nuovi caratteri. A partire dall'area asiatica si sono diffusi nella Siberia e, quando ancora era presente il ponte terrestre con l'Alaska (Vaufrey 1929), sono andati a colonizzare tutta l'America del nord mentre ad ovest si sono sparsi in tutta l'area del mar Caspio e negli altopiani medio-orientali della Turchia, Iran ed Iraq (Fig. 3). La distribuzione degli ovini sulla superficie terrestre ha interessato solo l'emisfero settentrionale e la sua presenza in quello meridionale è solo il frutto della manipolazione dell'uomo.

Le relazioni filogenetiche all'interno del genere Ovis risultano al momento un problema di non semplice soluzione. Tracciare quella che è l'evoluzione di questo genere è alquanto complesso, poichè i reperti fossili a disposizione sono limitati e distribuiti in un'area molto estesa ed appare

assai complicato risalire alla loro origine attraverso la lettura delle fasi intermedie di questo sviluppo evolutivo.



Figura 3. Distribuzione naturale delle popolazioni di ovini appartenenti al Genere Ovis

La complessità del processo evolutivo si è inoltre ulteriormente accresciuta in relazione alla diversità degli aspetti presi in considerazione. Volta per volta i ricercatori hanno considerato fattori abbastanza differenti nella classificazione delle specie accomunando o dividendo gli ovini in base alla semplice distribuzione geografica e alle differenze di ordine morfologico.

In tal senso sono stati individuati due grossi raggruppamenti: il siberiano-nord-americano e quello euroasiatico. Gli ovini appartenenti al primo gruppo mostrano una corporatura tarchiata, occupano una nicchia ecologica costituita da costoni rocciosi, veri e propri dirupi ai quali si sono dovuti adattare in mancanza di specie competitive per questi habitat come ad esempio le capre (Geist 1971). Il gruppo euroasiatico evidenzia invece una corporatura più snella e slanciata, molto adatta alla corsa e, in conseguenza delle competizioni con i caprini, sono andati ad occupare areali rappresentati da ampi altipiani (Schaller, 1977; Hadjisterkotis 1992). Naturalmente i criteri geografico e morfologico non sono certamente adatti a spiegare lo sviluppo evolutivo del genere Ovis e a garantire un oggettivo inquadramento tassonomico.

Il numero dei cromosomi è stato un altro criterio adottato in considerazione della eterogeneità presente all'interno del genere che spazia fra i $2n=52$ e $2n=58$. Utilizzando un approccio innovativo, Nadler et

al. (1973) hanno dato un grande impulso alla risoluzione di questa problematica considerando gli ovini più ancestrali quelli con numero di cromosomi più elevato pari a $2n=58$. Ciò è in relazione al fatto che le capre, considerate le progenitrici del genere *Ovis*, posseggono un numero di cromosomi pari a $2n=60$. Secondo l'Autore la riduzione del numero dei cromosomi nel genere *Ovis* è dovuto ad eventi evolutivi legati alla fusione di due o più cromosomi. Pertanto, come risulta dalla figura 4, viene ipotizzato che dalle capre si è passati al genere *Ovis* per la fusione di due cromosomi.

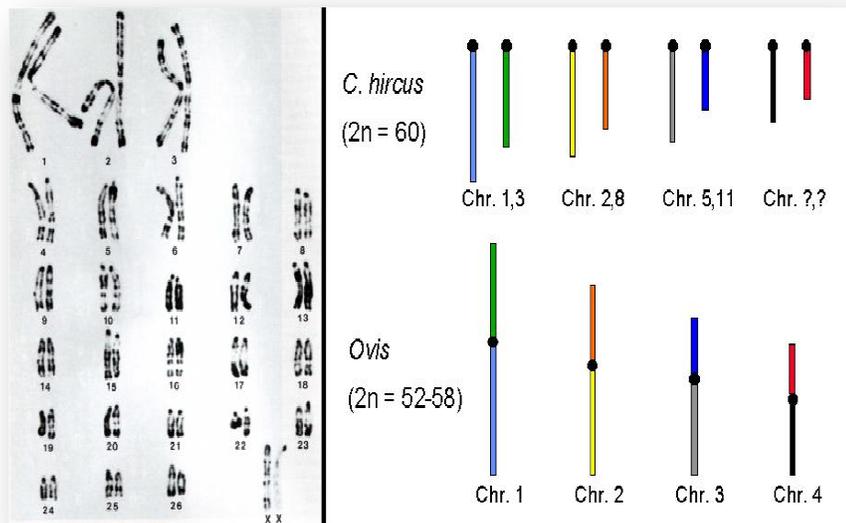


Figura 4. Arrangiamento dei cromosomi fra la capra e la pecora: a) cariotipo ovino $2N=54$; b) fusione cromosomica nel genere *ovis*

A causa di un isolamento geografico da questi ovini si sono evolute verso occidente popolazioni con un numero di cromosomi pari a $2n=54$, simile a quello dell'ovino domestico, mentre verso oriente popolazioni che sono andate ad occupare i rilievi più elevati con un numero di cromosomi pari a $2n=56$ (Fig. 5)

Non bisogna considerare che il numero dei cromosomi risulti un criterio determinante per stabilire la maggiore o minore parentela fra il genere *Ovis* e fornire risposte definitive sull'inquadramento tassonomico del genere *Ovis* e sui rapporti di parentela che intercorrono con l'ovino domestico. In un efficace esperimento è stata infatti osservata

l'impossibilità da parte di alcune pecore, nelle quali erano stati trasferiti embrioni dell'*Ovis dalli dalli* (presente nell'America del nord), di portare avanti la gravidanza nonostante i due ovini siano portatori dello stesso numero di cromosomi $2n=54$ (Buckerell et al., 1990).

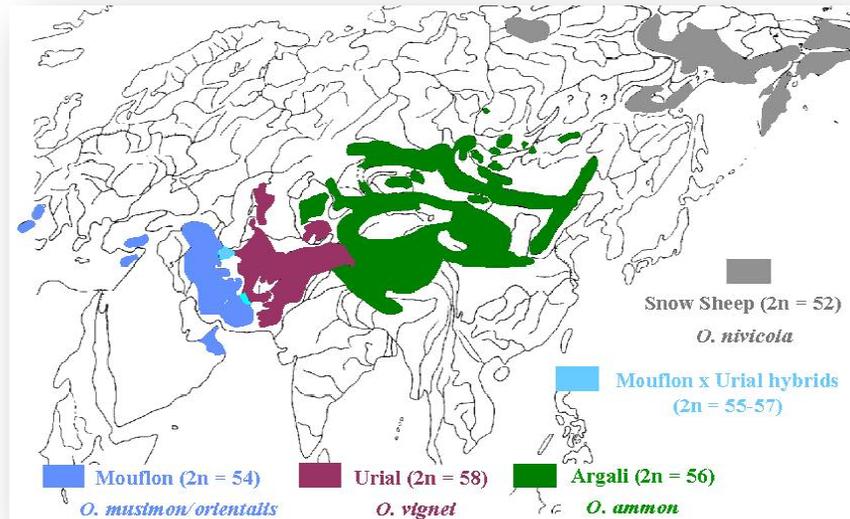


Figura 5. Distribuzione delle specie selvatiche eurasiatiche del genere *Ovis* in relazione al numero cromosomico

Tale incompatibilità è verosimilmente da attribuire alla durata delle gravidanza che, nell'ovino selvatico, risulta fisiologicamente di 180 giorni contro i 150 della pecora domestica. Un notevole impulso alla caratterizzazione delle specie del genere *Ovis* si è avuto dallo studio dei polimorfismi proteici (Kalab et al 1990; Randi et al, 1991). Queste analisi sono state introdotte intorno agli anni 70 per mettere in evidenza il polimorfismo proteico di proteine eritrocitarie e plasmatiche (Montgelard et al 1994). Polimorfismi proteici sono stati studiati a livello di proteine antigeniche di membrana, evidenziabili mediante fenomeni di agglutinazione degli eritrociti, che ha permesso la distinzione di diversi gruppi sanguigni (Nguyen and Bunch, 1980). Sono state rilevate anche numerose differenze interspecifiche nei fenotipi emoglobinici, transferrinici, nella concentrazione intraeritrocitaria del potassio, delle proteine X e delle diaforesi. Per alcune di queste proteine sono stati evidenziati dei polimorfismi che però si sono rivelati insufficienti per

relazionare filogeneticamente il genere *Ovis* o per dare una valutazione della diversità genetica a livello intraspecifico (Hiendleder et al 1991). In precedenti nostre ricerche, volte alla definizione delle differenze fenotipiche fra il muflone e l'ovino domestico di razza Sarda, abbiamo mostrato come il muflone risulti distinguibile per il fenotipico emoglobinico. Tale distinzione non risulta legata al solo pattern elettroforetico ma anche alla diversa attività funzionale che l'emoglobina del muflone esprime rispetto all'ovino domestico. In particolare abbiamo evidenziato che l'emoglobina del muflone manifesta un'elevata affinità per l'ossigeno che lascia intendere come l'animale abbia evoluto l'adattamento a quote elevate. Altro aspetto distintivo è legato alla composizione ionica dell'eritrocita. I mufloni mostrano solo il carattere alto potassio intraeritrocitario contrariamente all'ovino domestico di razza sarda che manifesta una bassa concentrazione dello ione (Naitana et al.1988; 1990). Questi due caratteri risultano chiaramente differenti fra i due ovini e possono essere impiegati nel caso di contese giudiziarie per il riconoscimento differenziativi (Naitana et al., 1993). Tuttavia anche questi aspetti riguardanti i polimorfismi biochimici non sono esaustivi e non ci permettono di conoscere a fondo tutte le problematiche relative al genere *Ovis*.

Recentemente sono stati introdotti nuovi approcci metodologici per meglio comprendere l'inquadramento tassonomico del genere, per tracciarne un percorso evolutivo, per stabilire i rapporti di parentela con l'ovino domestico e per valutare il grado di variabilità genetica all'interno dei gruppi. Fra le metodologie che possono fornire risposte concrete ai quesiti ancora senza risposta, un ruolo determinante ci è offerto dall'analisi diretta del DNA sia esso di origine mitocondriale o nucleare. L'analisi mediante RFLP (restriction fragment length polymorphisms) del DNA presente all'interno dei mitocondri ha fornito risultati particolarmente interessanti. I dati hanno messo in evidenza differenze sostanziali fra il gruppo degli Argali e degli Uriali rispetto al muflone che manifesta diversi tratti in comune con le più comuni razze ovine presenti in Europa (Hiendleder e coll., 1998). Ciò conferma quanto ipotizzato da diversi ricercatori che il muflone rappresenta uno dei progenitori dell'ovino domestico. Anche l'impiego del DNA nucleare può essere di estremo interesse nello studio della caratterizzazione genetica del muflone.

Attualmente il genere *Ovis* è rappresentato da un elevato numero di specie e sottospecie diffuse in tutto l'emisfero nord. Nell'area europea sono presenti due mufloni: *Ovis g. musimon* che vive allo stato naturale in Corsica e Sardegna e *Ovis g. ophion* che è presente in larga parte nella

foresta di Paphos dell'isola di Cipro. È dibattuto se il muflone sia una specie autoctona della Sardegna e della Corsica data la scarsità di reperti fossili, anche se all'inizio del secolo da uno studioso francese (Vaufrey, 1929), raccogliendo una segnalazione di un connazionale (Locard, 1872) su un ritrovamento in prossimità di Bastia di un reperto fossile (attualmente introvabile) riferibile alla costola di un muflone ipotizzava la presenza del muflone in Corsica e Sardegna durante il pleistocene, arrivato attraverso un ponte terrestre stabilitosi fra la Toscana, l'arcipelago dell'Elba e la Corsica. Questo ipotetico ponte si era formato in seguito all'abbassamento del livello dei mari determinato dalla ricorrenti glaciazioni. Questa ipotesi non viene più presa in considerazione per il fatto che a tutt'oggi non sono stati ritrovati reperti fossili che fanno risalire al periodo pleistocenico la presenza del muflone in Sardegna e in Corsica. Più recenti evidenze zooarcheologiche riscontrate presso Khirokitia a Cipro (Hadjisterkotis, 1992) ed in Corsica (Lanfranchi e Weiss, 1977) fanno ipotizzare che l'introduzione del muflone sia avvenuta intorno al quinto millennio al seguito di popolazioni di provenienza medio-orientale che poco timore mostravano per i viaggi via mare. In questo periodo la fase di addomesticamento dell'ovino, intrapresa intorno al settimo millennio nell'altopiano dell'Anatolia nella Turchia sud-orientale, era nella sua fase ancora iniziale quando ci si limitava a rinchiudere e mantenere all'interno dei recinti gruppi di ovini selvatici per utilizzarli esclusivamente come fonte alimentare.

1.1 Morfologia

Il muflone sardo è un ungulato di piccola taglia, raggiunge al garrese un'altezza di 60- 70 cm, una lunghezza di 90-105 cm e un peso vivo che non supera i 45 kg. La mole delle femmine risulta inferiore rispetto ai maschi con 45-60 cm di altezza, 95 cm di lunghezza e un peso di 25-35 Kg . Il muflone presenta un dimorfismo sessuale caratterizzato dalla presenza nel maschio di corna con sviluppo a spirale, larghe alla base, a sezione triangolare, che terminano con le punte divergenti e possono raggiungere la lunghezza di 80-90 cm. La superficie delle corna è di colore bruno scuro ed è percorsa da numerosi rilievi anulari. L'accrescimento annuale è alquanto cospicuo fino ai 5 anni per poi diminuire considerevolmente con l'età, sebbene risulti sempre riconoscibile un anello annuale circolare più evidente degli altri che consente di determinare in questo modo l'età dei maschi (Pfeffer, 1967). I maschi inoltre presentano nella regione dorsale

del torace la cosiddetta "sella", macchia di peli bianchi circoscritta di dimensioni e forma variabile visibile all'età di 2 o 3 anni, dopo la muta estiva la sella risulta poco evidente. Essa viene considerata generalmente come una caratteristica della purezza dell'animale. Si ritiene infatti che i maschi privi di sella siano molto probabilmente discendenti da incroci con l'ovino domestico. Il vello è ruvido e corto, mai lanoso e ricciuto, dal colorito bruno-rossastro più o meno intenso, inframmezzato da aree di color nero, la pelliccia risulta più lunga sul collo, sul petto, sul garrese e sulle spalle nei maschi. Le regioni ventrali e perineali, le porzioni distali degli arti come pure il disco codale risultano di colorito biancastro e così la distribuzione di peli bianchi intorno al muso ed all'arcata orbitaria nelle femmine la cui estensione varia e consente di risalire con una certa approssimazione all'età dell'animale.

I dati in letteratura sulla durata della vita del muflone sono abbastanza scarsi; Flower (1931), prendendo in considerazione diverse specie di vertebrati, ha affermato che una femmina ha raggiunto l'età di 19 anni nel Giardino Zoologico di Londra. Naturalmente questa è soltanto una data indicativa e deve essere considerata con le dovute cautele poiché l'animale è vissuto all'interno di un giardino zoologico.

1.2 Habitat

Il Muflone rappresenta lo spirito di adattabilità generato dalla necessità di adeguarsi all'ambiente in cui vive o viene introdotto. E' questo si è potuto rivelare nell'introduzione del muflone in ambienti molto diversi da quello originario, dove si è adattato mirabilmente alle più svariate situazioni. Un animale tipicamente montano per molti studiosi che tende ad occupare i rilievi più alti. Al contrario sembra che in Sardegna occupasse un tempo anche gli ambienti di pianura. E' logico pensare che la presenza dell'uomo, è soprattutto dell'uomo-cacciatore che agisce da vero predatore sia la causa che porta ed ha portato il muflone nei luoghi difficilmente accessibili. Il terreno ideale per il muflone è quindi costituito dagli altopiani, dai grandi spazi aperti; con modesti rilievi coperti di vegetazione erbacea e forestale che vengono però abbandonati, in favore di territori rocciosi e scoscesi, per questioni di disturbo e sicurezza (Silvestri, 1975). In tal senso è possibile identificare il muflone in una nicchia Ecologica complementare a quella dei caprini. Il Muflone è di abitudini sedentarie, il suo spazio vitale secondo quanto riferiscono Pfeffer e Mottl in un ambiente dove trova nutrimento e sicurezza si mantiene

entro un raggio di 2-3 km, dai luoghi dove abitualmente dimora. All'interno del proprio territorio esistono punti fissi di riferimento (rocce, alberi, tronchi) che vengono marcati con sostanze odorose e urina dai maschi durante la stagione di riproduzione. Il muflone è capace di grandi spostamenti, ad esempio in seguito a forti nevicate, alla ricerca di territori più adatti. E' probabile che l'utilizzo di determinate fasce altitudinali sia connesso alle necessità trofiche, alla ricerca di zone-rifugio e al condizionamento invernale dovuto allo spessore del manto nevoso (nei casi in cui questa specie sia presente in alta montagna).

1.3 Abitudini alimentari

Il muflone possiede caratteristiche da ruminante pascolatore di tipo selettivo, con necessità metaboliche medie di circa 4,3 kg di foraggio verde ogni giorno (per 30 kg di peso vivo dell'animale; Mustoni et al. 2002). Le popolazioni sarde e corse presentano abitudini da brucatori di fogliame di corbezzolo (*Arbutus unedo*), rovo (*Rubus spp.*), frassino (*Fraxinus spp.*) e leccio (*Quercus ilex*), (Pfeffer e Genest, 1969). Dove il pascolo sia sufficientemente esteso, generalmente il muflone si comporta da pascolatore e la quasi totalità della dieta può essere costituita da graminacee e leguminose (Mustoni et al. 2002). Al contrario, negli ambienti forestali, il comportamento alimentare è simile a quello tipico dei brucatori con il consumo di foglie, apici vegetativi e frutti di stagione. Le graminacee in ogni caso costituiscono da sole mediamente il 69% delle piante appetite (Mustoni et al.; 2002). Il consumo delle essenze è legato alla stagionalità, ai periodi siccitosi e ai numerosi fattori di disturbo che limitano il suo spazio vitale(competizione con il domestico, caccia etc.) e lo costringono in alcuni mesi dell' anno a consumare essenzialmente la magra vegetazione di cui dispongono. Durante la stagione estiva, la dieta del muflone è ricca in prevalenza di specie erbacee. In autunno si ha un maggiore consumo di dicotiledoni semilegnose e del loro fogliame; mentre in inverno si aggiungono gli apici quiescenti degli alberelli di rinnovamento e in alcuni casi le loro cortecce. Il numero di ore giornaliere dedicate all'alimentazione può variare dalle otto alle diciassette,mediamente distribuite in tre o cinque periodi, con massimi all'alba e al crepuscolo, e prevalentemente durante le ore di luce (Mustoni et al. 2002).

1.4 Aspetti riproduttivi

Nel muflone, i maschi e le femmine diventano sessualmente maturi in tempi diversi. La maturità sessuale viene raggiunta dai maschi a partire da un anno e mezzo di età, anche se essi non accedono alle femmine fino al terzo anno di vita (maturità sociale) (Turcke e Schminke, 1965), a causa della forte competizione all'interno del gregge. Nelle femmine, che sono poliestrali con un estro che dura tre giorni, la maturità sessuale viene raggiunta ancor prima di compiere il primo anno d'età, come riscontrato nell'area di studio di Montes (Orgosolo-Nuoro). Il periodo riproduttivo è distribuito tra ottobre e dicembre, anche se si possono avere accoppiamenti già a partire da settembre, a seconda delle caratteristiche climatiche dell'area considerata. La gestazione dura 150–160 giorni, (22 settimane circa) viene partorito di norma un solo piccolo, del peso di 2–2,6 kg (Ruiu, 1989); nel 50% dei casi due (Prien et al., 1982), ma ciò non ha trovato riscontro nell'area di studio in cui è stata svolta la presente ricerca. Durante il periodo riproduttivo i maschi si spostano a seguito del gregge di femmine, osservandolo da punti sopraelevati, e cercano di isolare quelle in estro, provvedendo poi alla loro difesa. In questo periodo avvengono violenti combattimenti tra maschi rivali, con moduli comportamentali specifici: Foreleg kick: calcio con zampa anteriore; Twist: rotazione del corpo; Head butts: cozzo frontale delle corna; Clash: scontro frontale con rincorsa (McClelland, 1991). Analisi su crani di mufloni maschi hanno mostrato segni di ferite alle corna, alle ossa e ai denti dovute a questi combattimenti (Uhlenhaut e Stubbe, 1980).

1.5 Eco -Etologia

Il muflone ha una struttura sociale abbastanza elastica caratterizzata da aggregazioni e separazioni fra gruppi di animali nel corso dell'anno. Diverse osservazioni dei mufloni, effettuate in ambienti naturali, hanno evidenziato che nel periodo invernale si costituiscono branchi di 40-60 soggetti composti da adulti e giovani di entrambi i sessi. All'inizio della primavera, si verifica la segregazione dei sessi, i maschi costituiscono gruppi omosessuali mentre le femmine già al termine della gravidanza si isolano e partoriscono generalmente un piccolo. Nel corso dell'estate le femmine si riaggregano

formando piccoli gruppi che verranno contesi dai maschi; all'inizio dell'autunno si assiste alle dispute fra i maschi per il controllo dei piccoli gruppi di femmine e solo quelli vincitori delle dispute avranno accesso all'accoppiamento (Geist, 1971). Anche l'attività giornaliera è influenzata dal periodo dell'anno: risulta massimamente sviluppata al mattino e pomeriggio durante l'inverno mentre si sposta prevalentemente alle ore notturne nel corso dell'estate. Sebbene non siano stati effettuati studi per conoscere la consistenza della popolazione del muflone nell'Isola, si ritiene che attualmente il numero non desti preoccupazione e senza alcun dubbio non risulta a rischio d'estinzione. In questi ultimi anni grazie all'azione dei responsabili delle Aziende Foreste Demaniali questa specie è ora presente in areali di tutte le province della Sardegna.

2 SCOPO DEL LAVORO

Il presente lavoro si prefigge l'obiettivo di fornire un contributo alla conoscenza della situazione attuale della popolazione di muflone che vive ancora allo stato naturale nel centro della Sardegna. Questa popolazione, ridotta nei numeri e nella disponibilità dell'areale, si trova attualmente impegnata ad affrontare una ulteriore emergenza derivante dalla frammentazione del territorio e quindi dall'isolamento geografico. E' pertanto necessario procedere alla conoscenza della condizione di diversità genetica all'interno di questi gruppi onde poter programmare interventi che possano scongiurare danni irreparabili alla specie. La conoscenza della diversità genetica mediante l'impiego dei microsatelliti risulta di particolare importanza non solo per valutare lo stato di endogamia dei gruppi, ma anche per poter individuare dei tratti genici utili per la selezione dell'ovino domestico.

3 MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 32 campioni di mufloni provenienti da 3 popolazioni viventi in 3 diverse aree della Sardegna, Montelerno-Pattada, Lanusei e Montes-Orgosolo, dove si trovano dei recinti dell'Ente Foreste della Sardegna in cui vivono esemplari di muflone catturati nella zona circostante (Lanusei e Montes), o introdotti dopo la loro scomparsa, come per esempio a Montelerno, in cui la reintroduzione è stata effettuata nel biennio 1990-1991 da esemplari provenienti dalla popolazione dell'Asinara (Fig. 6). La gestione degli animali è diversa nei tre recinti. A Montelerno il recinto è completamente chiuso e solo in un'occasione si è avuto il reinserimento di due mufloni adulti provenienti dalla zona di Santulussurgiu (Nu); nel recinto di Lanusei si è creata una popolazione da un piccolo nucleo di animali in cui casualmente vengono introdotti nuovi animali vittime di bracconieri o defedati, catturati nelle zone circostanti. Molto più movimentata è invece la popolazione di Montes dove l'introduzione di nuovi animali è molto più frequente e rispecchia perciò maggiormente la situazione genetica della popolazione locale. Il prelievo dei campioni di sangue per l'estrazione del DNA da analizzare è stato effettuato mediante provette vacutainer contenente EDTA come anticoagulante. Gli animali catturati in recinti di cattura, sono stati fissati manualmente in stazione eretta ed è stato prelevato un campione di 5 ml di sangue dalla vena giugulare previa disinfezione della zona del prelievo.

Sono stati prelevati 15 campioni dal recinto di Montelerno, 9 campioni da quello di Lanusei e 8 dal recinto di Montes (Fig. 6).

3.1 Analisi microsatelliti

I campioni sono stati analizzati tramite l'utilizzo di 16 microsatelliti (tabella 2).

La conservazione di tali marcatori molecolari tra *taxa* diversi (Moore et al., 1991) ha permesso di utilizzare primers individuati in specie correlate (*Ovis aries* e *Bos taurus*). In riferimento al muflone in particolare, sino ad oggi sono stati utilizzati primers individuati nel bovino e nell'ovino (Kemp et al., 1993, Buchanan et al, 1993). Sono stati scelti loci localizzati su differenti cromosomi dell'ovino in modo da evitare il cosiddetto Linkage Disequilibrium, che si ha quando due loci sono vicini e la probabilità che il crossing over avvenga fisicamente tra i due è molto scarsa, e da assicurare un'ampia copertura del genoma del muflone.

37



FIGURA 6. Localizzazione dei siti di provenienza dei campioni di muflone utilizzati in questo lavoro

I marcatori e le sequenze nucleotidiche dei relativi primers sono stati selezionati da databases pubblici presenti su internet quali l' NCBI genome database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e l' ARKdb database (<http://www.thearkdb.org/>).

Marker	Fluoro cromo	Sequenza Primer	T.A. °C	Origine	Cromosoma
BM1824	Hex	F:GAGCAAGGTGTTTTCCAATC R:CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	54	bos taurus	1
BM4006	Fam	F:CAATGTGCATTATTTCCAAGTG R:AGAGATAACTCTTTCTTGGAGG	53	bos taurus	2
BM0827	Hex	F:GGGCTGGTCGTATGCTGAG R:GTTGGACTTGCTGAAGTGAAC	56	bos taurus	3
MCMO218	Fam	F:GATCCTAGCATCAGTCTCCAGATG R:CACTAAAAGCTTATGAAAGTTCCAG	57	ovis aries	4
MCMA14	Hex	F:TGTTTCCTCTTCCAAATATC R:GCCCTATTAAGCCAATATACAG	49	ovis aries	6
MCM139	Fam	F:CTAGGGCTATAGAGGATGGTGTGT R:TCGGACACAACTGAGCATGTG	55	ovis aries	7
MCM138	Hex	F:AGAAATGCGTGTTCCTCAAGGC R:TTAACTTCTTCATTCCATTGTGTG	48	ovis aries	9
INRA0013	Fam	F:GCACAGTGACCTCTCAATAAATGC R:CCACTATTCTTGCTGAAGAATCC	58	bos taurus	12
MCMO150	Hex	F:AGGAAAATCTCCGGAGCTAAAC R:CCACTGGAGTGAAAATGAGACA	56	ovis aries	16
BM1862	Fam	F:AAGCAAAAAGGCTGATGGC R:TTGCAGATACTGGCAAGTGG	56	bos taurus	17
MCMA26	Hex	F:TCTCTGCTTCCAGCCTTATTC R:AGAGCTTTTAGGACAGCCACC	55	ovis aries	18
MCM203	Fam	F:TACGCTAAGGGTTAAACAGGCC R:CCAATGAGGACAATGATGCAC	55	ovis aries	20
BM6041	Hex	F:GGCTGCTGCATGTCAGTG R:GACTTGAGCTCCTCCAGGG	58	bos taurus	22
MCMA01	Fam	F:CATTACAGCCTGTGTGAGTGTG R:GATAGTTCTATCCAACCGTCCC	55	ovis aries	23
BMS1714	Hex	F:TTTATCCCAAGAGTTCCACC R:AGGTGCTTGCAGTGAATCTG	55	bos taurus	25
MNS5	Fam	F:ACAGCAGCAAAGACTCAGCA R:GAAGAAGAAACATGATGGGCA	55	ovis aries	?

Tabella 2. Generalità sui markers microsatelliti utilizzati e localizzazione cromosomica nella specie ovina

Gli oligonucleotidi *forward* di ogni coppia di primers utilizzati nella reazione di polimerizzazione a catena (*PCR*) dei marcatori sono stati marcati con dei fluorocromi (6-FAM e HEX) all'estremità 5', in modo che potessero essere riconosciuti da un analizzatore di fluorescenza di un sequenziatore automatico.

La reazione di amplificazione è stata eseguita come già descritto precedentemente.

Il profilo termico è stato il seguente:

DENATURAZIONE INIZIALE	94°C	2'	}	30cicli
DENATURAZIONE	95°C	30''		
ANNEALING	X°C	1'		
ESTENSIONE	72°C	1'30''		
ESTENSIONE FINALE	72°C	5'		

X= temperatura specifica per ogni primers

4 RISULTATI

Tutte le 16 coppie di primers selezionate hanno amplificato prodotti specifici e polimorfici nel DNA di muflone. Quattordici microsatelliti sono risultati polimorfici in almeno uno dei tre gruppi analizzati, con un numero di alleli che va da 2 a 7 (Tabella 3).

La media degli alleli evidenziati nel totale dei campioni analizzati è stata di $4 \pm 1,664$ per locus (media \pm DS) e non sono state evidenziate differenze tra i tre gruppi analizzati con medie di $2,429 \pm 0,852$, $2,214 \pm 0,893$ e $2,3571 \pm 1,082$ rispettivamente per i gruppi di Montelerno, Lanusei e Montes. Nelle figure 7 e 8 sono riportati i grafici relativi alle frequenze alleliche dei 14 loci nelle 3 popolazioni esaminate, in ascissa sono indicati i diversi alleli mentre nelle ordinate è indicata la frequenza allelica.

Otto marcatori sono polimorfici in tutte le popolazioni. Dodici marcatori hanno alleli privati tipici di un gruppo, vale a dire completamente assenti nelle altre 2 popolazioni studiate (ad esempio l'allele 2 del marcatore MCM0218 è abbondante nel gruppo di Lanusei, ma assente nelle altre 2).

MARKER		Montelerno	Lanusei	Montes
BM1824	1	0,17	0	0,357
	2	0,375	1	0,643
	3	0,33	0	0
	4	0,125	0	0
MCM	1	0,83	0	0,187
	2	0	0,78	0
	3	0,17	0,22	0,813
BM6041	1	0	0,11	0
	2	1	0,78	0,69
	3	0	0	0,06
	4	0	0	0,25
	5	0	0,11	0
MCMO150	1	0	0,22	0
	2	0,5	0,78	1
	3	0,5	0	0
MCM138	1	0,25	0,05	0,94
	2	0,75	0,95	0,06
MNS5	1	0,43	0,61	0,93
	2	0,57	0,11	0,07
	3	0	0,28	0
MCMA26	1	0	0,11	0
	2	0	0,78	0,29
	3	0	0,11	0
	4	0	0	0,14
	5	0,27	0	0,14
	6	0,4	0	0,43
	7	0,33	0	0
MCMA14	1	0	0	0,2
	2	0	0	0,3
	3	0	0	0,1
	4	0	0,07	0
	5	0,17	0,07	0
	6	0,46	0,56	0,4
	7	0,37	0,3	0
BMS1714	1	0,31	0	0
	2	0,54	0,72	0,29
	3	0,15	0	0,71
	4	0	0,28	0
MCM139	1	0,33	1	1
	2	0,6	0	0
	3	0,07	0	0
MCM203	1	0,14	0,19	0
	2	0,79	0,12	0,56
	3	0	0,69	0,44
	4	0,07	0	0
MCMA01	1	0,57	0	0
	2	0	0	0,29
	3	0,3	0,72	0,43
	4	0	0,28	0
	5	0	0	0,14
	6	0,13	0	0,14
BM4006	1	0,67	0	0,06
	2	0	0	0,13
	3	0,33	1	0,81
BM0827	1	1	0,5	1
	2	0	0,5	0

Tabella 3. Frequenze alleliche osservate per ciascun marcatore all'interno di ogni singola popolazione.

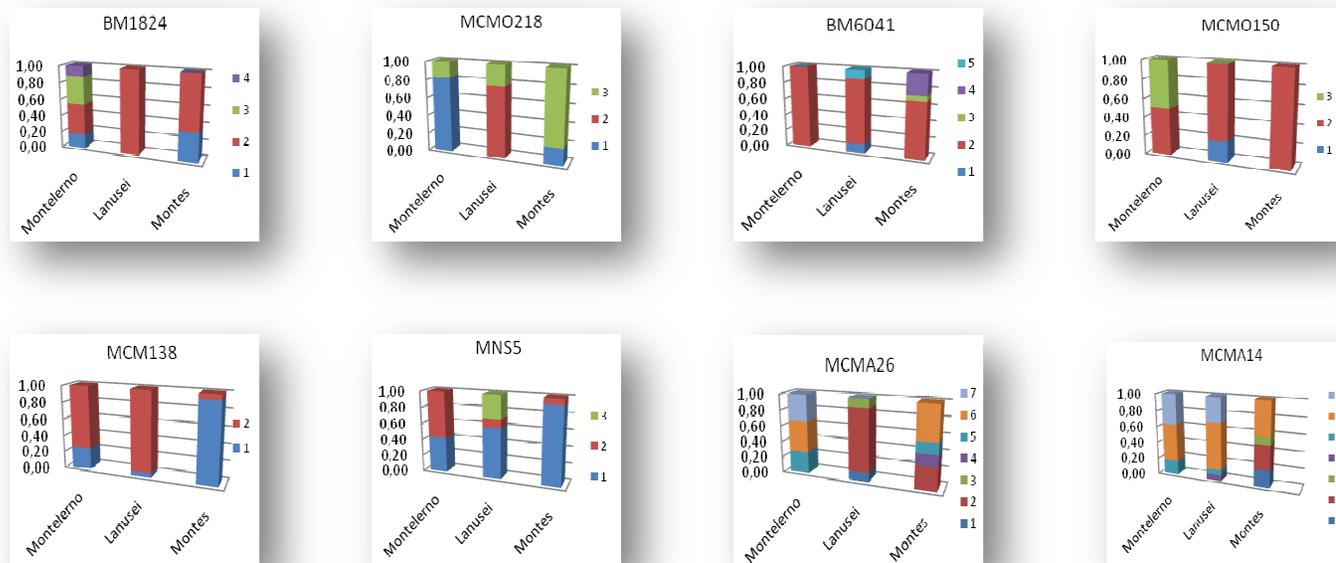


FIGURA 7. Frequenze alleliche dei loci analizzati

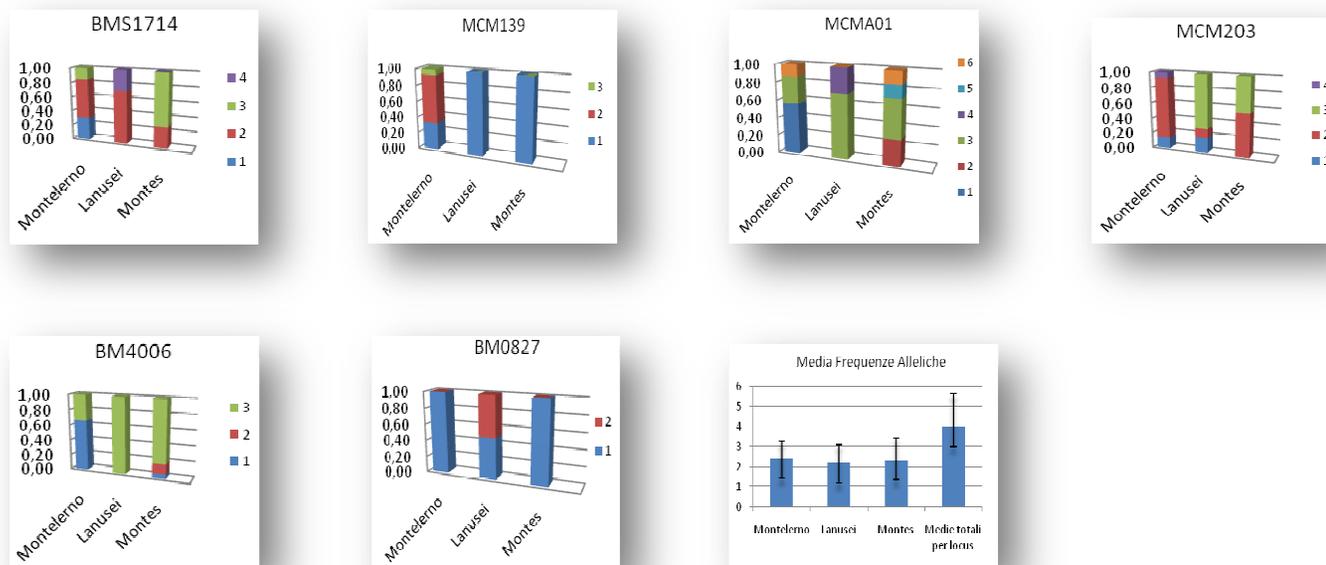


FIGURA 8. Frequenze alleliche dei loci analizzati

Il calcolo dell'eterozigosità, osservata cioè la probabilità che un individuo preso randomicamente da una popolazione sia eterozigote per due qualsiasi alleli di un locus, presenta un'elevata variabilità tra le popolazioni. Per esempio il marcatore MCM203 ha un'eterozigosità pari a 0 nella popolazione di Montelerno, di 0.125 in quella di Lanusei e 0.875 in quella di Montes.

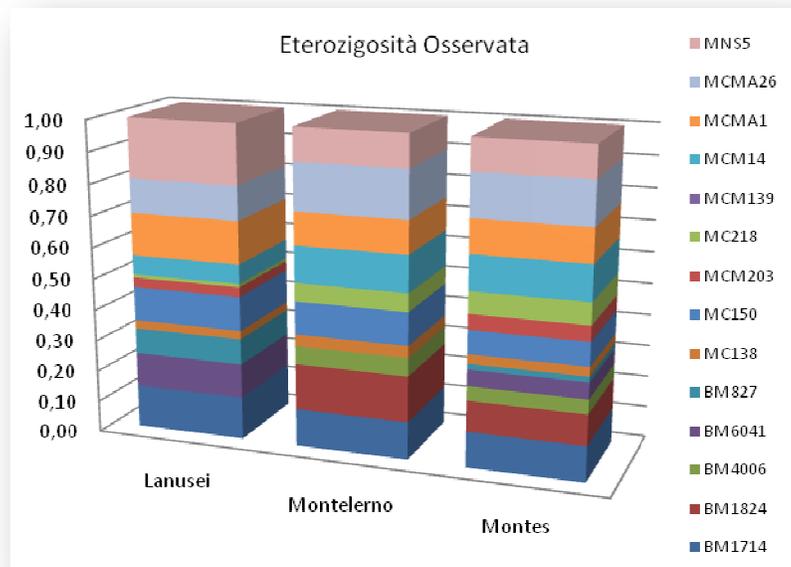


FIGURA 9. Eterozigosità calcolata come probabilità che un individuo qualsiasi sia eterozigote osservata nelle tre popolazioni analizzate. L'assenza delle barre può essere dovuta a mancanza di eterozigoti o ad assenza dell'allele in quella specifica popolazione.

Il test di deviazione dalla legge di Hardy-Weimberg ha messo in evidenza che 2 loci (MCM203, MCM139,) deviano dall'equilibrio solo nel gruppo di mufloni appartenenti alla comunità di Montelerno. In alcuni casi la deviazione può essere imputata alla mancanza di eterozigoti, come ad esempio il marcatore MCM203 che ha 4 alleli nel gruppo di Montelerno, ma tutti in omozigosi. Dopo correzione di Bonferroni il livello di significatività $P < 0,0012$ (Tabella 4).

La diversità genetica (H) è un indice di probabilità che 2 alleli di ciascun marcatore polimorfico scelti randomicamente siano diversi nel campione presenta un'elevata variabilità all'interno di ciascuna popolazione in esame. Calcolata singolarmente per ogni marcatore varia tra 0 e 0.73 a

Montelerno, tra 0 e 0.62 a Lanusei, e da 0 a 0.78 a Montes (Fig. 10).

Locus	Montelerno			Lanusei			Montes		
	Obs.Het	Exp.Het	P-value	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
BM1714	0.6923	0.6153	0.1197	0.5556	0.6603	1	0.5714	0.4395	1
BM1824	0.8333	0.7753	0.2157	X	X	X	0.7149	0.4945	0.4394
BM4006	0.3333	0.7011	0.1376	X	X	X	0.3750	0.3416	1
BM6041	X	X	X	0.4444	0.3926	1	0.6250	0.6917	1
BM827	X	X	X	0.3333	0.6476	0.5035	X	X	X
MC138	0.2142	0.4153	0.4153	0.1111	0.1111	1	0.1250	0.5916	1
MC150	0.6000	0.6000	0.6278	0.4444	0.3661	1	X	X	X
MCM20	0.0000	0.7037	0.0005*	0.1250	0.5333	0.0156	0.8750	0.5916	0.1394
MC218	0.3333	0.6328	1	0.444	0.6603	1	0.3750	0.3250	1
MCM13	0.0000	0.7885	0.000*	X	X	X	X	X	X
MCM14	0.6667	0.6418	1	0.2500	0.6167	0.0228	1	0.7777	0.7022
MCMA1	0.6000	0.7195	0.0019	0.5556	0.6603	1	0.2857	0.8461	0.0041
MCMA2	0.8667	0.6965	0.2083	0.4444	0.3926	1	0.8571	0.7582	0.0353
MNS5	0.6000	0.5586	0.6171	0.7778	0.6862	0.3293	0.1428	0.6044	1

Tabella 4. Frequenze alleliche osservate e attese secondo la legge di Hardy-Weimberg per ciascun marcatore utilizzato nelle tre popolazioni analizzate. In rosso sono mostrati i marcatori le cui frequenze differiscono statisticamente da quanto postulato da Hardy-Weimberg. X=gene monomorfico

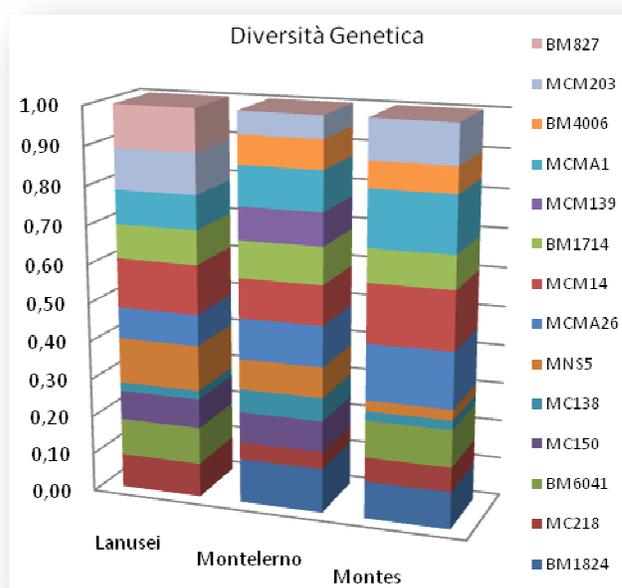


FIGURA 10. Gene diversity calcolata come probabilità che due alleli di un marcatore polimorfico, scelti randomicamente, siano differenti in un campione

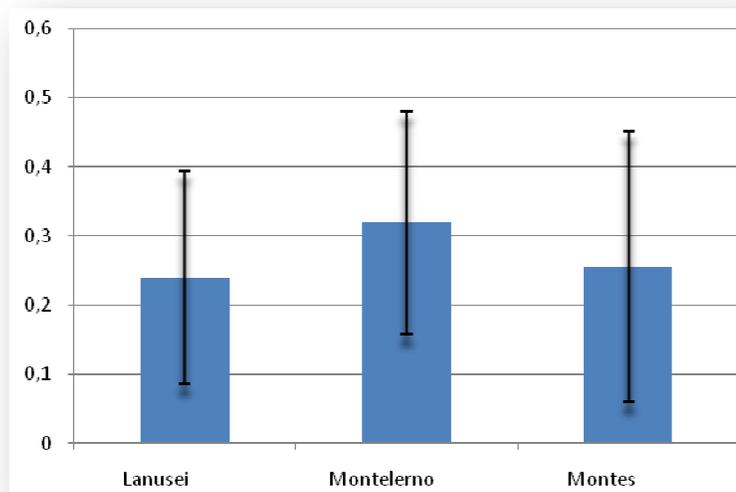


FIGURA 11. Diversità genetica per tutti i locus con anche segnata la deviazione standard

Il test per la differenziazione genetica (F_{st}), utilizzato per stimare la distanza genetica tra due popolazioni, è stato calcolato per ogni marcatore singolarmente e per tutti i microsatelliti insieme. Il fatto che quasi tutti i valori risultanti siano significativi ($p < 0.05$) indica una forte differenziazione tra i tre gruppi.

	Montelerno	Lanusei
Lanusei	0.42989 (0.00000)	
Montes	0.38577 (0.00000)	0.39136 (0.00000)

Tabella 5. Distanza genetica tra popolazioni calcolata mediante analisi dell'indice F_{st} . $P < 0.05$ indica distanza genetica significativa tra le popolazioni.

I risultati del Bottleneck test sono mostrati in tabella 6. L'analisi è stata eseguita utilizzando il modello di evoluzione TPM con 1000 permutazioni per generare i valori di eterozigosità teorica in base al numero di alleli k . Sono indicati i valori di P relativi ad un eccesso (drastica diminuzione della popolazione) o una carenza di eterozigoti (espansione rapida della popolazione). È possibile osservare che solo la popolazione di Montelerno presenta un eccesso di eterozigoti andando a suggerire un evento che ha portato ad una riduzione drastica del numero di individui.

	Lanusei	Montelerno	Montes
P(H _b)	0.76758	0.99939	0.61768
P(H _e)	0.25977	0.00085*	0.41553
P(H)	0.51953	0.00171*	0.83105

Tabella 6. Bottleneck test. Per ogni popolazione sono indicati i valori di probabilità per una carenza ed eccesso di eterozigoti. Il terzo valore si riferisce alle due probabilità combinate

Nel grafico dell'AFC riportato in Figura 12, ciascun individuo è rappresentato da un quadretto di colore diverso a seconda della popolazione geografica di appartenenza ed è collocato entro lo spazio tridimensionale in base alla distanza genetica, testata dal software, rispetto agli altri individui. È possibile osservare come le 3 popolazioni di mufloni siano clusterizzate ognuna in una zona diversa del grafico, suggerendo ulteriormente la netta divisione che è presente tra questi 3 gruppi.

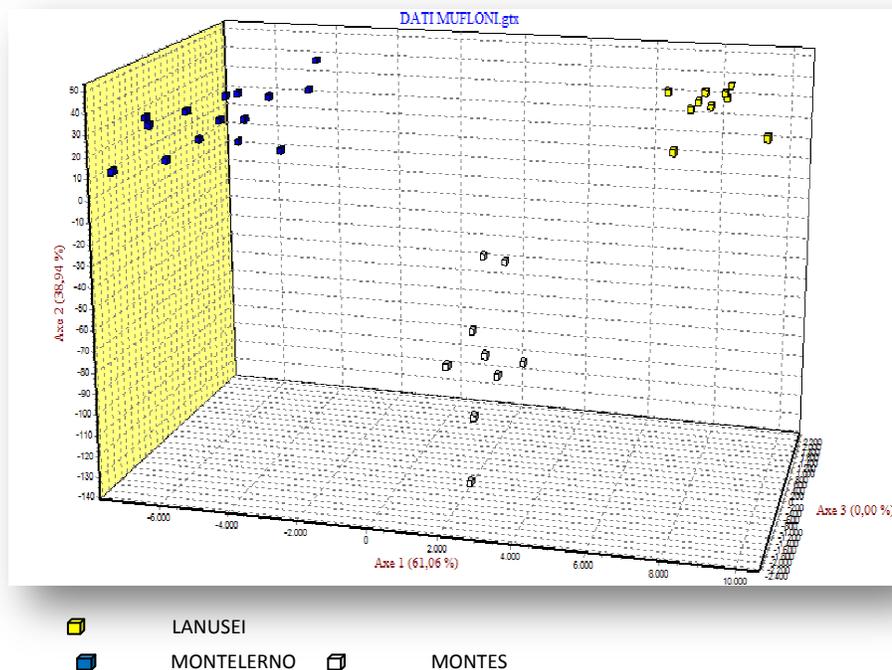


FIGURA 12. Grafico dell'AFC che mostra la differenziazione genetica tra le diverse popolazioni

5 DISCUSSIONE

Studi sulla variabilità genetica di popolazioni di muflone effettuati nel corso degli ultimi anni con l'analisi dei gruppi sanguigni, dei polimorfismi proteici o del DNA mitocondriale hanno evidenziato una bassa variabilità intraspecifica (Hiendleder et al., 1991). L'utilizzo di sequenze ipervariabili, raramente sottoposte a selezione, ereditabili in maniera mendeliana e relativamente semplici da analizzare ha permesso di analizzare più dettagliatamente il genotipo di ciascun individuo e desumere la struttura genetica della popolazione cui l'individuo appartiene. Questo lavoro mette in evidenza come sia possibile effettuare uno studio sulla variabilità genetica di popolazioni di muflone naturali o introdotte e sulla loro struttura utilizzando come marcatori molecolari i microsatelliti.

L'introduzione dei microsatelliti negli studi di genetica di popolazione ha enormemente migliorato e facilitato le analisi di paternità, maternità e parentela, la determinazione della diversità genetica, lo studio della struttura e della storia recente di una popolazione (Petit et al., 1997a, b). I microsatelliti sono particolarmente utili per studiare i mutamenti recenti a livello di popolazione. Infatti, proprio a causa della loro struttura altamente ripetitiva, sono soggetti ad un tasso mutazionale notevolmente più alto rispetto a quello medio dell'intero genoma (10^{-3} - 10^{-4} contro 10^{-6}) (Dietrick et al. 1992, Weissenbach et al. 1992). La maggior frequenza con cui insorgono mutazioni nei microsatelliti è oggi imputata a diversi fenomeni, tra cui crossing overs ineguali e scivolamento durante le fasi di replicazione del DNA.

L'analisi statistica della presenza degli alleli all'interno di una popolazione permette di ottenere informazioni circa la sua struttura genetica ed eventualmente compararla con altre popolazioni o discriminare tra unità socio spaziali distinte all'interno di ciascuna popolazione.

I microsatelliti utilizzati sono stati ricavati da studi sia della specie bovina che di quella ovina e si sono rivelati conservati nelle regioni fiancheggianti, in quanto i primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione hanno dato un prodotto in tutte le amplificazioni condotte sul DNA del muflone. Hanno messo in evidenza un elevato polimorfismo, come indicato dal numero medio di alleli per microsatellite. Il numero medio di alleli in un gruppo di loci è considerato un indicatore ragionevole della variazione genetica all'interno di una popolazione (Nei et al., 1987). La media degli alleli evidenziati nel totale dei campioni analizzati è stata di $4 \pm 1,664$ per locus (media \pm DS) e non sono state evidenziate differenze tra i tre gruppi analizzati con medie di $2,429 \pm 0,852$, $2,214 \pm 0,893$ e $2,3571 \pm 1,082$

rispettivamente per i gruppi di Montelerno, Lanusei, e Montes. Questi dati non danno indicazioni qualitative sugli alleli presenti in ciascuna popolazione e la differenza tra le medie totali e quelle in ciascun gruppo presuppone una diversa distribuzione degli alleli, dei quali alcuni sono presenti solamente in una popolazione. Questo dato è confermato dai dati sulla distribuzione delle frequenze alleliche, dalle quali si può evincere come vi siano dei microsatelliti caratterizzanti ciascuna popolazione. Per esempio, il microsatellite MCM14 è presente con gli alleli 1,2,3 solamente nella popolazione di Montes, mentre l'allele 4 è presente solamente nella popolazione di Lanusei.

L'analisi degli spostamenti dall'equilibrio di Hardy Weimberg all'interno delle tre popolazioni ha mostrato che queste erano in equilibrio per tutti i marcatori, tranne la popolazione di Montelerno in cui solo 12 marcatori su 14 sono risultati in equilibrio. Nello specifico, i due marcatori nel gruppo di Montelerno (MCM203, MCM139) hanno messo in evidenza una minore eterozigosità rispetto a quella attesa secondo Hardy-Weimberg. Una diminuzione dell'eterozigosità potrebbe essere dovuta a quattro cause fondamentali:

- a) il locus genico è sotto selezione;
- b) la presenza di alleli nulli, cioè alleli che non possono essere messi in evidenza con la reazione di polimerizzazione a catena a causa di mutazioni nelle regioni fiancheggianti, che hanno alterato il legame con il primer oligonucleotidico specifico;
- c) inbreeding;
- d) presenza di substrutture nella popolazione. La probabilità che una di queste cause contribuisca alla scarsità di eterozigoti evidenziata in questi marcatori può essere valutata da dati addizionali, quali per esempio informazioni demografiche o distribuzione della popolazione.

La selezione di un microsatellite può avvenire solamente se associato ad un gene sottoposto a pressione selettiva, e non si può dire niente circa il linkage di questi microsatelliti con geni di questo tipo. Non si può escludere la presenza di alleli nulli, cioè di alleli che non sono evidenziabili con il nostro sistema di rivelazione.

Nel caso della metodica utilizzata nei nostri esperimenti, basata sulla reazione di polimerizzazione a catena, è sufficiente che vi sia una mutazione a carico della regione bersaglio per il primer oligonucleotidico perché questo non riconosca la sequenza omologa e non si ibridizzi, impedendo la reazione di polimerizzazione. Nel caso di un omozigote per l'allele nullo non si avrebbe nessun amplificato, mentre, nel caso di un eterozigote, amplificherebbe solamente l'altro allele, con il risultato finale

50

dell'attribuzione del genotipo ad un omozigote per l'allele visibile invece che ad un eterozigote, che porta ad una sovrastima delle frequenze alleliche degli eterozigoti. Rimane un dubbio su questa ipotesi, in quanto tutte le reazioni hanno portato ad un prodotto specifico, evidenziando la mancanza di omozigoti per l'allele nullo. Non si può escludere il fenomeno di inbreeding, dato l'isolamento cui sono sottoposte queste popolazioni e il basso numero di soggetti fondatori.

È da ipotizzare anche il contributo di substrutture della popolazione specialmente nel periodo riproduttivo dovuta alla presenza di vari nuclei di mufloni ciascuno facente capo a un maschio dominante che incrementa il proprio fitness impedendo ad altri maschi di accoppiarsi. In poche generazioni si avranno quindi gruppi di animali imparentati in cui viene incrementato l'inbreeding.

Per quanto riguarda le relazioni genetiche tra le diverse popolazioni il calcolo del fattore F_{st} ha statisticamente dimostrato che le tre popolazioni sono geneticamente distanti fra di loro dando valori di $p < 0.016$ in tutte e tre le popolazioni.

Osservando il risultato dell'AFC possiamo notare come nella figura, è evidente un elevato grado di differenziazione tra le 3 popolazioni prese in esame, infatti, ogni popolazione forma un cluster nettamente separato dalle altre.

Dal bottleneck test si può notare come il gruppo di mufloni provenienti dalla colonia di Montelerno è l'unico che presenta un'eccesso di eterozigoti statisticamente significativo, a dimostrazione del fatto che la popolazione può aver subito una riduzione demografica che ha portato ad una perdita consistente, a livello genico, di alleli e questo può essere attribuito al fatto che nella storia recente di questa popolazione, nata nei primi anni novanta da una trentina di individui prelevati dall'Asinara, sono stati introdotti due maschi con caratteri dominanti prelevati nel nuorese che ne hanno modificato la costituzione genetica creando una subpopolazione genetica con genotipo nuovo.

Uno dei principi generali della selezione naturale afferma che la rapidità del cambiamento evolutivo in una popolazione animale è direttamente proporzionale alla quantità di diversità genetica. La riduzione della diversità genetica di una popolazione ne riduce potenzialmente la sua capacità di un futuro sviluppo in senso evolutivo. Appare pertanto indispensabile conoscere in una popolazione il coefficiente di inbreeding, inteso come valutazione statistica del livello medio di parentela (ciò che gli anglosassoni chiamano kinship). La depressione da inbreeding è determinata da una riduzione dell'eterozigosità e quindi dalla probabilità che due alleli ad un

locus siano identici perché discendono da un progenitore comune. In conseguenza di ciò molti alleli recessivi con caratteri deleteri, subletali ed in alcuni casi letali diventano omozigoti e si possono esprimere fenotipicamente. Esistono in proposito prove evidentissime che la depressione da inbreeding si manifesta sui caratteri fenotipici che abbassano la fitness, cioè l'adattamento e le performance produttive e riproduttive di una popolazione determinando in molti casi, ad esempio, una riduzione della resistenza alle malattie ed agli stress ambientali e una diminuzione della fertilità, della fecondità, natalità e della vitalità degli embrioni in definitiva una caduta del successo riproduttivo (Frankel et al.1981).

Schaffer (1981) ha proposto il concetto di popolazione minima vitale di una determinata specie animale come la più piccola popolazione isolata avente una probabilità del 99% di persistervi per altri 1000 anni tenendo conto di tutti gli altri effetti casuali derivanti da incertezza demografica, genetica o da catastrofi naturali. Di recente è stata proposta una nuova classificazione da parte del IUCN sul pericolo d'estinzione delle specie animali. Le categorie proposte risultano le seguenti: specie animali in una situazione critica allorché la popolazione ha raggiunto il 50% di probabilità di estinguersi entro cinque anni ovvero nell'arco di due generazioni; specie animali in una situazione di minaccia allorché la popolazione ha raggiunto il 20% di probabilità ad estinguersi entro l'arco di 20 anni ovvero nell'arco di 10 generazioni; specie animali in una condizione di vulnerabilità si riferisce a delle specie che hanno una probabilità del 10% di estinguersi in un periodo di tempo di 100 anni. La variabilità genetica viene continuamente generata per effetto delle mutazioni e della ricombinazione mentre si riduce notevolmente per effetto della deriva genetica e della selezione. All'interno delle popolazioni composte da un grande numero di individui che restano stabili per un certo numero di generazioni la variabilità genetica raggiunge un equilibrio dinamico. Contrariamente nelle piccole popolazioni l'equilibrio genetico non risulta possibile perché la variabilità che viene persa a causa della deriva è superiore alla variabilità ricostituita dalla mutazione. Le popolazioni animali composte da un limitato numero di individui sono sottoposte ad una forte fluttuazione casuale delle frequenze alleliche e gli alleli più rari vengono persi mentre vengono fissati quelli più comuni. La fissazione degli alleli si manifesta indipendentemente dal loro valore adattativo in quanto è guidato dalla deriva casuale e non già dalla selezione naturale. Questo lavoro ha messo in evidenza come le popolazioni di muflone analizzate abbiano un elevato grado di eterozigosità nonostante il piccolo numero degli animali per gruppo e il loro isolamento.

52

Particolare sicuramente positivo è il fatto che alcuni marcatori genetici siano presenti in una sola delle popolazioni e non in altre, che rende possibile un efficiente scambio genico tra le diverse popolazioni come misura di salvaguardia della diversità genetica e tutela della specie. Da non sottovalutare è comunque la scarsità o totale assenza di eterozigoti per qualche marcatore che segnala il pericolo di un elevato grado di inbreeding e di consanguineità all'interno dei gruppi.

LEPRE



1 INTRODUZIONE

Regno	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Classe	Mammalia
Sottoclasse	Theria
Infraclasse	Eutheria
Superordine	Euarchontoglires
Ordine	Lagomorpha
Famiglia	Leporidae
Genere	Lepus
Specie	L. capensis
Sottospecie	L. c. mediterraneus

La **lepre sarda** (*Lepus capensis mediterraneus*, Wagner 1841) è un mammifero lagomorfo appartenente alla famiglia dei Leporidi.

È considerata una sottospecie della lepre del capo, *Lepus capensis mediterraneus* (Ellerman e Morrison Scott 1951; Toschi 1965; Corbet 1978; Amori et al. 1999; Spagnesi 1999), nonostante sia stata inizialmente descritta come una specie da Wagner (1841) e da Miller (1912). Palacios recentemente (1998), sulla base di valutazioni morfologiche, ha rivalutato la tesi della sua collocazione a livello specifico, (*L. mediterraneus*), sostenendo, inoltre, la similitudine con le lepri dell’Africa nord-occidentale, le quali a loro volta differirebbero sostanzialmente dal taxon della Lepre del Capo (*Lepus capensis*). La lepre sarda d’altra parte, risulta essere stata introdotta sull’isola, molto probabilmente dal Nord-Africa. Si ritiene dunque, di poter conservare la tradizionale classificazione di *Lepus capensis mediterraneus* (Wagner, 1841), in attesa di ulteriori analisi morfologiche e molecolari di confronto, fra campioni di lepre sarda e campioni provenienti dal nord e dal sud Africa. Secondo gli specialisti di biogeografia, la lepre è stata importata in Sardegna dall’uomo probabilmente in epoca posteriore al II° secolo a.c. ,perché, alcuni scritti di Polibio, sembrano escludere la sua presenza nell’isola prima di tale data.

L’ordine dei Lagomorfi comprende due famiglie: i Leporidi e gli Ocotonidi. Fra gli Ocotonidi troviamo il solo genere Ochotona, ovvero il Pica, detto anche lepre fischiante, mentre nella famiglia dei Leporidi sono raggruppati ben nove diversi generi, tra i quali l’*Oryctolagus*, comprendente

il coniglio, ed il genere *Lepus*, con le diverse specie di lepre. L'evoluzione e l'inquadramento tassonomico del genere *Lepus*, sono al momento alquanto controversi. La lepre comune (*Lepus europaeus*) viene considerata una sottospecie della specie *L. capensis* (Petter, 1959, 1961; Angermann, 1983), ed è presente in Europa (ad eccezione della penisola iberica), in Russia, in Inghilterra e nelle principali isole del Mediterraneo, tranne che in Sardegna e nelle Baleari. Si trova inoltre in Asia Minore, Siria, Palestina e Iraq. Per quanto concerne la sistematica delle lepri, i pareri degli zoologi sono discordi relativamente all'inquadramento delle specie europee e di quelle africane. Infatti, gli studi compiuti da vari autori, tra i quali Petter (1959), hanno portato alla conclusione, in base alla struttura degli incisivi superiori, che la Lepre del Capo (*Lepus capensis*) deve ritenersi una specie, di cui la lepre comune europea non è che una razza. In ogni caso, poiché manca una accurata revisione delle Lepri europee, si segue la sistematica di Ellerman e Morrison-Scott (1951), pur se con qualche esitazione, poiché a causa della scarsità di caratteri evidenti, i parametri di valutazione sono in prevalenza il colore del mantello e le dimensioni. Di recente, inoltre, altri autori (Corbet, 1986), hanno riaffermato l'appartenenza delle forme europee al genere *Lepus europaeus*. Attualmente in Italia sono presenti quattro specie diverse: la lepre alpina, *Lepus timidus varronis*, localizzata nell'area delle Alpi; la lepre comune europea, *Lepus europaeus*, nell'Italia peninsulare; la lepre italiana, *Lepus corsicanus*, in Italia centro-meridionale e in Sicilia e la lepre sarda, *Lepus capensis mediterraneus*. A causa della sua importanza per l'attività venatoria, è stata oggetto di svariati interventi d'introduzione in diversi paesi al di fuori del suo territorio d'origine, (Lever, 1985) tra cui l'Irlanda, la Svezia meridionale, la Siberia Meridionale, l'Estremo Oriente, il Cile, l'Argentina, l'Uruguay, la Bolivia meridionale, la Nuova Zelanda, l'Australia e alcune regioni del Nordamerica.

1.1 Morfologia

La lepre sarda si diversifica dalla lepre comune per le minori dimensioni (ha una lunghezza di 40-50 cm; Tab. 7) e per la colorazione del mantello, nonché per i denti più piccoli e per il cranio, anch'esso più piccolo, e per un maggior sviluppo delle bolle timpaniche. E' diffusa in tutto il territorio della Sardegna, dalla pianura, alla media collina e alla montagna. Di medie dimensioni, i Lagomorfi, possiedono una pelliccia abbondante e soffice, composta da borra e giara (pelo e sottopelo) e vibrisse molto ben sviluppate, soprattutto quelle dei mustacchi. Si caratterizzano per

l'intestino cieco molto sviluppato, incisivi particolarmente grandi, atti a rodere sostanze vegetali, numerose creste palatine e per l'assenza dei canini. Per quanto riguarda la struttura ossea, si nota la presenza della clavicola, l'indipendenza dello scafoide australe e lunato, la fusione distale del perone con la tibia.

	Lepus europaeus	Lepus capensis mediterraneus
Lunghezza testa-corpo	40-70 cm.	40-50 cm.
Lunghezza orecchio	8-14 cm.	9,7-11,4 cm.
Lunghezza piede posteriore	9,5-15 cm.	9,3-10,3 cm.
Lunghezza coda	8-10 cm.	8-10 cm.
Peso medio	1,5-6,5 kg.	1,5-2,5 kg.
Durata vita	12 anni	8 anni

TABELLA 7. Differenze morfologiche fra lepre comune e lepre sarda.

La lepre sarda si differenzia dalla lepre europea o lepre comune, perché appare più lenta nella corsa e si allontana meno dal covone; è inoltre più frugale nell'alimentazione e meno prolifica, è particolarmente adatta all'ambiente mediterraneo, caldo e povero di vegetazione. Possiede una caratteristica macchia bianca sulla fronte, di dimensioni comprese fra 1,5 cm e 2,5 cm, che si mantengono tali per tutta la vita dell'animale. Ha il dorso molto scuro, quasi nero, e una macchia color ruggine sulla nuca. È una specie di grande interesse naturalistico, tuttavia rimane quasi del tutto ignorata dalla bibliografia scientifica. Non esistono studi sul reale stato della popolazione in Sardegna, ma si hanno fondate convinzioni di una sua generale flessione numerica rispetto ad un recente passato, sebbene sia localmente presente con densità ancora discrete. Il livello di protezione la indica come una specie cacciabile (legge regionale n. 32/1978); in forte diminuzione soprattutto per la triste piaga degli incendi estivi, che hanno ridotto il suo habitat, per la caccia, ed il bracconaggio.

1.2 Habitat

La scelta dell'habitat, non è esclusivamente legata ai fabbisogni alimentari, ma, ad esigenze fisiologiche e comportamentali, che insieme alle prime assicurano la sopravvivenza della specie. Gli animali infatti necessitano di aree vitali notturne e diurne, le prime riferibili ad aree di riproduzione e di alimentazione, le seconde ad aree di rifugio e riposo. Il

rifugio della lepre è costituito da una concavità poco profonda del terreno, di circa 16 cm di larghezza, 34 cm di lunghezza e 12 cm di profondità, ben asciutta, che viene scavata usando le zampe anteriori, o adattando, modellandoli col corpo, avvallamenti naturali del terreno. I rifugi invernali risultano più profondi di quelli estivi, probabilmente per limitare l'effetto del vento sulla termoregolazione.

La dimensione dell'area vitale, che è comunque condizionata dalla qualità dell'habitat, dalla densità di popolazione e dalle stagioni, incrementa quando l'ambiente non è pienamente favorevole e l'attività di ricerca del cibo diviene intensa. Questo fenomeno si verifica anche in altre circostanze, come nel caso di elevate densità, per aumento della competizione, o di basse densità, per il mantenimento dell'attività riproduttiva.

1.3 Abitudini alimentari

Erbivoro in senso stretto, si nutre prevalentemente di parti verdi di una enorme varietà di essenze vegetali, alle quali si aggiungono semi e radici che strappa con particolare forza dal terreno, soprattutto d'estate, quando alle nostre latitudini ormai la vegetazione scarseggia. Nel complesso la lepre mostra una decisa preferenza per gli ambienti erbacei, tuttavia è in grado di utilizzare alternativamente e in maniera ottimale le altre tipologie ambientali disponibili, a seconda delle condizioni e delle esigenze legate al periodo stagionale, caratteristica che spiega la capacità di colonizzare e adattarsi con relativa facilità ai più svariati ambienti. Mediamente il quantitativo giornaliero di vegetali consumato da una lepre adulta, è corrispondente a circa 145 grammi di sostanza secca ma, esso può aumentare nel caso in cui l'alimento sia poco energetico e ricco di fibra grezza, nonché nelle femmine in lattazione. Le piante brucate dalle lepri, presentano le estremità recise con un taglio netto e obliquo. Il fabbisogno idrico è naturalmente influenzato dal tipo di alimentazione e dal periodo dell'anno

1.4 Aspetti riproduttivi

Alle nostre latitudini, la lepre, esprime una buona potenzialità riproduttiva: manifesta cicli sessuali per quasi tutto l'anno, ma soprattutto

tra febbraio e giugno. Come tutte le specie che vivono in condizioni naturali, l'animale è ben inserito nel ciclo meteo vegetativo. L'aumento delle ore di luce, riduce il livello circolatorio dell'ormone pineale, facilitando il passaggio dell'animale dalle condizioni di anaestro, a quelle riproduttive. La gravidanza dura 42 giorni e il numero di piccoli per parto varia da 1 a 3. Il peso della nidiata al parto, è in media di 70-150 grammi, in funzione anche del numero dei nati; dopo una settimana raddoppia e, allo svezzamento, intorno ai 20-21 giorni d'età (in cattività), può raggiungere i 600-700 grammi. La lepre non prepara un nido, ed i piccoli vengono partoriti in un luogo protetto e ben riparato; nascono già coperti di pelo, con gli occhi aperti e sono capaci di muoversi praticamente quasi subito dopo il parto. I piccoli, se spaventati, tendono ad immobilizzarsi, e ciò li rende estremamente vulnerabili nei confronti di eventuali predatori. E' in grado di riprodursi già nell'anno di nascita. Da studi svolti in cattività, sulle caratteristiche della biologia riproduttiva, è emerso che, la maturità sessuale, in entrambi i sessi, viene raggiunta a circa 5-6 mesi di età negli individui nati in primavera e a circa 11-13 mesi per quelli nati in autunno-inverno. Lo svezzamento viene effettuato al 24° giorno d'età. Si è riscontrata aggressività della madre verso i piccoli oltre il 27-28° giorno d'età e della femmina in gestazione nei confronti del maschio. Il peso degli adulti di entrambi i sessi, varia in media, da 1400 a 1800 grammi. Il periodo di riposo sessuale è relativamente breve (circa sessanta - settanta giorni), poiché è compreso, nelle nostre regioni, tra ottobre e dicembre; per gli altri otto mesi l'attività sessuale non conosce soste, sebbene risulti più intensa nella tarda primavera e all'inizio dell'estate. Il maschio nel corso della stagione riproduttiva è costantemente idoneo alla riproduzione, mentre la femmina lo diventa solo nel periodo del ciclo sessuale che corrisponde all'estro. Il ciclo ovarico non è regolare e la femmina rimane in estro fino a quando non si verifica l'accoppiamento, o nel caso questo non avvenga, per un arco di tempo piuttosto lungo. L'accoppiamento avviene prevalentemente al crepuscolo o nelle ore notturne e, come in tutte le specie, è preceduto da un corteggiamento che ha lo scopo di segnalare la specie di appartenenza, di ridurre l'aggressività delle femmine e di sincronizzare l'azione dei due gameti. Il corteggiamento consiste nel reciproco scambio di colpi con le zampe anteriori, corse e capriole. L'ovulazione viene provocata dall'accoppiamento e si verifica 12-15 ore dopo il coito, in seguito all'instaurarsi di un riflesso neuro-endocrino, che partendo dalla cervice, arriva all'ipotalamo, con la liberazione del GnRH e di conseguenza dell'LH ipofisario. Naturalmente, nei casi in cui l'accoppiamento avvenga con un maschio sterile, o per l'effetto di

60

sollecitazioni sessuali, nella femmina si può avviare il processo dell'ovulazione; in tali frangenti ovviamente la fecondazione non avviene. In questi casi si verifica la pseudogavidanza o falsa gravidanza, che si protrae generalmente per 12-18 giorni, durante i quali, la femmina, manifesta tutte le caratteristiche di una gravidanza in atto. In lepri tenute in cattività, la frequenza del fenomeno è del 20%; si constatano intervalli tra due nascite successive di 53 o 59 giorni.

1.5 Eco-Etologia

La maggior parte degli animali non vaga a caso per ambienti sconosciuti, ma limita le sue attività in zone che rispondono a requisiti particolari. Per territorio, si deve intendere ogni area difesa dall'ingresso di altri individui della stessa specie e viene ovviamente segnalata (marcata), con la deposizione di feromoni. Non tutta l'area occupata da un animale, o da un gruppo di animali, è difesa, ossia è territorio. Tra un territorio e l'altro si trova spesso un'area non difesa, ma comunemente frequentata da individui di territori vicini, che prende il nome di area familiare (home range). In particolari condizioni, fisiologiche o contingenti, gli animali escono dalla loro area familiare e si avventurano in aree che sono loro totalmente ignote. Prende il nome di area di esplorazione, l'area non familiare oggetto di tali movimenti sporadici. In generale l'aggressività dell'individuo decresce passando dal territorio all'area familiare e da questa a quella, ignota di esplorazione. Questa variazione dell'aggressività, e altri fattori relativi al territorialismo, hanno una notevole influenza sui fenomeni di comportamento e selezione sessuale. Solitamente gli individui devono interagire agonisticamente, sia per la conquista che per la difesa del territorio occupato. In generale si osserva che i territori di ottima qualità sono quelli che vengono occupati per primi; seguono quelli meno adatti. Da un punto di vista genetico, è importante la funzione che l'area familiare e l'area di esplorazione svolgono, per determinare scambi riproduttivi, tra soggetti di territori diversi. Infatti, l'aggressività dei singoli individui, va diminuendo in progressione, quando si passa dal territorio all'area familiare e da questa all'area di esplorazione. L'isolamento riproduttivo, viene quindi ridotto attraverso le possibilità di incontri in zone "neutrali". In tal modo può avvenire lo scambio di geni in seguito all'accoppiamento di individui appartenenti a territori diversi. Infatti l'effetto principale delle abitudini territoriali, è di offrire ai vari individui, diverse possibilità di riprodursi. Un fattore molto importante del territorialismo, è quello di proporzionare la

quota della popolazione che si riproduce, alle reali risorse dell'habitat. Aumenta inoltre la protezione dai predatori, infatti, vivendo gli animali territoriali, in un ambiente da loro ben conosciuto in ogni caratteristica, sono in grado di evitare meglio i pericoli. La lepre contrariamente al coniglio non è una specie strettamente territoriale; di solito l'animale dispone di svariati rifugi all'interno del suo territorio e sceglie di volta in volta il più idoneo, a seconda delle condizioni meteorologiche e soprattutto del vento. Possiede ottimo udito ed ottimo olfatto. La vista può considerarsi buona, soprattutto per quanto riguarda il campo visivo. Come per tutte le specie preda si ha necessità di un forte sviluppo delle ossa frontali, che sposta decisamente gli occhi in posizione laterale, con una visione monoculare. Scarso invece risulta il livello di definizione dell'immagine visiva, specie durante le ore più luminose del giorno, come conseguenza della forte apertura della pupilla. Un difetto che si tramuta in pregio durante le ore di buio, favorendo una buona visione durante l'oscurità. La migliore strategia di difesa dal predatore è rappresentata dal mimetismo. All'interno di uno dei rifugi, la lepre si appiattisce al suolo confidando sul suo mantello mimetico; in questa posizione mette le zampe posteriori sotto il corpo, quelle anteriori vengono distese per posarvi sopra la testa e tiene le lunghe orecchie e il pelo, perfettamente aderenti al corpo. Se scovata, scappa con un grande balzo e, correndo a scatti e a salti (lungi fino a 2,5 m e alti fino a più di 1,5 m), può raggiungere la velocità di 60 - 70 Km/h. Durante la fuga, per confondere l'inseguitore, torna più volte sullo stesso percorso sovrapponendo così le tracce odorose e compie balzi laterali per interromperne la continuità e utilizza ogni riparo naturale per nascondersi alla vista del predatore; quando arriva al confine del suo territorio, se non è inseguita molto da vicino, tende a tornare indietro e, se l'udito e l'olfatto la avvertono dello scampato pericolo, rientra al covo di partenza. Per quanto la fuga possa essere velocissima, la lepre non compie grandi distanze e lo spostamento può essere circoscritto all'interno di un cerchio di un chilometro di raggio. Hanno una distanza minima di fuga, particolarmente ridotta, oltrepassata la quale si danno alla fuga. Finché questa distanza non viene superata, la lepre preferisce rimanere completamente immobile. Caratteristico il suo atteggiamento, a riprova del fatto che i leprotti confidando sul mimetismo non fuggono, ma compiono dei brevi salti contro l'intruso, ed emettono una sorta di brontolio. La distanza di fuga non deve essere confusa con la distanza individuale (distanza sociale), ossia la distanza minima che un animale interpone abitualmente fra se e gli altri membri della stessa specie. I leporini, espellono dall'ano due tipi di prodotti derivanti dalla digestione delle

62

essenze vegetali: uno appare microscopicamente secco e di forma tondeggiate; l'altro è umido, molle, avvolto da muco. Solitamente viene emesso di notte e immediatamente reinserito. Questo materiale viene chiamato ciecotrofo e viene emesso distante dall'ingestione degli alimenti, sicuramente quando l'animale non è sottoposto a condizioni di stress, per esempio quando riposa tranquillo e indisturbato. La ciecotrofia sembrerebbe di vitale importanza nei periodi di prolungato digiuno poiché con tale pratica vengono recuperate acqua, vitamine C e B, proteine con elevato valore biologico, ed i prodotti della degradazione della cellulosa ad opera dei batteri presenti nell'intestino cieco. Numerosi fattori ambientali influenzano la dinamica delle popolazioni selvatiche, agendo a seconda dei casi sulla natalità, sulla mortalità, o su ambedue contemporaneamente. Il tasso medio annuale di natalità della lepre sarda, è stimato in 5-6 leprotti per femmina, con variazioni dovute principalmente alla lunghezza del periodo riproduttivo e alla percentuale di sterilità. E' tuttavia nei fattori di mortalità che vanno individuate le cause principali, in grado di condizionare l'incremento utile annuo. La mortalità risulta variabile su base annuale, soprattutto nei giovani, ed è in grado di influenzare in modo rilevante il successo riproduttivo delle popolazioni. Le condizioni climatiche sembrano rivestire un ruolo rilevante nella dinamica delle popolazioni di lepre. Ad esempio sono state riscontrate correlazioni positive tra la densità autunnale delle lepri e il rapporto precipitazioni di giugno/precipitazioni di aprile. Le condizioni climatiche possono inoltre svolgere un ruolo rilevante per quanto concerne l'incidenza di malattie infettive o parassitarie, un fattore di mortalità che può assumere in talune circostanze un'importanza non trascurabile. L'importanza della predazione quale fattore di mortalità e la sua influenza sulla dinamica delle popolazioni di lepre risulta spesso, come per altre specie, di non facile interpretazione. Numerose sono le specie, di mammiferi e di uccelli che esercitano una predazione più o meno regolare sulla lepre, tuttavia, in alcune condizioni, mortalità elevate possono essere causate da gatti e cani randagi, o comunque vaganti. Solo la volpe ricopre un ruolo significativo nella predazione; in Gran Bretagna ad esempio si è potuto constatare che la lepre rappresenta una delle principali risorse alimentari per la volpe e che la predazione da essa esercitata risulta importante soprattutto sui giovani, in misura tale da condizionare il tasso di sopravvivenza delle lepri.

2 SCOPO DEL LAVORO

La presenza della lepre in un territorio è indice di una equilibrata situazione ambientale; la lepre, infatti, è una specie piuttosto esigente dal punto di vista ecologico-ambientale, che risente notevolmente di numerosi fattori perturbativi quali industrializzazione delle zone agricole, utilizzo massiccio di fitofarmaci, antropizzazione, traffico automobilistico, eccessiva pressione venatoria, diffusione di zoonosi, abbondanza di predatori come cani randagi e volpi. La lepre rappresenta una delle principali specie oggetto di caccia in Sardegna. Purtroppo la specie, nell'ultimo secolo, è andata incontro ad una progressiva diminuzione delle popolazioni naturali, ed è stata sempre più condizionata dalle pratiche di introduzione, reintroduzione, ripopolamento, che ne hanno modificato drasticamente la distribuzione sul territorio e la consistenza delle popolazioni. Il controllo di una specie, esula in generale dalla normale attività di gestione di un territorio e deve essere considerato come un intervento a carattere straordinario, da effettuarsi solo quando se ne ravvisi la necessità in maniera limitata nel tempo, per far fronte ad una problematica impellente. Si deve inoltre basare sulla corretta conoscenza non solo della consistenza, distribuzione e dinamica della specie che può risultare alquanto complessa in considerazione di forti variazioni da annata ad annata. E' indispensabile procedere altresì ad una valutazione delle caratteristiche genetiche che possono contraddistinguere la popolazioni di lepri presenti nella nostra regione, alla luce di una scarsissima conoscenza disponibile e alle manipolazioni che si sono verificate in questi ultimi decenni in materia di immissioni faunistiche. Pertanto, in questo lavoro, si è cercato di fornire un primo contributo alla conoscenza delle caratteristiche genetiche della popolazioni di lepri, che vivono allo stato naturale in diversi territori della Sardegna, tramite l'utilizzo di marcatori molecolari. Il conseguimento di tali dati potrà permettere di stabilire il grado di differenziazione fra le varie aree geografiche e di verificare se esistono dei pericoli per eventuali fenomeni di endogamia. L'acquisizione di questi dati potrebbe costituire la base per una futura e più corretta gestione della lepre nella nostra regione.

3 MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 61 campioni derivanti sia da lepri prelevate durante la stagione venatoria che catturate durante uno studio eto-parassitologico condotto nel Parco Nazionale dell'Asinara (Fig. 13).



FIGURA 13. Localizzazione dei siti di provenienza dei campioni di lepre sarda utilizzati in questo lavoro

I campioni provengono da 5 diverse aree della Sardegna selezionate in modo da avere una distribuzione territoriale che coprisse la maggior parte del territorio regionale:

- Villanova Monteleone (13 campioni),
- Asinara (14 campioni),
- Pozzomaggiore (9 campioni),
- Villamassargia (12 campioni),
- Siniscola (13 campioni)

Dai soggetti derivanti da prelievo venatorio è stato prelevato il padiglione auricolare che è stato immediatamente congelato a – 20°C.

Dalle lepri catturate per lo studio eto-parassitario, nel Parco Nazionale dell'Asinara, sono stati prelevati dei campioni di sangue dalla vena auricolare esterna, mediante utilizzo di una siringa da insulina contenente EDTA come anticoagulante.

3.1 Analisi microsatelliti

I campioni sono stati analizzati tramite lo studio di 7 microsatelliti già caratterizzati su altre specie di lepri, come descritto nella tabella 8.

Marker	Fluoro cromo	Sequenza Primer	TA °C	Origine
MNS5	Fam	F:GGCCTCATATCACGTAACATCC R:GCCATCTTGCTTCCCTGAGT	54	Orytolagus cuniculus
Sol30	Hex	F:GGGGAGTAATACAGCAGATG R:TGCAGCACTTCATAGTCTCAG	53	Lepus europaeus
Sol28	Fam	F:TGGGGAATGAACCAAGTGAATG R:GGGGATATCTTCAATTCAGAATG	55	Lepus europaeus
Lsa2	Hex	F:GGTACTCTATTAGGGAACCC R:GCTAGTTGCCATTAGCTCCC	52	Lepus saxatilis
Lsa4	Fam	F:CTGAGTGAGTATTTTCAGGG R:GTGCCATATTCATTAATGGAA	50	Lepus saxatilis
Lsa6	Fam	F:CCTAAGATGAAATGGATAAGTTGAG R:CTCTTCTGTTTTGTGCAGCCACTG	51	Lepus saxatilis
Lsa8	Hex	F:CACTCAAGTCAGTGTTTCATGC R:GACTGAAATTGATGTGCTACCC	54	Lepus saxatilis

TABELLA 8. Generalità sui markers microsatelliti utilizzati.

I microsatelliti sono stati selezionati da databases pubblici presenti su internet quali l' NCBI genome database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Gli

oligonucleotidi forward di ogni coppia di primers utilizzati nella reazione di polimerizzazione a catena (PCR) dei marcatori, sono stati marcati con dei fluorocromi (6-FAM e HEX) all'estremità 5', in modo che potessero essere riconosciuti da un analizzatore di fluorescenza di un sequenziatore automatico. L'intensità della fluorescenza veniva trasformata in picchi di un elettroferogramma. Tutti i primers utilizzati nelle reazioni di PCR sono stati prodotti dalla Invitrogen Ltd., (Paisley, Scotland). La reazione di amplificazione è stata eseguita come già descritto precedentemente.

Il profilo termico è stato il seguente:

DENATURAZIONE INIZIALE	94°C	2'	} 30cicli
DENATURAZIONE	95°C	30''	
ANNEALING	X°C	1'	
ESTENSIONE	72°C	1'30''	
ESTENSIONE FINALE	72°C	5'	

X= temperatura specifica per ogni primers

4 RISULTATI

Tutte le 7 coppie di primers selezionate hanno amplificato prodotti specifici nel DNA di lepre sarda. Tra i 7 prodotti quello corrispondente al microsatellite Lsa6 è risultato monomorfico quindi non informativo e perciò non è stato utilizzato nelle successive analisi statistiche.

I rimanenti sei microsatelliti sono risultati polimorfici in tutti i cinque gruppi analizzati, con un numero di alleli che va da 4 a 15 (vedi Tabella 9). La media degli alleli nel totale dei campioni analizzati è di $7,83 \pm 4,26$ per locus (media \pm DS) e non ci sono differenze rilevanti tra i cinque gruppi analizzati ($p=0.55$) con medie di $4,167 \pm 1,941$ per la popolazione dell'Asinara, $3,667 \pm 1,366$ per Pozzomaggiore, $5,333 \pm 1,633$ per Siniscola, $4,50 \pm 2,258$ per Villamassargia e $4,833 \pm 1,472$ per Villanova (Fig. 14). Tutti i marcatori polimorfici presentano alleli privati tipici di un gruppo, vale a dire completamente assenti nelle altre 4 popolazioni studiate (ad esempio l'allele 6 del marcatore Sol30 è abbondante nel gruppo dell'Asinara, ma assente negli altri 4). Tali alleli tipici sono distribuiti in tutte le popolazioni, eccetto quella originaria di Pozzomaggiore.

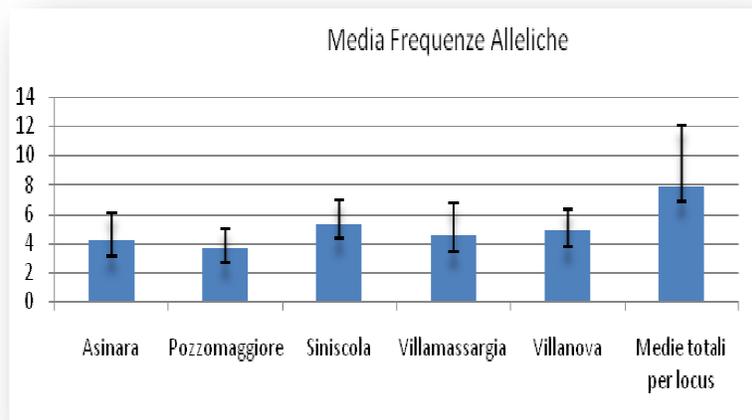


FIGURA 14. Numero medio di alleli per popolazione. I valori sono espressi come media \pm DS

Di seguito sono riportati i grafici relativi alle frequenze alleliche dei 6 loci nelle 5 popolazioni esaminate, in ascissa sono indicate le diverse popolazioni mentre nelle ordinate è indicata la frequenza allelica.

		Asinara n=14	Pozzom n=9	Siniscola n=13	Villamass n=12	Villanova n=13
MNS5	1	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
	2	0,00	0,22	0,17	0,21	0,13
	3	0,00	0,00	0,13	0,08	0,25
	4	0,25	0,11	0,21	0,08	0,13
	5	0,00	0,28	0,13	0,42	0,06
	6	0,75	0,39	0,25	0,21	0,44
SOL30	1	0,20	0,06	0,00	0,15	0,00
	2	0,25	0,06	0,08	0,00	0,10
	3	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00
	4	0,00	0,50	0,19	0,25	0,10
	5	0,00	0,00	0,23	0,15	0,00
	6	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00
	7	0,10	0,19	0,19	0,00	0,00
	8	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
	9	0,05	0,00	0,00	0,00	0,05
	10	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	11	0,00	0,19	0,08	0,20	0,25
	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15
	13	0,00	0,00	0,04	0,05	0,35
	14	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	15	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
LSA2	1	0,12	0,44	0,08	0,00	0,38
	2	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00
	3	0,88	0,56	0,69	0,88	0,54
	4	0,00	0,00	0,08	0,13	0,00
	5	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08
SOL28	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
	2	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,21	0,28	0,08	0,25	0,50
	4	0,11	0,22	0,58	0,00	0,20
	5	0,11	0,33	0,21	0,08	0,05
	6	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
	7	0,29	0,06	0,00	0,08	0,00
	8	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
	9	0,00	0,11	0,04	0,08	0,05
	10	0,18	0,00	0,00	0,46	0,10
	11	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00
LSA4	1	0,05	0,39	0,17	0,50	0,36
	2	0,18	0,00	0,33	0,00	0,05
	3	0,09	0,28	0,13	0,00	0,32
	4	0,05	0,28	0,17	0,30	0,14
	5	0,64	0,06	0,21	0,20	0,09
	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
LSA8	1	0,14	0,00	0,00	0,00	0,17
	2	0,25	0,89	0,54	0,54	0,58
	3	0,07	0,11	0,33	0,33	0,25
	4	0,54	0,00	0,13	0,13	0,00

TABELLA 9 Frequenze alleliche osservate per ciascun microsatelliti in ciascuna delle 5

popolazioni di lepri analizzate

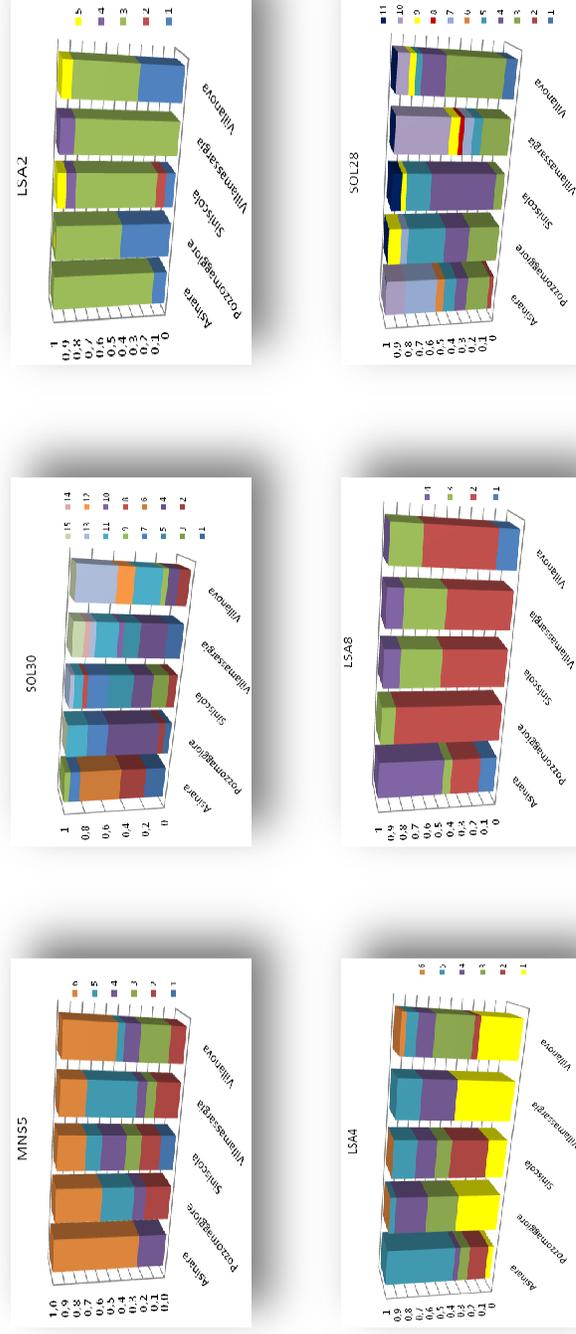


FIGURA 15. Frequenze alleliche dei loci analizzati.

Il calcolo dell'eterozigosità osservata, ossia la probabilità che un individuo preso a caso da una popolazione sia eterozigote per due qualsiasi alleli di un locus, presenta un'elevata variabilità tra le popolazioni (Fig. 16). Ad esempio il marcatore MNS5 ha un'eterozigosità pari a 0,166 nella popolazione dell'Asinara, 0,916 in quella di Villamassargia e valori intermedi nelle altre tre popolazioni.

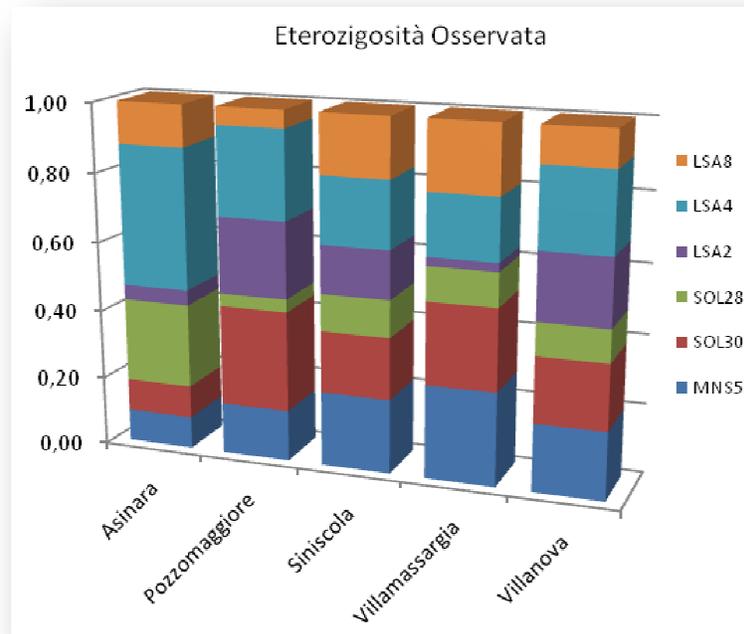


FIGURA 16 . Eterozigosità osservata nei microsatelliti nelle 5 popolazioni di Lepre analizzate.

Il test di deviazione dalla legge di Hardy-Weimberg (tabella10) ha messo in evidenza che solo 2 loci (Sol30, Sol 28) deviano dall'equilibrio in solo due gruppi di lepri, Pozzomaggiore e Villamassargia. ($P < 0,0016$ dopo correzione con Bonferroni)

locus	Asinara			Pozzomaggiore			Siniscola		
	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
MNS5	0,1666	0,3913	0,0898	0,4444	0,7516	0,0052	0,8333	0,8550	0,6554
SOL30	0,4000	0,7631	0,0599	0,8750	0,7166	0,2045	0,6923	0,8676	0,6102
SOL28	0,4285	0,8412	0,0031	0,1111	0,7908	0,0000	0,4166	0,6268	0,0634
LSA2	0,0769	0,2123	0,1201	0,6666	0,5228	0,5388	0,5384	0,5169	0,7843
LSA4	0,7272	0,5757	1,0000	0,7777	0,7320	0,0150	0,7500	0,8079	0,3320
LSA8	0,2142	0,6481	0,0009	0,2222	0,2091	1,0000	0,6666	0,6050	1,0000
	Villamassargia			Villanova			Totale		
locus	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
MNS5	0,9166	0,7572	0,1311	0,6250	0,7583	0,6219	0,604	0,757	0,020
SOL30	0,8000	0,8789	0,0001	0,6000	0,8105	0,1528	0,667	0,901	0,000
SOL28	0,3333	0,7355	0,0000	0,3000	0,7210	0,0018	0,333	0,834	0,000
LSA2	0,0833	0,2282	0,1307	0,6153	0,5784	0,6165	0,383	0,450	0,209
LSA4	0,6000	0,6526	0,1838	0,7272	0,7705	0,6860	0,717	0,794	0,035
LSA8	0,6666	0,6050	0,0977	0,3333	0,5942	0,0266	0,424	0,635	0,000

TABELLA 10. Frequenze alleliche osservate e attese secondo la legge di Hardy Weimberg. In rosso le deviazioni significative dalla legge. $P < 0,0016$ dopo correzione con Bonferroni

La diversità genetica (H) è un indice della variabilità genetica di una popolazione, e consiste nella probabilità che 2 alleli di un determinato locus, scelti a caso, siano diversi nel campione. Le popolazioni qui studiate presentano una buona variabilità: calcolata singolarmente per ogni marcatore, varia tra 0,21 e 0,84 all'Asinara, tra 0,20 e 0,79 a Pozzomaggiore, tra 0,51 a 0,86 a Siniscola, tra 0,22 e 0,87 a Villamassargia e tra 0,57 e 0,81 a Villanova (Fig. 17).

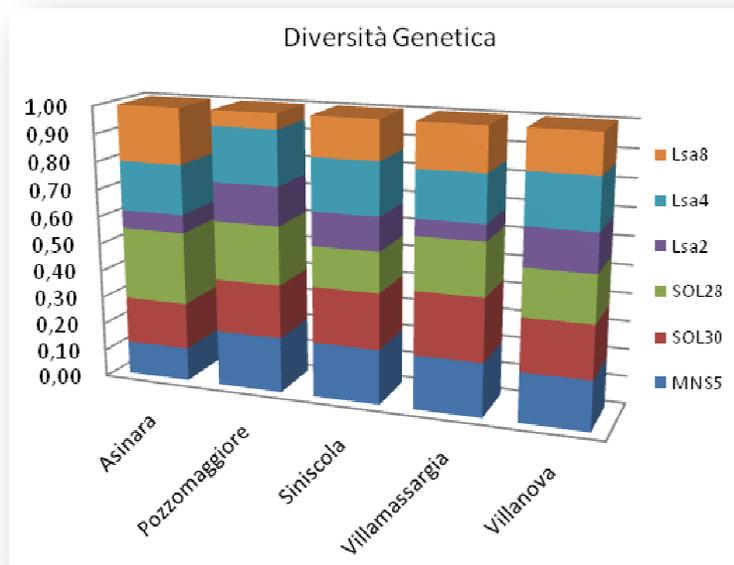


FIGURA 17. Diversità genetica nelle 5 popolazioni di Lepre analizzate, calcolata come probabilità che due alleli scelti a caso in ciascuna popolazione siano diversi.

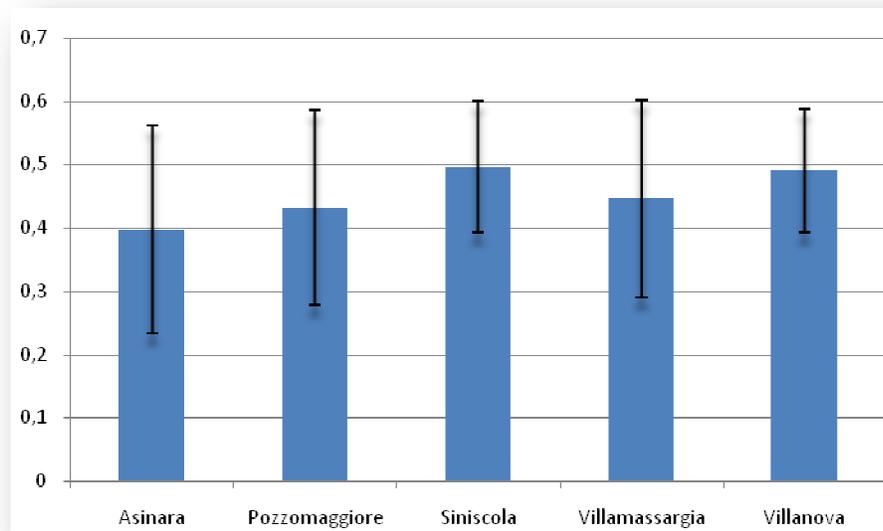


FIGURA 18. Diversità genetica per tutti i locus con valori espressi con media \pm DS

Il test per la differenziazione genetica “Fst”, utilizzato per stimare la distanza genetica tra due popolazioni, è stato calcolato per ogni singolo marcatore e per tutti i microsatelliti insieme, confrontando a due a due i 5 gruppi studiati (Tabella 11). I risultati mostrano delle popolazioni geneticamente distinte: considerando il calcolo effettuato su tutti i marcatori insieme, tutte le popolazioni risultano significativamente distanti ($p < 0,05$), a parte le popolazioni di Pozzomaggiore e Villanova e quella di Siniscola e Villanova.

	Asinara	Pozzomaggiore	Siniscola	Villamassargia
Pozzomaggiore	0,34208 (0,0000)			
Siniscola	0,12753 (0,0058)	0,13470 (0,0029)		
Villamassargia	0,15417 (0,0166)	0,21149 (0,0009)	-0,01354 (0,5752)	
Villanova	0,20035 (0,0029)	0,03891 (0,1748)	0,04225 (0,0859)	0,11462 (0, 01367)

Tabella 11. Matrice di distanza genetica calcolata mediante il test Fst tra le 5 popolazioni di lepri analizzate. Gli asterischi rappresentano differenze statisticamente significative tra popolazioni. I valori negativi di Fst sono equivalenti allo zero

I risultati del Bottleneck test sono mostrati in tabella 12. L’analisi è stata eseguita utilizzando il modello di evoluzione TPM con 1000 permutazioni per generare i valori di eterozigosità teorica in base al numero di alleli k . Sono indicati i valori di P relativi ad un eccesso (drastica diminuzione della popolazione) o una carenza di eterozigoti (espansione rapida della popolazione).

È possibile osservare che solo le popolazioni di Pozzomaggiore e Villamassargia presentano un eccesso di eterozigoti andando a suggerire un evento che ha portato ad una riduzione drastica del numero di individui.

	Asinara	Pozzomaggiore	Siniscola	Villamassargia	Villanova
P(H _b)	0.78125	0.97656	0.78125	0.97656	0.96094
P(H _e)	0.28125	0.03906*	0.28125	0.03906*	0.05469
P(H)	0.5625	0.07813	0.56250	0.07813	0.10938

Tabella 12. Bottleneck test. Per ogni popolazione sono indicati i valori di probabilità per una carenza ed eccesso di eterozigoti. Il terzo valore si riferisce alle due probabilità combinate

Nel grafico AFC riportato in Figura 19, ciascun individuo è rappresentato da un quadretto di colore diverso a seconda della popolazione geografica di

appartenenza ed è collocato entro lo spazio tridimensionale in base alla distanza genetica, testata dal software, rispetto agli altri individui.

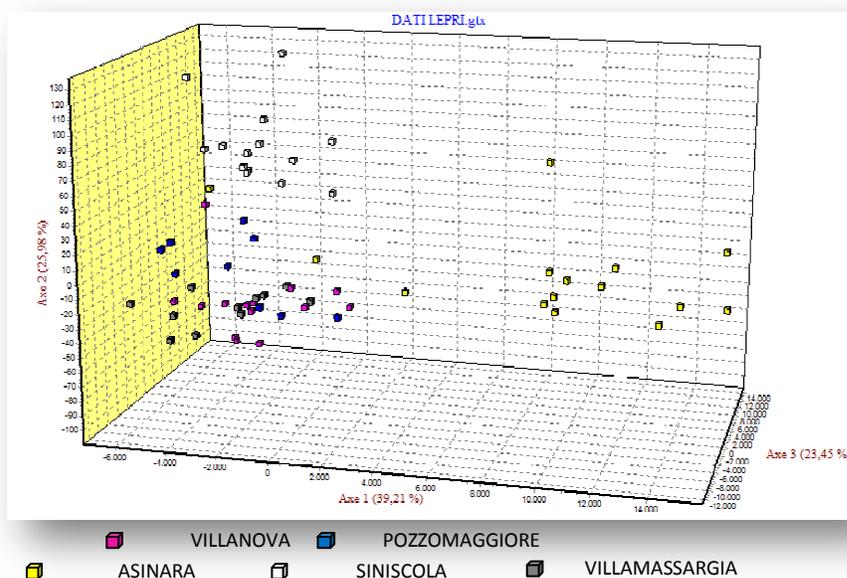


FIGURA 19 . Grafico dell'AFC che mostra la differenziazione genetica tra le diverse popolazioni

È possibile osservare come la popolazione dell'Asinara tenda a clusterizzare in una porzione differenti del grafico , non unendosi alle altre 4 popolazioni (Pozzomaggiore, Siniscola, Villamassargia e Villanova) che invece tendono a formare un cluster unico.

5 DISCUSSIONE

Studi sulla variabilità genetica di popolazioni di varie specie di lepre europea sono stati condotti negli ultimi anni con l'analisi di polimorfismi proteici o di acidi nucleici. L'analisi dei polimorfismi degli acidi nucleici sono quelli più utilizzate, in relazione al fatto che sono risultate più informative rispetto ai polimorfismi proteici, la cui analisi si è rivelata poco risolutiva per mettere in evidenza differenze genetiche anche tra specie strettamente correlate (Suchentrunk e coll., 2003). Tra i marcatori utilizzati per effettuare studi genetici sulla struttura di popolazione, i microsatelliti sono quelli maggiormente informativi, in quanto hanno tutte le caratteristiche per essere considerati marcatori ottimali. Sono generalmente molto informativi in quanto hanno un'elevata variabilità. Solo recentemente sono stati utilizzati nello studio di popolazioni di lepre al posto dei polimorfismi di amplificazione random (RAPD) che, anche se possono essere utilizzati per evidenziare numerosi geni anonimi simultaneamente e quindi altamente informativi, sono molto meno precisi (Sunnucks, 2000).

I risultati di questo studio indicano che le popolazioni di lepri analizzate hanno una diversità genetica non elevata, come indicato dal numero di alleli per locus (Fig. 15) e dalla eterozigosità attesa media per tutti i locus (tabella 10). Studi sulla genetica di popolazione di lepri zampe bianche (*Lepus americanus*) effettuati su popolazioni canadesi (Burton e coll., 2002) mediante l'utilizzo di microsatelliti, hanno evidenziato una media di alleli per locus notevolmente più elevata rispetto alle popolazioni studiate in questo lavoro, con una media di 13,4 alleli per locus e un'eterozigosità attesa di 0,67 rispetto ai 7,8 alleli per locus e 0,65 nelle popolazioni di *Lepus capensis mediterraneus*. Livelli più elevati sono stati evidenziati anche su altre specie di piccoli mammiferi quali la crocidura rossiccia (*Crocidura russula*, Favre e coll., 1997; Balloux e coll., 1998), il coniglio europeo (*Oryctolagus cuniculus*, Surridge e coll., 1999), l'arvicola rossastra (*Clethrionomys glareolus*, Gerlach e Musolf, 2000), il lemming dal collare (*Dicrostonyx groenlandicus*), anche se l'effettiva portata di questi dati è discutibile in quanto loci con piccoli polimorfismi spesso non sono riportati. (Goossens e coll, 2001)

Il numero medio di alleli in un gruppo di loci è considerato un indicatore ragionevole della variazione genetica all'interno di una popolazione (Nei et al., 1987) e in questo caso, il confronto con altre popolazioni di roditori, anche se di specie diversa, è un indicatore della bassa variabilità genetica presente nelle popolazioni di lepre in Sardegna. Questo dato è omogeneo per tutte le 5 popolazioni analizzate in cui il numero medio di alleli di tutti i

marcatori molecolari non è statisticamente diverso, con medie varianti da 3,67 a 5,33.

Le frequenze alleliche nelle popolazioni analizzate non sono omogenee e si evidenzia in tutte, tranne che in quella di Pozzomaggiore, la presenza di alleli privati, caratteristici di ciascuna popolazione analizzata, suggerendo una significativa struttura genetica e generalmente mostra una diminuzione di similarità con l'aumento della distanza geografica. Anche l'eterozigosità osservata, cioè la probabilità che un individuo preso a caso in una popolazione sia eterozigote in un locus genico, e la diversità genica, cioè la probabilità che due alleli di un determinato locus siano diversi, presenta un'elevata variabilità tra le 5 popolazioni analizzate evidenziano come in ciascuna popolazione ci sia stata una modifica della distribuzione genica, dovuta probabilmente a fenomeni di deriva genica e inbreeding.

Le uniche popolazioni che deviano dalla legge di Hardy Weimber sono quelle di Pozzomaggiore e di Villamassargia. Le deviazioni dai valori attesi dalla legge di Hardy Weinberg possono avere molteplici cause. Un eccesso di eterozigoti è osservato per esempio quando si hanno fenomeni di selezione overdominante o di outbreeding, cioè incremento del numero degli accoppiamenti tra individui non vicini geneticamente. Al contrario un eccesso di omozigoti può essere dovuto a varie cause, tra le quali la selezione di un locus genico, la presenza di alleli nulli, la presenza di substrutture nella popolazione o l'inbreeding. La selezione a carico di un locus genico porta un vantaggio all'allele dominante, che incrementa le sue frequenze con conseguente diminuzione di quelle del recessivo e, a livello di genoma un incremento delle frequenze degli omozigoti a scapito di quelle degli eterozigoti.

Un'altra causa di deviazione dalla legge di Hardy Weimber può essere la presenza di alleli nulli. Ad alleli nulli può essere attribuito il dato di alcuni marcatori, come per esempio il Sol 28 nella popolazione di Pozzomaggiore che si presenta con 3 alleli su 5 sempre in omozigosi e 6 individui omozigoti su 7.

In una popolazione grande che contiene sub-popolazioni si registra un incremento degli eterozigoti rispetto alla media delle frequenze delle subpopolazioni e di conseguenza in ciascuna subpopolazione si registra un incremento delle frequenze degli omozigoti. Questo fenomeno viene chiamato effetto Wahlund e si basa sull'analisi delle frequenze geniche osservate, rispetto a quelle attese. Dai risultati si può notare che il totale delle popolazioni di lepri presenta un decremento dell'eterozigosità rispetto alle popolazioni che la compongono. Quindi si può ipotizzare che le popolazioni prese in esame possono essere considerate subpopolazioni in

78

cui il flusso genico è ridotto o nullo, dovuto probabilmente a barriere di vario tipo.

La presenza di barriere alla dispersione degli individui, in associazione con una diminuzione del numero degli stessi è causa del fenomeno dell'inbreeding o imparentamento, cioè l'incremento delle percentuali di accoppiamento tra consanguinei. Questo fenomeno è causa della cosiddetta depressione da inbreeding, cioè della perdita di eterozigotità dovuta all'incremento della probabilità che due alleli di un locus siano identici perché derivanti da progenitori comuni e quindi trasmessi in omozigosi.

La misura della distanza genetica tra le 5 popolazioni mediante il test F_{st} ha evidenziato come la differenziazione genetica sia elevata tra tutte le popolazioni tranne che tra quella di Pozzomaggiore e Villanova e quella di Siniscola e Villanova. Gli elevati livelli di differenziazione suggeriscono un basso flusso genico tra i gruppi, con scarsa migrazione di individui tra i diversi territori mentre tra il gruppo di Villanova e quello di Pozzomaggiore e Villanova e Siniscola la migrazione sembrerebbe maggiormente elevata. Questi risultati si trovano in accordo con quanto descritto da Burton e coll. (2002) nel loro studio sulle lepri americane provenienti da diverse zone del Canada. In questo lavoro è stato riscontrato un basso livello di differenziazione tra le popolazioni studiate, che suggerisce la presenza di un flusso genico nel territorio. Sono state prese in considerazione regioni separate dai 100 ai 700 km che però sembrano collegate "geneticamente" fra loro da un sostanziale numero di effettivi migranti. Modelli teorici computerizzati hanno mostrato inoltre che la migrazione di pochi esemplari è sufficiente per prevenire una forte differenziazione tra popolazioni (Wright 1978; Slatkin 1985).

Quindi è ragionevole pensare che tra le popolazioni di Pozzomaggiore e Villanova, che distano in linea d'aria circa 25-30 Km ci sia stato un flusso genico che ha contribuito a livellare geneticamente queste popolazioni. Possiamo affermare che nonostante la distanza tra Siniscola e Villanova sia maggiore (160 km) ci sia stato, anche in questo caso, un flusso genico probabilmente dato da individui migranti. Caso limite è quello della popolazione dell'isola dell'Asinara che dal punto di vista genetico è quella più distante dalle altre popolazioni (tabella 11). L'isolamento causato dalla barriera marina ha portato al fatto che in questa popolazione ci sia un elevato inbreeding, come suggerito dalla carenza di eterozigoti. Questo dato ci è confermato anche dai grafici dell'analisi fattoriale per corrispondenza, dove si può notare la netta clusterizzazione della popolazione dell'Asinara mentre si può notare come le altre 4 popolazioni

tentando a raggruparsi.

Burton e coll. (2002) asseriscono che piccole migrazioni successive abbiano contribuito a livellare la struttura genetica di popolazioni tra loro distanti. Il loro studio è stato eseguito nelle foreste boreali del nord america, dove le barriere alla migrazione sono minime, mentre nelle condizioni da noi sperimentate si ha un notevole incremento dell'isolamento dovuto alla presenza di strade, antropizzazione delle campagne, ecc che diminuisce la possibilità di flusso genico.

Dal bottleneck test si può notare come le uniche popolazioni che presentano un eccesso di eterozigoti statisticamente significativo siano la popolazione di Pozzomaggiore e quella di Villamassargia, a dimostrazione del fatto che le popolazioni hanno subito una riduzione demografica che ha portato ad una perdita consistente, a livello genico, di alleli. Da lavori effettuati sulla lepre zampa bianca (*Lepus Americanus*), è stata descritta una ciclica fluttuazione della densità di popolazione (Keith 1990, Hodge 2000). Si può ipotizzare che periodi di bassa densità, nelle popolazioni studiate in questo lavoro, siano stati così marcati da essere veri e propri bottleneck. (Burton 2002).

In conclusione i nostri dati mostrano come la variabilità genetica della popolazione di *Lepus capensis mediterraneus* in Sardegna non sia molto elevata, evidenziando problemi di consanguineità e di inbreeding. La variabilità genetica viene continuamente generata per effetto delle mutazione e della ricombinazione, mentre la deriva genetica e la selezione contribuiscono al suo declino.

In popolazioni numerose e stabili per generazioni queste due forze si equilibrano mentre nelle popolazioni poco numerose l'effetto della deriva genica è superiore a quello causato dalle mutazioni con conseguente perdita degli alleli più rari. Anche se si è lontani dal pericolo di estinzione sarebbero auspicabili interventi di prevenzione, con la cattura e lo spostamento di individui appartenenti a diverse popolazioni. La conoscenza della struttura genetica delle varie popolazioni permetterebbe in questo caso di poter effettuare delle reintroduzioni mirate, con scambi di individui appartenenti a popolazioni in cui sono presenti alleli assenti nell'altra.

MARANGONE DAL CIUFFO



1 INTRODUZIONE

Regno	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Classe	Aves
Sottoclasse	Neornithes
Ordine	Pelecaniformes
Famiglia	Phalacrocoracidae
Genere	Phalacrocorax
Specie	P. aristotelis
Sottospecie	P. a. desmarestii

I Phalacrocoracidi rappresentano la Famiglia più numerosa dei Pelecaniformi con il maggior numero di specie. La tassonomia di alcune specie dell'emisfero australe e in particolare di quelle che vivono in Nuova Zelanda e nelle isole subantartiche, è molto controversa per cui questa famiglia comprende 26-40 specie, distribuite in tutti i Continenti ad esclusione dell'Antartide (Gariboldi & Bailo, 1993). Il Phalacrocorax aristotelis è una specie politipica a corologia mediterraneo-atlantica. Nel Paleartico occidentale sono presenti tre sottospecie: *aristotelis* (Linnaeus, 1761) presente in Europa settentrionale e occidentale; *riggembachi* (Hartert, 1923), presente in Africa nord-occidentale; *desmarestii* (Payraudeau, 1826), con colonie nel Mediterraneo e nel Mar nero (Cramp & Simmons, 1977).

1.1 Morfologia

Lunghezza totale del corpo varia da 65 a 80 cm e presenta un'apertura alare di 90 – 105 cm (Cramp & Simmons, 1977). Il corpo è allungato, di medie dimensioni, ha piedi totipalmati e il becco lungo e uncinato all'apice; le timoniere sono rigide in numero di 12. Sessi simili ed abiti stagionali abbastanza differenziati. Eventuale presenza di un rudimentale ciuffo all'inizio del periodo riproduttivo, che appare più sviluppato nella sottospecie nominale (Brichetti *et al.*, 1992). Nel periodo riproduttivo la livrea è interamente nero lucente, con riflessi verdastri in ogni parte, comprese le remiganti e le timoniere. Le penne del dorso, le scapolari e le

copritrici alari presentano un colore bruno-bronzeo appena accennato. Normalmente hanno sulla cervice un piccolo ciuffo formato da piume arricciate in avanti. Sulla gola è presente una zona priva di piume e di colore giallo intenso. L'iride è verde brillante mentre il becco è nerastro sul culmine con margini e base della mandibola giallastri. I tarsi sono bruni, privi di piume, le membrane interdigitali variano da giallastre a carnicine. Nel periodo non riproduttivo il piumaggio diventa opaco a causa dell'attenuazione dei riflessi verdastri. I pulcini sono nudi alla nascita e si ricoprono dopo qualche giorno di un piumino brunastro. Il becco è scuro e le zampe bruno scure. I giovani presentano le parti superiori uniformemente brune marginate di chiaro sul dorso, le parti inferiori sono bianche, il becco bruno-chiaro con culmine nero. L'iride è azzurrognola (Foto 4). Gli immaturi (tardo autunno - primo inverno) hanno la livrea con la parte superiore simile a quella dell'adulto, mentre la parte inferiore è simile a quella dei giovani ma si presenta più scura. La spinta evolutiva data dalla ricerca dell'alimento ha portato questi uccelli verso una forte specializzazione natatoria e subacquea. Le loro piume sono prive di grasso protettivo, per evitare che vi si trattenga aria durante le immersioni. Lo scheletro è in grado di eliminare la maggior parte dell'aria in esso contenuta per ridurre al minimo la galleggiabilità e facilitare la vita subacquea. L'apparato respiratorio è in grado di assicurare al marangone apnee fuori dal comune, in quanto durante l'immersione le sacche aeree e i polmoni possono riciclare l'aria inspirata sfruttando al massimo l'estrazione dell'ossigeno. L'organo visivo è dotato di un organo bilanciante di pressione che garantisce la sensibilità della retina rispetto agli oggetti in movimento, in rapporto alla profondità; una terza palpebra trasparente, detta nictitante, protegge l'occhio durante l'immersione e consente una perfetta visione al centro del campo visivo. Le narici sono munite di una membrana che le chiude ermeticamente quando l'uccello è in apnea. Il becco è armato, all'apice, di un uncino robusto (Cesaraccio, 1990) con il quale il marangone tramortisce i pesci che ne costituiscono la dieta.

1.2 Habitat

Il Marangone dal ciuffo è una specie strettamente legata agli ambienti costieri marini. Per la riproduzione utilizza soprattutto piccole isole con coste alte o basse e falesie costiere. Pesca in mare e talvolta anche in stagni costieri. In Corsica l'82% dei nidi è situato su piccole isole e il restante 18% su falesie (Guyot, 1985). I nidi vengono costruiti a 100 – 120 m dal livello

del mare [Isole Piana e Foradada di Alghero e Tavolara (Torre & Trainito in Brichetti et al., 1992), falesie della costa occidentale della Corsica (Guyot, 1985)]. La scelta dei siti di riproduzione è legata alla disponibilità alimentare delle acque circostanti, all'assenza di predatori, alla presenza di anfratti, tafoni rocciosi e copertura vegetale sufficiente. Nel periodo extra-riproduttivo utilizzano come dormitori isole disabitate dove è possibile osservare all'imbrunire concentrazioni anche elevate di giovani e adulti.

1.3 Aspetti riproduttivi

Nel Mediterraneo il periodo riproduttivo coincide prevalentemente con i mesi invernali ed è fortemente condizionato dal tempo. In Corsica l'occupazione dei siti riproduttivi inizia già da ottobre e continua a novembre per terminare a dicembre con la costruzione del nido (Guyot, 1985). La deposizione delle uova ha inizio a gennaio-febbraio e continua fino a marzo-aprile, anche se sono state rilevate variazioni delle date di deposizione da un anno all'altro in una stessa colonia o nello stesso anno in colonie diverse (Guyot, 1985; Torre & Monbailliu in Brichetti et al., 1992). Nell'isola di Lampedusa le deposizioni hanno luogo tra gennaio e marzo, mentre sono stati osservati giovani in alimentazione da aprile a giugno (Massa, 1985). Heim de Balsac & Mayaud (1962) citano, per il Nord Africa, deposizioni comprese tra novembre e febbraio. Nelle isole del Quarnaro le deposizioni hanno luogo da fine gennaio a marzo con ritardi fino ad aprile e raramente a giugno (Benussi, 1992). In Corsica è possibile osservare pulli da gennaio a fine giugno. La maggior parte dei giovani e adulti abbandona il sito riproduttivo a maggio (Guyot, 1985). La tipologia dei nidi riscontrata all'Asinara è varia; con nidi costruiti in tafoni, anfratti, a terra sotto vegetazione (*Phyllirea* sp., *Pistacia lentiscus*, *Juniperus phoenicea*, *Lavatera arborea*, ecc.), allo scoperto, accostati a roccia o sopra rocce (Torre & Monbailliu in Brichetti et al. 1992). Il nido è piuttosto grossolano e voluminoso e per la sua costruzione viene utilizzato materiale vario disponibile nei dintorni come *Allium* sp., *Posidonia oceanica*, *Pistacia lentiscus*, *Lavatera arborea* unitamente a materiale trasportato dal mare come pezzi di canna, di corde di nailon, lenze, pezzetti di plastica (Torre & Monbailliu in Brichetti et al, 1992; Guyot, 1985). In Corsica il 90% dei nidi è costruito al riparo dal sole (Guyot, 1985), nel Quarnaro non sono stati rinvenuti nidi costruiti allo scoperto (Benussi, 1992). Nel 1988, nell'isola dell'Asinara la densità dei nidi ha raggiunto un valore medio di 25,9 nidi/ha.

Sempre in quest'isola i Marangoni dal ciuffo, nel 1988, hanno rioccupato il 71% dei vecchi nidi del 1987 (Torre & Monbailliu in Brichetti *et al.*, 1992). I Marangoni depongono normalmente 3 uova, raramente 1 e 4 e più raramente 5 e 6. In Corsica su 437 covate rilevate nel periodo 1979-1983, il 63,5% presentava 3 uova, con una media di 2,82 uova/nido (Guyot, 1985). Le uova hanno una forma ovale allungata e colore azzurro chiaro in parte ricoperto da un deposito gessoso bianco. La dimensione media rilevata, all'Asinara, in un campione di 66 uova invernali è di 63,3 x 38,3 mm e di 60,9 x 37,4 mm in un campione di 30 uova primaverili (Torre e Monbailliu in Brichetti *et al.*, 1992). L'incubazione è effettuata da entrambi i sessi, la schiusa è asincrona e i pulcini nascono inetti e nidicoli e vengono nutriti da entrambi i genitori becco a becco. Nel Mediterraneo il successo riproduttivo è estremamente variabile e probabilmente è legato alla disponibilità alimentare (Guyot, 1993). In Corsica Guyot (1985) ha rilevato in una colonia di 35 nidi l'involto di 1,23 giovani/coppia. La mortalità dei giovani è maggiore nei mesi immediatamente dopo l'involto.

1.4 Abitudini alimentari

Il regime alimentare è stato studiato sia tramite l'analisi dei boli che il Marangone rigetta dopo la digestione, sia dall'analisi dei rigurgiti dei giovani catturati per essere inanellati (Guyot, 1988; Torre e Monbailliu in Brichetti *et al.*, 1992) e sia dall'analisi del contenuto stomacale dei marangoni rimasti intrappolati nelle reti. L'alimentazione si basa principalmente di pesci costieri di basso valore economico. Il marangone dal ciuffo non può essere considerato quindi un concorrente alimentare dell'uomo. Nella dieta possono comparire anche vegetali marini (Cesaraccio, 1990). In particolare le specie ittiche riscontrate sono: *Symphodus* spp., *Labrus* spp., *Coris julis*, *Spicara* spp., *Chromis chromis*, *Diplodus* spp., *Atherina* spp., *Serranus* spp., *Mullus surmuletus*, *Mugil* spp., *Sarpa salpa*. La ricerca del cibo avviene sia in prossimità della costa che al largo in gruppi piccoli o anche molto numerosi. Il Marangone pesca tuffandosi sott'acqua anche a notevoli profondità. In Corsica il 20% (36 esemplari) dei Marangoni catturati dalle reti dei pescatori furono raccolti tra i 50 e 80 m (Guyot, 1990). In Sardegna alcuni individui sono stati catturati all'interno di nasse calate a profondità di 80 m (Torre in Brichetti *et al.*, 1992).

1.5 Eco-Etologia

Solitario durante il periodo estivo-autunnale evidenzia un forte gregarismo nei periodi riproduttivo e post-riproduttivo. All'Asinara, nel 1986, sono stati osservati 740 esemplari al dormitorio (Torre & Monbailliu in Brichetti et al, 1992). Forti concentrazioni (1000 esemplari ca.) di Marangoni dal ciuffo sono stati osservati durante l'attività di pesca nel 1985-1988 nell'Arcipelago di La Maddalena (Thibault et al., 1988; Torre e Monbailliu in Brichetti et al, 1992). Secondo Massa (1985) durante il periodo riproduttivo il Marangone non si allontana per le attività di pesca dai siti di nidificazione, e mostra un comportamento coloniale, anche se talvolta nidifica in coppie sparse. La scelta dei siti di riproduzione è legata alla disponibilità alimentare delle acque circostanti, all'assenza di predatori, alla presenza di anfratti, tafoni rocciosi e copertura vegetale sufficiente. Nel periodo extra-riproduttivo utilizzano come dormitori isole disabitate dove è possibile osservare all'imbrunire concentrazioni anche elevate di giovani e adulti. I luoghi di pesca sono solitamente marini anche se talvolta vengono utilizzati anche gli stagni costieri. Solitario durante il periodo estivo-autunnale evidenzia un forte gregarismo nei periodi riproduttivo e post-riproduttivo. Nel Mediterraneo occidentale la Sardegna, la Corsica e le Baleari sono le aree di massimo interesse per la riproduzione di questa specie. In Sardegna sono state individuate una quarantina di colonie, di cui 26 a nidificazione certa (Schenk & Torre, 1986). Particolare importanza rivestono quali siti di nidificazione le isole e gli isolotti delle Bocche di Bonifacio (Thibault, 1989). Nell'Adriatico i siti di nidificazione sono stati censiti nelle isole del Quarnaro e le isole dalmate. La popolazione totale mediterranea, compreso il Mar Nero, può essere stimata in 10.000 coppie (Guyot, 1993). In Italia la stima è di 1600-2000 coppie (Brichetti *et al*, 1992). La stima della popolazione sarda è di 1000-1800 coppie (Schenk & Torre, 1986), aggiornata successivamente a 1525-1945 coppie (Torre & Monbailliu in Brichetti *et al.*, 1992). Il Marangone dal ciuffo è fortemente legato al sistema marino-costiero che la specie frequenta durante tutto l'anno. Gli adulti mostrano un comportamento sedentario mentre i giovani e gli immaturi compiono dispersioni, soprattutto durante il periodo estivo-autunnale, anche a notevole distanza dai siti di origine. Guyot (1990) ha rilevato che il 77% dei Marangoni inanellati in Corsica e ricatturati a più di 100 km di distanza dal luogo di nascita aveva meno di un anno di età.

2 SCOPO DEL LAVORO

Lo studio condotto in questo lavoro si inquadra in un più ampio programma di ricerca sulla possibilità di conservazione e gestione delle colonie di *Phalacrocorax aristotelis dermarestii* presenti nel nord est della Sardegna, condotto in collaborazione con il Parco Nazionale dell'arcipelago della Maddalena e l'area marina protetta di Isola di Tavolara- Capo coda Cavallo. Questo programma prevede la caratterizzazione genetica delle popolazioni di questa specie che vivono nell'isola di Corcelli, appartenente all'arcipelago della Maddalena e nell'isola di Molarotto dell'area marina protetta di Tavolara/Capo Coda Cavallo, allo scopo di valutare se la pressione antropica, che in queste aree è notevolmente accentuata a causa degli elevati flussi turistici estivi, influenza la genetica di queste popolazioni. La scelta di queste due isole è stata fatta in base al numero dei nidi delle colonie censiti su di esse, che essendo maggiore rispetto alle altre isole sono state considerate rappresentative dell'area presa in considerazione. Ulteriore scopo di questo studio è stato quello di mettere a punto un metodo valido, veloce, facilmente applicabile e atraumatico per la determinazione del sesso nelle popolazioni in esame col fine di determinarne la sex ratio e di conoscere le condizioni di diversità genetica all'interno di questi gruppi, tramite l'utilizzo di marcatori genetici molecolari, per verificare sia l'eventuale esistenza di corridoi di migrazione tra le Isole vicine sia per poter programmare eventuali interventi di recupero mirati.

3 MATERIALI E METODI

Lo studio preliminare per la messa a punto del metodo molecolare per la determinazione del sesso è stato effettuato su 18 campioni di muscolo provenienti da marangoni di entrambi i sessi deceduti nelle reti calate da pescatori nelle acque dell'Arcipelago della Maddalena. I cadaveri sono stati portati in laboratorio, sottoposti a dissezione e classificati come maschi o femmine in relazione alle gonadi presenti. Di ciascun cadavere è stato prelevato un pezzo di muscolo e congelato a -20°C prima di essere sottoposto ad analisi. Questa procedura si è resa necessaria per avere dei campioni di DNA provenienti da animali con sesso sicuramente determinato sui quali operare le necessarie prove di validazione della metodica di analisi.

L'analisi della sex ratio nella popolazione è stata condotta su 70 campioni di sangue e piume prelevati in contemporanea con una campagna di inanellamento dei nuovi nati di questa specie nelle colonie presenti nell'Arcipelago della Maddalena, nello specifico sull'isola di Corcelli, e nelle colonie presenti nell'area marina protetta Tavolara-Punta Coda Cavallo di Tavolara, nell'isola di Molarotto (Fig. 20)

Sulla colonia presente sull'isola di Corcelli sono stati effettuati 2 interventi a distanza di un anno (29 marzo 2007-30 marzo 2008) mentre nella colonia presente sull'isola di Molarotto, è stato effettuato un unico intervento (31 marzo 2008).

Dai campionamenti effettuati, per ogni singola colonia sono stati ottenuti rispettivamente:

Isola di Corcelli (marzo 2007)	-	32 campioni
Isola di Corcelli (marzo 2008)	-	22 campioni
Isola di Molarotto (marzo 2008)	-	16 campioni

Per l'estrazione del DNA da utilizzare per la determinazione del sesso è stato effettuato il prelievo di una piuma caudale da tutti i soggetti inanellati, che è stata posta all'interno di una bustina marcata e conservata a basse temperature fino all'arrivo in laboratorio dove ciascuna piuma è stata lavata con etanolo al 70% e crioconservata a - 20°C fino al momento dell'analisi.



FIGURA 20. Localizzazione dei siti di provenienza dei campioni di Marangone dal ciuffo utilizzati in questo lavoro.

3.1 Determinazione del sesso

Sul DNA estratto dai campioni di sesso noto è stata testata una coppia di oligonucleotidi descritti in letteratura per la determinazione del sesso di cormorani giapponesi mediante reazione di polimerizzazione a catena del DNA (PCR) che permette di mettere in evidenza un polimorfismo sesso specifico presente in un introne del gene Chromobox Helicase DNA binding domain 1 (CHD1) presente in singola copia su entrambi dei due cromosomi sessuali W e Z (Ellegren, 1996; Griffiths et al., 1996). Gli oligonucleotidi testati sono complementari a una regione, altamente conservata tra le varie specie avicole, che permette di amplificare una regione che presenta spesso polimorfismi di lunghezza tra i due cromosomi sessuali (Inoue-Murayama et al., Anim Sci J, 73:417, 2002).

Marker	Sequenza Primer	TA°C
CHD1	F: GTTACTGATTCTGCTACGAGA R: ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	50°C

La reazione di amplificazione è stata eseguita come descritto precedentemente.

Il profilo termico è stato il seguente:

DENATURAZIONE INIZIALE	94°C	2'	} 33cicli
DENATURAZIONE	95°C	30''	
ANNEALING	50°C	1'	
ESTENSIONE	72°C	1'30''	
ESTENSIONE FINALE	72°C	5'	

4 RISULTATI

Dall'analisi necroscopica effettuata sui 18 marangoni adulti recuperati nelle reti dai pescatori 15 sono risultati di sesso maschile e 3 di sesso femminile (Fig. 21) L'utilizzo dei primers descritti in letteratura per l'amplificazione di un introne del gene Cromo Helicasi DNA Binding 1 (CHDB1) ha permesso di ottenere un prodotto di PCR in tutti i campioni di DNA analizzati. Questo protocollo, descritto in letteratura per varie specie avicole, permette di amplificare una regione presente nel primo introne di questo gene, che in alcune specie è diversa a seconda che il frammento sia amplificato sul cromosoma Z o su quello W.

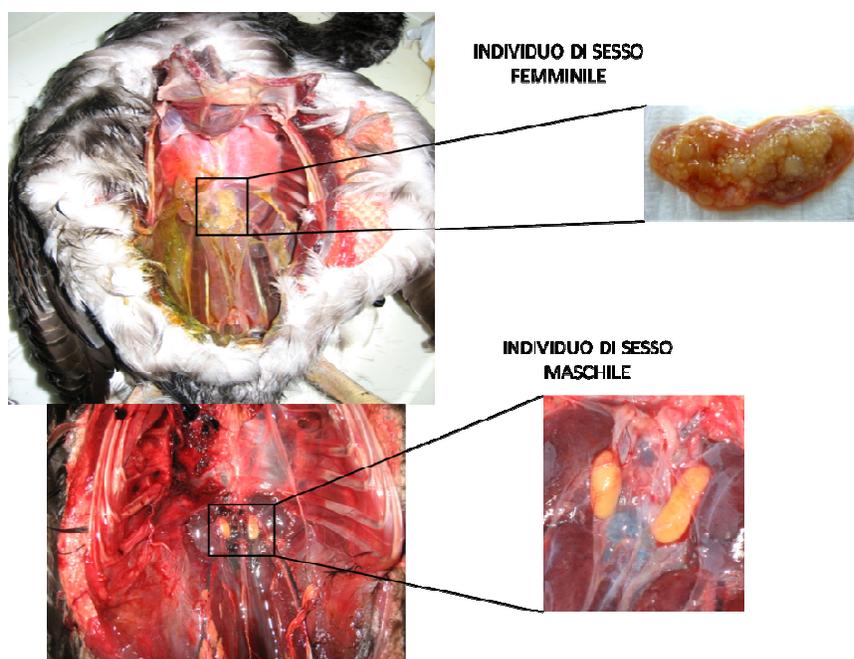


FIGURA 21. Gonadi maschili e femminili come appaiono all'analisi necroscopica

I risultati, come mostrato nel gel elettroforetico della figura 22, hanno permesso di discriminare i campioni provenienti da individui di sesso maschile da quelli di sesso femminile. Negli individui di sesso maschile, omogametico, è presente una sola banda mentre in quelli di sesso femminile, eterogametico, si possono evidenziare due bande: una

corrispondente all'amplificato della sequenza presente sul cromosoma Z e una sulla sequenza presente sul cromosoma W.



FIGURA 22. Esempio di gel elettroforetico mostrante i risultati dell'amplificazione del gene CHD1 in campioni di DNA di marangoni dal ciuffo

In questa specie quindi il primo introne di questo gene presenta una delezione nella copia presente nel cromosoma w che rende l'amplificato più veloce nella elettroforesi su gel rispetto all'amplificato sul cromosoma Z che invece non ha questa delezione.

Per valutare la possibilità di amplificare sequenza geniche dalle poche cellule ematiche ed epiteliali presenti in una piuma si è proceduto ad estrarre anche il DNA dalle piume prelevate dagli animali deceduti nelle reti e sottoporlo a reazione di polimerizzazione a catena del DNA per la determinazione del sesso, utilizzando il protocollo precedentemente descritto. La reazione di amplificazione sulle piume ha confermato il sesso di tutti i 18 campioni valutati sia dal punto di vista macroscopico che mediante analisi molecolare su DNA estratto da tessuto muscolare.

I risultati ottenuti hanno permesso di poter procedere alla determinazione della sex ratio nei nuovi nati delle due colonie presenti nell'isola di Corcelli e nell'isola di Molarotto.

Il prelievo dei campioni è stato effettuato in concomitanza con le campagne di inanellamento condotte dall'Istituto Nazionale Fauna Selvatica nel mese di Marzo del 2007 e 2008 sui pulli della colonia di Corcelli e nel mese di Marzo 2008 su quelli della colonia di Molarotto. Durante le fasi di inanellamento da ciascun pullo inanellato è stata prelevata una penna caudale che è stata utilizzata per l'estrazione del DNA. I campioni prelevati nell'isola di Corcelli sono stati 32 durante la prima stagione riproduttiva e 22 durante la seconda mentre nella colonia di Molarotto sono stati prelevati 16 campioni. L'estrazione del DNA ha dato risultati positivi in tutti i 70 campioni analizzati per cui è stato possibile procedere in tutti i campioni all'amplificazione del gene CDH1. Come si può

29.03.2008		ISOLA DI MOLAROTTO		
N°	PVC	METALLO	Nido	Sesso
1	D55	P12596	1	
2	D56	P12597	1	
3	D57	P12598	2	
4	D58	P12599	3	
5	D60	P12601	4	
6	D63	P12604	5	
7	D64	P12605	5	
8	D65	P12606	5	
9	D66	P12607	6	
10	D67	P12608	6	
11	D68	P12609	7	
12	D69	P12610	8	
13	D70	P12611	8	
14	D71	P12612	9	
15	D72	P12613	9	
16	D73	P12614	9	

TABELLA 14.. Risultati dell'analisi PCR per la determinazione del sesso nei pulli della colonia di Molarotto sottoposti ad inanellamento nel 2008

30.03.2008		ISOLA DI CORCELLI		
N°	PVC	METALLO	Nido	Sesso
1	D80	P12621	1	
2	D81	P12622	2	
3	D82	P12623	2	
4	D83	P12624	3	
5	D85	P12626	4	
6	D86	P12627	4	
7	D87	P12628	3	
8	D89	P12630	5	
9	D90	P12631	5	
10	D91	P12632	6	
11	D92	P12633	6	
12	D93	P12634	7	
13	D94	P12635	7	
14	D95	P12636	8	
15	D96	P12637	9	
16	D97	P12638	9	
17	D98	P12639	10	
18	D99	P12640	11	
19	F00	P12641	11	
20	F01	P12642	12	
21	F02	P12643	13	
22	F03	P12644	13	

TABELLA 15. Risultati dell'analisi PCR per la determinazione del sesso nei pulli della colonia di Corcelli sottoposti ad inanellamento nel 2008

Nella tabella sono riassunti i dati sulla determinazione della sex ratio in tutti gli individui testati. Come si può mettere in evidenza la sex ratio è statisticamente differente da quanto ci si dovrebbe attendere in una popolazione in equilibrio (test chi quadro $p < 0.01$). Gli individui di sesso

maschile sono infatti risultati 21/32 (65,7%), 9/22 (59%) and 10/16 (62%) nelle analisi eseguite nelle colonie di Corcelli del 2007 e del 2008 and Molarotto rispettivamente. Nella stessa tabella è riassunto anche il risultato riguardante la sex ratio dei marangoni Adulti trovati intrappolati nelle reti da pesca. Anche in questo caso la sex ratio è spostata verso il sesso maschile, suggerendo una maggior attività maschile nella ricerca di cibo alle batimetriche in cui vengono sistemate le reti.

	CORCELLI 2007	MOLAROTTO 2008	CORCELLI 2008	ADULTI 2007
♀	11 (34,3%)	9 (40,9%)	6 (37,5%)	3 (16,6%)
♂	21 (65,7%)	13 (59,1%)	10 (62,5%)	15 (83,4%)

TABELLA 16. Sommario dei risultati dell'analisi PCR per la determinazione del sesso in tutti gli individui analizzati.

5 DISCUSSIONE

Numerose specie avicole sono considerate sessualmente monomorfe. Mentre la maggior parte di queste specie ha probabilmente qualche caratteristica che permette di distinguere i due sessi, molto spesso i due sessi non sono distinguibili. Le metodologie utilizzate per la determinazione del sesso nelle specie monomorfe includono l'esame morfologico della cloaca, la misura degli livelli di ormoni steroidei nel plasma o nelle feci, l'analisi morfologica dei cromosomi, la visualizzazione laparoscopica degli organi sessuali e l'utilizzo di sonde e sequenze sesso specifiche.

Gli individui di sesso maschile appartenenti alla classe dei galliformi, degli anseriformi e dei ratitidi hanno un fallo facilmente evidenziabile sia nei pulli mediante visualizzazione che negli adulti mediante palpazione della porzione craniale della fossa cloacale. I maschi di colombiformi e di passeriformi hanno una papilla dei dotti deferenti molto prominente che può essere evidenziata facilmente mediante ispezione visiva della porzione craniale della fossetta cloacale. Questi metodi prevedono la cattura e la ritenzione degli animali da sessare. La determinazione dei livelli di ormoni estrogeni e androgeni nel plasma e negli escrementi è stata utilizzata per la determinazione del sesso di alcune specie di uccelli ma la quantità di ormoni steroidei prodotti varia con l'età e con l'attività sessuale di un uccello che rende poco attendibile l'interpretazione del rapporto estrogeni/androgeni.

Negli uccelli quello femminile è il sesso eterogametico, avendo entrambi i cromosomi sessuali W e Z, mentre quello maschile è omogametico con due cromosomi sessuali uguali Z. La determinazione di due cromosomi sessuali uguali o differenti in colture cellulari, principalmente prelevate da penne, mediante tecniche di citogenetica è stato utilizzato per la determinazione del sesso degli uccelli. Questa metodologia se condotta da un citogenetista con esperienza può essere altamente attendibile anche se ha lo svantaggio di richiedere tempi lunghissimi per ottenere una risposta, in addizione alla difficoltà di ottenere cellule vitali da utilizzare per preparare le colture cellulari.

L'identificazione laparoscopica delle gonadi è spesso utilizzata come tecnica d'elezione per la determinazione del sesso negli uccelli. Questa tecnica ha il vantaggio di dare un risultato immediato e, dal punto di vista clinico, di evidenziare le caratteristiche fisiche del tratto riproduttore e organi annessi. Viene utilizzata principalmente in individui adulti in cui le

gonadi sono ben sviluppate e in minor misura per i pulli in cui le gonadi sono difficilmente valutabili endoscopicamente. Il maggior svantaggio di questa tecnica è la sua elevata invasività dovuta alla necessità di accedere alla cavità celomatica e alla necessità di dover ricorrere ad anestesia.

In tempi recenti sono state utilizzate con intensità sempre crescente le tecniche di amplificazione del DNA che riescono a mettere in evidenza differenze tra sequenze omologhe presenti nei cromosomi sessuali Z e W. Queste tecniche risultano essere una valida alternativa alle tecniche chirurgiche in quanto non comportano nessun rischio per la salute del volatile, alla determinazione citogenetica in quanto non richiedono colture cellulari, sono facilmente eseguibili e possono dare un risultato certo entro qualche ora dal prelievo del campione cellulare, che consiste generalmente in una penna prelevata o persa dall'animale, per cui può essere utilizzato anche in pulli presenti nel nido o in uccelli di piccola taglia (Halverson, 1997). Il marcatore maggiormente utilizzato è attualmente il gene Chromobox Helicase DNA binding domain 1 (CHD1), presente su ognuno dei due cromosomi sessuali W e Z in singola copia (Ellegren, 1996; Griffiths e Tivari, 1995). Questo tipo di gene risulta molto conservato, rispetto all'omologo gene dei mammiferi e la divergenza è rappresentata da un solo aminoacido sui 180 che compongono il dominio dell'elicasi (Fridolfson and Ellegren, 2000). E' stato inoltre evidenziato che la sequenza codificante del gene CHD1W presenta una più alta frequenza di mutazione rispetto a CHD1Z, questo ne consente pertanto l'impiego per la discriminazione tra i soggetti ZZ (maschili) e i soggetti WZ (femminili) (Sacchi et al., 2004) mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione. Questi enzimi sono stati utilizzati per distinguere una sequenza di restrizione mutata presente nel cromosoma W rispetto a quello Z (Griffiths et al., 1996) per cui il frammento amplificato dal cromosoma Z viene frammentato mentre quello derivante dall'amplificazione del cromosoma W rimane inalterato. La successiva analisi elettroforetica mette perciò in evidenza tre bande per il sesso femminile e due solamente per il sesso maschile.

La presenza in questo gene di un introne che in maniera specie specifica presenta un polimorfismo di lunghezza della sequenza sesso correlato ha permesso di eliminare il passaggio con gli enzimi di restrizione (Griffiths e coll. 1998) discriminando mediante elettroforesi su gel tra gli amplificati derivati dal cromosoma W rispetto a quelli derivati da quello Z.

I dati ottenuti in questa tesi mettono in evidenza la possibilità di effettuare la determinazione del sesso nel *Phalacrocorax aristotelis desmarestii* mediante una tecnica semplice e atraumatica che richiede come campione solamente una penna prelevata dall'animale. Il DNA

estratto dalle cellule dello scapo plumale mediante l'utilizzo di un kit per chimica forense ha permesso di poter effettuare l'amplificazione dei geni CDH1 e di poter attribuire il sesso a ciascun animale analizzato. Il DNA estratto è inoltre quantitativamente sufficiente per poter effettuare altre decine di reazioni di amplificazione del DNA, necessarie per caratterizzare geneticamente queste popolazioni. Il sessaggio con PCR degli uccelli monomorfici, per il suo carattere assolutamente non invasivo, può trovare, inoltre, impiego nell'ambito di definiti progetti di censimento dell'avifauna, finalizzati alla conoscenza dei flussi migratori e delle popolazioni stanziali, a complemento dei rilievi morfobiometrici.

La determinazione del sesso, mediante PCR, si conferma, infine, come metodica di elezione anche ai fini della formazione delle coppie di riproduttori di specie selvatiche monomorfe a rischio di estinzione, nell'ambito di protocolli di condizionamento della riproduzione in cattività e programmi di restocking.

L'analisi del sesso degli individui campionati durante le procedure di inanellamento ha permesso di determinare la sex ratio delle nuove generazioni di marangoni dal ciuffo delle isole di Corcelli e Molarotto. Come mostrato dai risultati ottenuti, in tutti e tre i casi (Corcelli 2007 e 2008 e Molarotto 2008) la sex ratio è statisticamente spostata verso il sesso maschile rispetto al 50% atteso per una popolazione in equilibrio riproduttivo, suggerendo la possibilità di controllo della sex ratio da parte delle femmine prima dell'ovodeposizione.

La teoria dell'allocatione del sesso postula che le femmine che hanno la capacità di regolare la sex ratio dei loro discendenti in accordo con un potenziale guadagno della fitness di ciascun sesso, sono avvantaggiate rispetto a femmine che mancano di questa capacità (Trivers e Willard 1973; Frank 1990). È stato descritto recentemente in numerose specie avicole con spiccato dimorfismo sessuale la manipolazione adattativa della sex ratio ad opera delle femmine adulte. In queste specie infatti gli individui del sesso di taglia maggiore richiedono maggiori risorse per la crescita rispetto a individui dell'altro sesso e di conseguenza la seguente sopravvivenza e il successo riproduttivo di uno dei sessi è maggiormente dipendente dalla quantità di investimento parentale. Le femmine adulte tendono quindi a produrre maggiormente pulcini del sesso maggiormente dipendente quando esse stesse sono in buone condizioni nutrizionali o quando c'è una elevata disponibilità di cibo e la strategia utilizzata è quella di modificare la sex ratio alla ovodeposizione (Riesdra et al., 1998). Rispetto a queste specie a dimorfismo sessuale, il marangone dal ciuffo non presenta differenze tra i sessi, se non durante il periodo riproduttivo, in cui i maschi presentano un

98

peso di circa il 20% superiore rispetto alle femmine (Cramp e Simmons, 1977). Da studi effettuati sul marangone europeo *Phalacrocorax aristotelis* è stato visto che i maschi di migliore qualità (in taglia, esperienza ed età) si accoppiano prima nella stagione riproduttiva, con un successo maggiore e ottengono i migliori siti di riproduzione e di accoppiamento (Aebischer et al., 1995; Velando 1997). Le femmine preferiscono maschi di migliore qualità anche per gli accoppiamenti extra-coppia (Hasselquist e coll., 1996; Kempnaers e coll., 1997). Oltre che dalla taglia la fitness riproduttiva nel maschio è inoltre inversamente correlata alla data di schiusa (Graves e coll., 1993) per cui i maschi che nascono prima sono quelli che avranno una maggiore fitness riproduttiva. Secondo alcuni autori (Aebischer 1993) questo potrebbe essere dovuto a una scarsa qualità dei maschi che si accoppiano in ritardo.

Velando e coll., (2002) in uno studio condotto su una colonia di *Phalacrocorax aristotelis* delle isole Cies, in Galizia, nel nord ovest della Spagna, hanno messo in evidenza una variazione stagionale nella sex ratio di questa specie. I pulli nati durante la prima stagione riproduttiva, mediamente prima del 18 marzo presentavano una maggior incidenza di maschi, mentre quelli nati nella seconda parte della stagione riproduttiva presentavano un maggior numero di individui di sesso femminile. Dai dati in nostro possesso sembrerebbe che nella sottospecie aristotelis non si possa seguire un andamento di questo tipo in quanto i nostri rilevamenti sono stati eseguiti gli ultimi giorni di marzo, tra il 29 e 31, in una fascia che è sicuramente all'interno della seconda fase della stagione riproduttiva che in questa specie va da gennaio-febbraio a marzo-aprile (Guyot, 1985; Torre & Monbailliu in Brichetti *et al.*, 1992) e in tutti e tre i rilevamenti si è ottenuta una sex ratio sbilanciata in senso maschile. La causa di questa alterazione potrebbe essere perciò diversa dalla disponibilità di cibo e si potrebbe ipotizzare che anche altri fattori possano influire sulla capacità delle femmine di questa specie di poter regolare la sex ratio. Si potrebbe ipotizzare che ci possa essere un processo di recupero di una diminuzione di individui di sesso maschile nella colonia, dovuta a morte di animali prevalentemente di sesso maschile durante le incursioni sottomarine alla ricerca di pesce. Questo è confermato dai dati sulla sex ratio degli animali ripescati intrappolati nelle reti dai pescatori che hanno mostrato che dall'analisi di determinazione del sesso l'82.3% di questi marangoni sono risultati di sesso maschile. Questa differente moria tra i due sessi potrebbe essere spiegata dal fatto che probabilmente vengono utilizzate differenti strategie di pesca, strategie già utilizzate da altre specie di uccelli marini costieri per minimizzare la competizione alimentare tra i sessi. È stato visto

per esempio negli albatros (*Diomedea exulans*; Prince e coll., 1992; Weimerskirch e coll., 1993) che il maschio e le femmine utilizzano differenti aree di pesca mentre i cormorani subantartici (*Phalacrocorax albiventer*) e giapponesi (*Phalacrocorax filamentosus*) utilizzano differenti nicchie verticali della stessa zona di pesca (Kato e coll., 1999). Questo lavoro, in cui ai cormorani venivano applicati dei sensori per rivelare le profondità massime di immersione, ha evidenziato infatti come la profondità dei tuffi negli individui di sesso maschile fosse superiore rispetto a quella delle femmine. Probabilmente quindi gli individui di sesso maschile incorrono nella morte da annegamento nelle reti, poste in fondali a maggiori profondità, che invece non vengono incrociate dagli individui di sesso femminile che pescano su fondali con batimetrica minore, in vicinanza della costa. Le femmine in deposizione potrebbero selezionare l'uovo in senso maschile per rispondere alla necessità di riequilibrare la sex ratio alterata da questo fenomeno attivando, come già mostrato per altre specie avicole (West e Sheldon 2002; Griffin e coll., 2005; Badyaev e coll., 2006a) meccanismi di determinazione del sesso favoriti durante l'evoluzione per rispondere a differenze nella fitness relativa al sesso maschile e femminile in risposta a mutazioni ecologiche e sociali. I meccanismi molecolari e citologici attraverso i quali può essere modificata la sex ratio da parte degli uccelli si ipotizza siano per la maggior parte a carico dell'apparato citoscheletrico. La meiosi nella cellula uovo, al contrario di quanto succede nei mammiferi, avviene qualche giorno prima dell'ovodeposizione, per cui i meccanismi di determinazione sessuale possono interferire con la segregazione dei cromosomi sessuali, attivando un meccanismo epigenetico, in risposta a stimoli ambientali (Rutkowska e Badyaev, 2008). Sono stati infatti evidenziati numerosi stadi della meiosi durante i quali un intervento ormonale può influenzare la normale sex ratio; per esempio una azione non genomica degli ormoni steroidei può influenzare il citoscheletro, modificando le concentrazioni di calcio intracellulare che attiva il network di actina e altera il moto dei cromosomi e il loro legame ai microtubuli, che influenza l'orientamento del fuso meiotico e la differente segregazione dei due cromosomi sessuali per cui uno dei due (in questo caso quello femminile) viene portato nel globulo polare e perciò inattivato (Badyaev e coll., 2006b). Lo stato ormonale dell'animale è quindi un mediatore epigenetico tra i fattori ambientali rilevati dalla femmina e la determinazione del sesso dei neonati attraverso il suo effetto sul meccanismo di segregazione dei cromosomi sessuali.

6 ANALISI MICROSATELLITI

I campioni del nostro studio sono stati analizzati tramite l'utilizzo di 5 microsatelliti (tabella 17).

Marker	Fluoro cromo	Sequenza Primer	TA °C	Origine
PcT1	Fam	F: CCTCGTAAACTCCTAAATCTGG; R: GAAGCCTAGAACTCACAAGC	62	Phalacrocorax carbo
PcD2	Hex	F: GATGGAAGTGAATAAAAGTTGG; R: TTATGCAGAACTGAATTTTCC	61	Phalacrocorax carbo
PcT3	Fam	F: CTTCTGCTATGTCTATGCTTG; R: ACAGCAAACAGCATCTATTCC	60	Phalacrocorax carbo
PcT4	Hex	F: GGAGTCAGAGAACAACAACCAACC; R: CAGCAGAGCGAGTTCTTTTAAAC	62	Phalacrocorax carbo
PcD5	Fam	F: CCACTATTCTACACTCACTTCG; R: GAACTGTTAGCAAATAAATCCTG	53	Phalacrocorax carbo
PcD6	Hex	F: GCACACACATAGAATGACCAG; R: AGCAAGAGGTTAACTCAGC	58	Phalacrocorax carbo

Tabella 17. Generalità sui markers microsatelliti utilizzati

Gli oligonucleotidi *forward* di ogni coppia di primers utilizzati nella reazione di polimerizzazione a catena (*PCR*) dei marcatori sono stati marcati con dei fluorocromi (6-FAM e HEX) all'estremità 5', in modo che potessero essere riconosciuti da un analizzatore di fluorescenza di un sequenziatore automatico.

La reazione di amplificazione è stata eseguita come già descritto precedentemente.

Il profilo termico è stato il seguente:

DENATURAZIONE INIZIALE	94°C	2'	} 33cicli
DENATURAZIONE	95°C	30''	
ANNEALING	X°C	1'	
ESTENSIONE	72°C	1'30''	
ESTENSIONE FINALE	72°C	5'	

X= temperatura specifica per ogni primers

7 RISULTATI

Tutte le 5 coppie di primers analizzate hanno amplificato prodotti specifici nel DNA dei campioni di Marangone dal Ciuffo analizzati. Tutti e 5 i micro satelliti analizzati sono risultati polimorfici, con un numero di alleli che varia da 4 a 32 (Tab. 18) La media degli alleli evidenziati nel totale dei campioni analizzati è stata di $14,6 \pm 11,39$ per locus (media \pm DS) e non sono state evidenziate differenze tra i tre gruppi analizzati con medie di $10,2 \pm 6,38$, $9 \pm 5,1$, $9,8 \pm 6,53$ e $8,4 \pm 4,72$ rispettivamente per i gruppi di Corcelli 2007, Molarotto 2008, Corcelli 2008 e Adulti 2007. È possibile notare che la popolazione Corcelli 2007 possiede il maggior numero medio di alleli (10.2), mentre la popolazione di Adulti possiede il valore minimo (8.4). Tutti i marcatori polimorfici, ad eccezione di PcD2, presentano alleli privati.

		Corcelli 2007	Molarotto 2008	Corcelli 2008	Adulti 2007		Corcelli 2007	Molarotto 2008	Corcelli 2008	Adulti 2007
	N	n=32	n=16	n=21	n=18		N	n=32	n=16	n=18
PcT1	1	0,047	0,000	0,024	0,056	PcT3	1	0,016	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,071	0,028		2	0,031	0,000	0,023
	3	0,016	0,000	0,024	0,000		3	0,000	0,000	0,000
	4	0,031	0,000	0,024	0,000		4	0,016	0,000	0,000
	5	0,016	0,031	0,071	0,000		5	0,016	0,125	0,000
	6	0,125	0,094	0,024	0,111		6	0,047	0,063	0,091
	7	0,016	0,094	0,000	0,111		7	0,078	0,000	0,023
	8	0,047	0,031	0,071	0,056		8	0,188	0,094	0,136
	12	0,000	0,000	0,000	0,028		9	0,047	0,219	0,136
	13	0,016	0,000	0,000	0,000		10	0,219	0,219	0,296
	14	0,031	0,031	0,143	0,000		11	0,203	0,031	0,136
	15	0,234	0,250	0,167	0,056	12	0,109	0,000	0,046	
	16	0,125	0,063	0,048	0,056	13	0,000	0,094	0,046	
	17	0,109	0,063	0,095	0,194	14	0,016	0,063	0,000	
	18	0,031	0,000	0,024	0,000	15	0,016	0,031	0,046	
	19	0,000	0,031	0,000	0,028	16	0,000	0,031	0,000	
	20	0,047	0,000	0,024	0,000	17	0,000	0,000	0,023	
	21	0,031	0,000	0,024	0,000	18	0,000	0,031	0,000	
	22	0,016	0,031	0,000	0,000	PcT4	1	0,000	0,031	0,023
	23	0,016	0,000	0,024	0,083		2	0,113	0,188	0,182
	24	0,031	0,063	0,000	0,056		3	0,065	0,000	0,023
26	0,000	0,000	0,024	0,000	4		0,032	0,031	0,023	
27	0,016	0,063	0,071	0,000	5		0,081	0,063	0,023	
28	0,000	0,031	0,024	0,028	6		0,048	0,031	0,114	
29	0,000	0,031	0,000	0,000	7		0,258	0,125	0,250	
30	0,000	0,063	0,024	0,111	8		0,113	0,219	0,046	
31	0,000	0,031	0,000	0,000	9		0,145	0,188	0,182	
PcD2	1	0,355	0,281	0,386	0,306		10	0,097	0,063	0,046
	2	0,258	0,094	0,114	0,250		11	0,016	0,063	0,000
	3	0,258	0,563	0,409	0,361	12	0,032	0,000	0,068	
	4	0,129	0,063	0,091	0,083	13	0,000	0,000	0,023	
					PcD5	1	0,016	0,000	0,000	
				2		0,000	0,031	0,000		
				3		0,578	0,656	0,727		
				4		0,375	0,281	0,250		
				5		0,031	0,031	0,023		

TABELLA 18. Frequenze alleliche osservate per ciascun marcatore all'interno di ogni singola popolazione

Di seguito sono riportati i grafici relativi alle frequenze alleliche dei 5 loci nelle 4 popolazioni esaminate, in ascissa sono indicati i diversi alleli mentre nelle ordinate è indicata la frequenza allelica

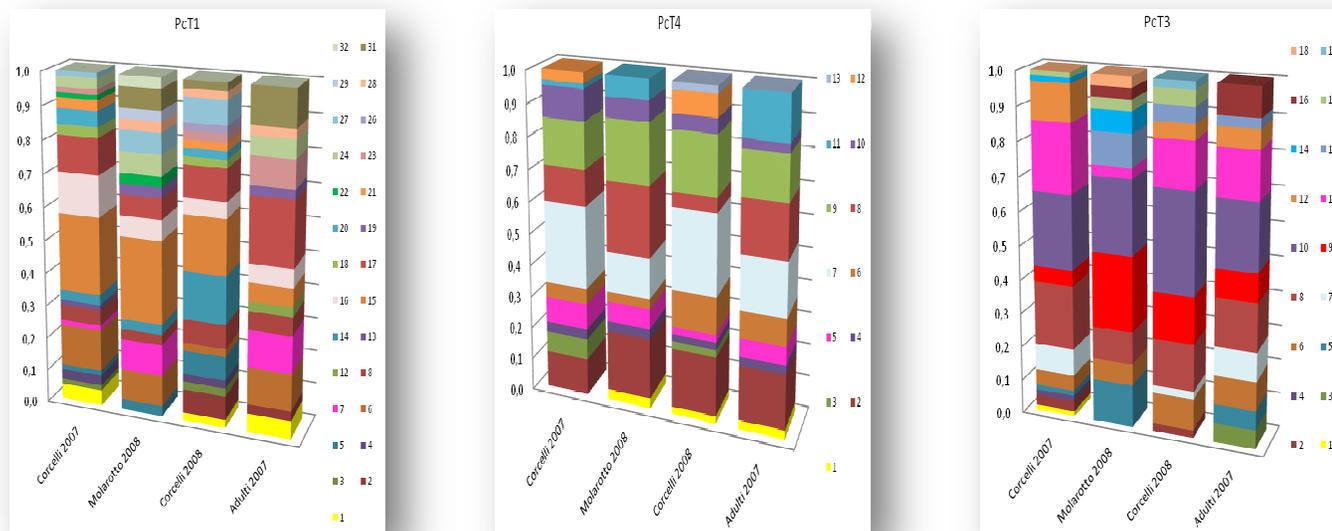


FIGURA 23. Frequenze alleliche degli oociti isolati

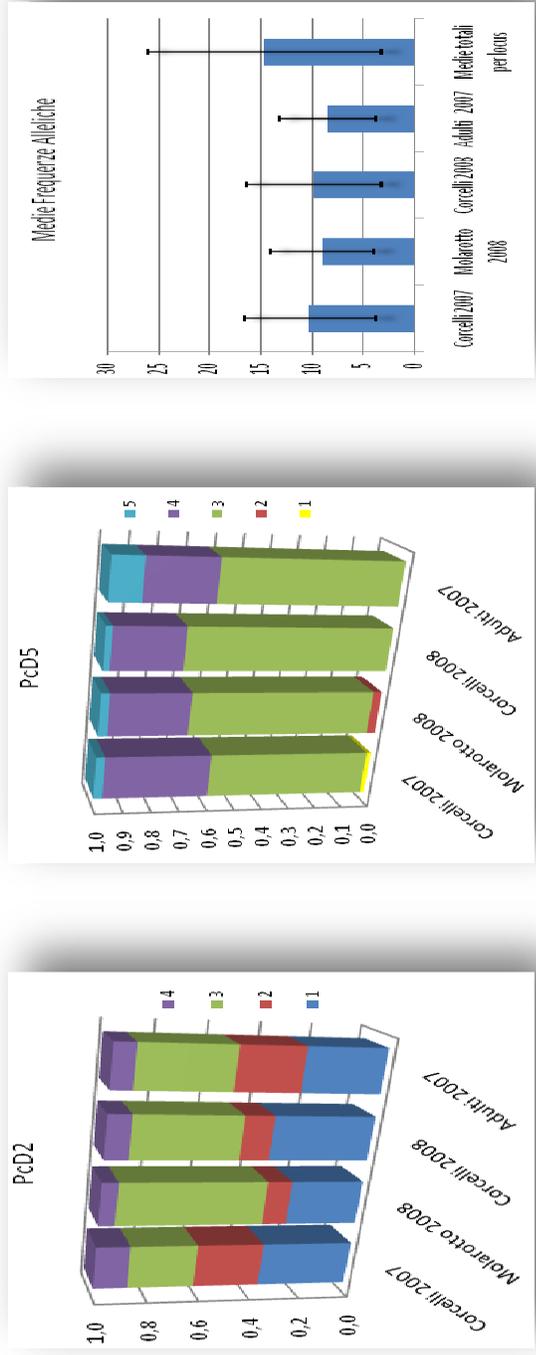


FIGURA 24. Frequenze alleliche degli oociti isolati

Il calcolo dell'eterozigosità osservata, ossia la probabilità che un individuo preso a caso da una popolazione sia eterozigote per due qualsiasi alleli di un locus, presenta una scarsa variabilità tra le popolazioni (FIG. 25). Ad esempio il marcatore PcT1 ha un'eterozigosità che varia da 0,61905 nella popolazione di Corcelli 2008 a 0,75000 nella popolazione di Molarotto 2008.

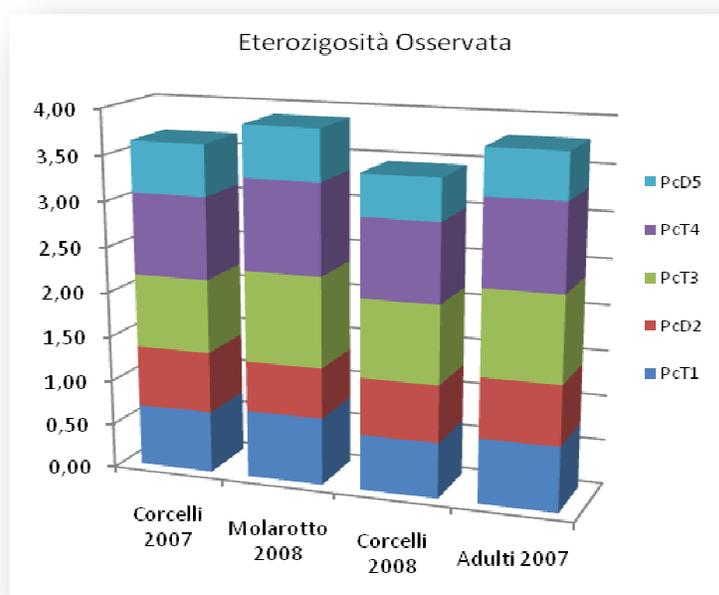


FIGURA 25. Eterozigosità osservata nei microsatelliti delle quattro popolazioni di marangone dal ciuffo studiate

Il test di deviazione dalla legge di Hardy-Weimberg (tabella 19) ha messo in evidenza che il locus PcT1 devia dall'equilibrio in 3 popolazioni di Marangoni. Le popolazioni di Corcelli 2007, Molarotto 2008 e Corcelli 2008 e il locus PcT4 che devia dall'per quanto riguarda gli altri locus tutte le popolazioni risultano in equilibrio di Hardy - Weinberg ($P < 0,0025$ dopo correzioni secondo Bonferroni)

La diversità genetica (H) è un indice della variabilità genetica di una popolazione, e consiste nella probabilità che 2 alleli di un determinato locus, scelti a caso, siano diversi nel campione. Le popolazioni qui studiate presentano una scarsa variabilità genetica in quanto calcolata singolarmente per ogni marcatore, varia tra 0,906 e 0,944 per il locus PcT1,

tra 0,613 a 0,737 per il locus PcD2, tra 0,860 a 0,910 per il locus PcT3, tra 0,867 e 0,889 per il locus PcT4 e tra 0,417 e 0,533 per il locus PcD5 (Fig. 26).

locus	Corcelli 2007			Molarotto 2008		
	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
PcT1	0,68750	0,90278	0,00038*	0,75000	0,92137	0,01283
PcD2	0,67742	0,73612	0,20032	0,56250	0,61089	0,68325
PcT3	0,81250	0,86458	0,12298	1,00000	0,88710	0,98623
PcT4	0,90323	0,87626	0,61536	1,00000	0,87903	0,07490
PcD5	0,56250	0,53224	1,00000	0,56250	0,50403	1,00000
locus	Corcelli 2008			Adulti 2007		
	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
PcT1	0,61905	0,93612	0,00000*	0,72222	0,92540	0,09829
PcD2	0,63636	0,67759	0,76649	0,66667	0,72698	0,30231
PcT3	0,86364	0,86047	0,52295	0,94444	0,91111	0,54927
PcT4	0,86364	0,86681	0,04030	0,94444	0,89048	0,45676
PcD5	0,45455	0,41755	1,00000	0,50000	0,53175	0,30140

TABELLA 19. Frequenze alleliche osservate e attese secondo la legge di Hardy-Weimberg per ciascun marcatore utilizzato nelle tre popolazioni analizzate. In rosso sono mostrati i marcatori le cui frequenze differiscono statisticamente da quanto postulato da Hardy-Weimberg.

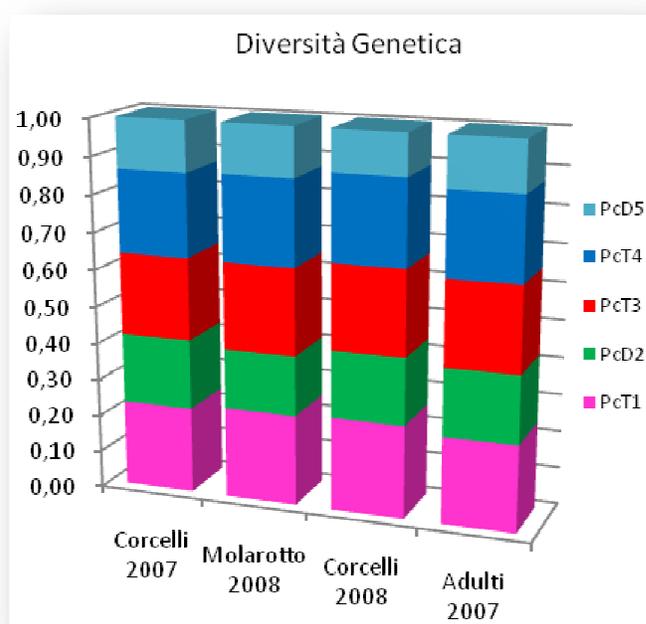


FIGURA 26. Diversità genetica nelle 4 popolazioni di Marangoni analizzate, calcolata come probabilità che due alleli scelti a caso in ciascuna popolazione siano diversi.

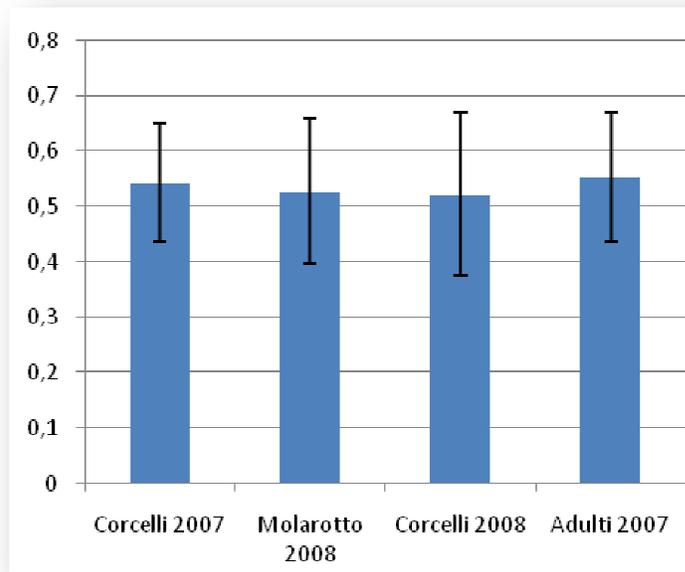


FIGURA 27. Diversità genetica per tutti i locus con anche segnata la deviazione standard

La differenziazione delle popolazioni è stata testata utilizzando l' F_{ST} e R_{ST} (Tabelle 20, 21), considerando tutti e 5 i marcatori genetici contemporaneamente. Dai valori delle matrici è possibile osservare che nessuna popolazione differisce significativamente dalle altre.

	Corcelli 2007	Molarotto 2008	Corcelli 2008
Molarotto 2008	0.0187 (0.0167)*		
Corcelli 2008	0.0043 (0.4250)	0.0005 (0.2833)	
Adulti 2007	0.0011 (0.0667)	0.0000 (0.5250)	0.0016 (0.0500)

TABELLA 20.. Valori di F_{ST} calcolati tra coppie di popolazioni. Il P-value è indicato nelle parentesi.

	Corcelli 2007	Molarotto 2008	Corcelli 2008
Molarotto 2008	0,0108 (0,2100)		
Corcelli 2008	-0,1040 (0,8000)	-0,0113 (0,6300)	
Adulti 2007	-0,0163 (0,9300)	-0,0119 (0,6600)	-0,0125 (0,7300)

TABELLA 21. Valori di R_{ST} calcolati tra coppie di popolazioni. Il P-value è indicato nelle parentesi.

I risultati del bottleneck test sono mostrati in tabella 22. L'analisi è stata eseguita utilizzando il modello di evoluzione TPM con 1000 permutazioni per generare i valori di eterozigosità teorica in base al numero di alleli k . Sono indicati i valori di P relativi ad un eccesso o una carenza di eterozigoti (quest'ultimo caso spiegabile con una espansione rapida della popolazione).

	Corcelli 2007	Molarotto 2008	Corcelli 2008
$P(H_D)$	0,687	0,406	0,406
$P(H_E)$	0,406	0,687	0,687
$P(H)$	0,812	0,812	0,812

Tabella 22. *Bottleneck test. Per ogni popolazione sono indicati i valori di probabilità per una carenza ed eccesso di eterozigoti. Il terzo valore si riferisce alla probabilità combinata. Gli Adulti sono stati esclusi in quanto non sono rappresentativi di una singola popolazione*

Nel grafico dell'AFC riportato in Figura 28, ciascun individuo è rappresentato da un quadretto di colore diverso a seconda della popolazione geografica di appartenenza ed è collocato entro lo spazio tridimensionale in base alla distanza genetica, testata dal software, rispetto agli altri individui.

Le relazioni tra le popolazioni esaminate con l'AFC, non evidenziano nessuna differenziazione netta tra le popolazioni. possiamo osservare una tendenza delle popolazioni a raggrupparsi ognuna in un quadrante, anche se sono evidenti delle sovrapposizioni.

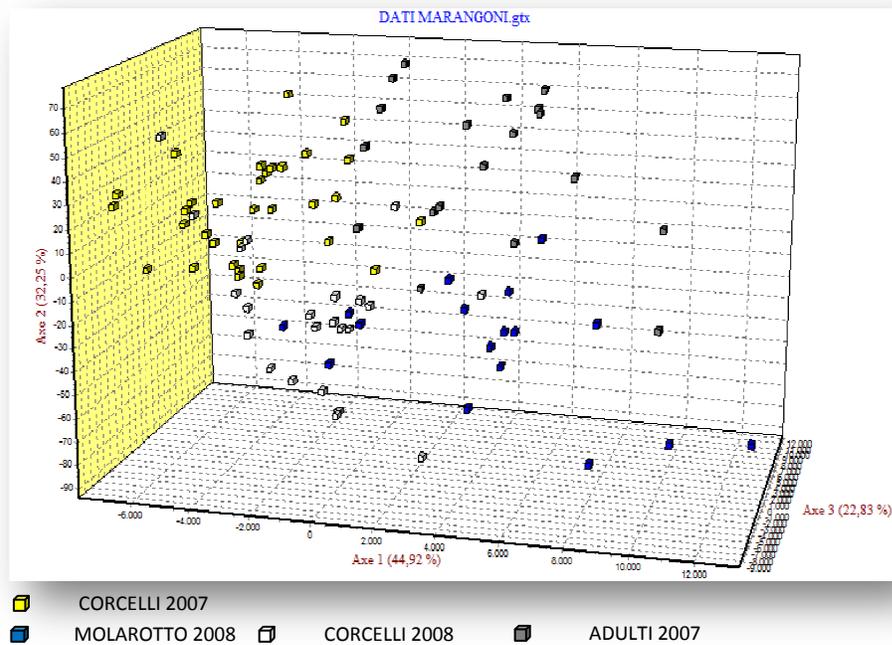


FIGURA 28 . Grafico dell'AFC che mostra la differenziazione genetica tra le diverse popolazioni

È possibile osservare come le popolazioni di Adulti 2007 e molarotto 2008 possiedono una maggior quota di variabilità rispetto alle altre due, in quanto i diversi individui si disperdono maggiormente nel grafico, mentre le due popolazioni appartenenti alla colonia di Corcelli tendono a formare un gruppo più compatto.

In tabella 23 sono mostrati i risultati relativi al Linkage Disequilibrium tra tutte le coppie di markers nelle 4 popolazioni esaminate. In nessun caso viene raggiunta la soglia di significatività ($P < 0.00125$), indicando una associazione casuale tra gli alleli dei diversi polimorfismi.

In tabella 24 sono mostrate le distanze genetiche $\Delta\mu^2$. È possibile osservare che le popolazioni con la distanza genetica più bassa sono la popolazione di Corcelli 2007 con quella degli Adulti 2007, mentre le due popolazioni che risultano più distanziate tra di loro sono Corcelli 2007 e Molarotto 2008.

Markers	CORCELLI 2007	MOLAROTTO 2008	CORCELLI 2008	ADULTI 2007
PcT1 - PcD2	0.3538	0.4350	1.0000	1.0000
PcT1 - PcT3	0.4513	1.0000	1.0000	1.0000
PcT1 - PcT4	0.2763	1.0000	1.0000	1.0000
PcT1 - PcD5	0.2113	0.6938	0.6450	1.0000
PcD2 - PcT3	0.0563	0.3050	1.0000	1.0000
PcD2 - PcT4	0.0175	0.0450	0.1550	0.4900
PcD2 - PcD5	0.7363	0.9200	0.4775	0.3850
PcT3 - PcT4	1.0000	0.1325	1.0000	1.0000
PcT3 - PcD5	0.5600	1.0000	0.5463	0.5938
PcT4 - PcD5	0.7825	0.0875	0.3438	0.8438

Tabella 23. P-values relativi all'analisi del Linkage Disequilibrium tra le coppie di loci per tutte le popolazioni analizzate. Il valore di significatività corretto è pari a $P < 0.00125$.

	Corcelli 2007	Molarotto 2008	Corcelli 2008
Molarotto 2008	0.0698		
Corcelli 2008	0.0163	0.0361	
Adulti 2007	0.0138*	0.0406	0.0279

Tabella 24. Matrice di distanze genetiche $\Delta\mu^2$ (Goldstein et al., 1995).

Tale risultato è stato confermato con le distanze genetiche di Reynolds et al. (1983), mostrate in tabella 25.

	Corcelli 2007	Molarotto 2008	Corcelli 2008
Molarotto 2008	0,0429		
Corcelli 2008	0,0252	0,0287	
Adulti 2007	0,0242*	0,0301	0,0287

Tabella 25. Matrice di distanze genetiche di Reynolds et al. (1983)

Mentre per quanto riguarda le distanze di Nei (tabella 26) le popolazioni che risultano meno distanti tra loro sono Corcelli 2007 e Corcelli 2008.

	Corcelli 2007	Molarotto 2008	Corcelli 2008
Molarotto 2008	0.1451		
Corcelli 2008	0.0791	0.0859	
Adulti 2007	0.0878	0.0980	0.0918

Tabella 26. Matrice di distanze genetiche di Nei (1972).

Tutte e tre le matrici di distanza genetica sono state utilizzate per il calcolo degli alberi filogenetici mediante il metodo del *Neighbor Joining*, mostrati nelle figure 29, 30 e 31. I risultati sono concordanti, in quanto in tutti i casi è possibile osservare due cluster, uno formato dalla popolazione di Affogati e Corcelli 2007 e l'altro dalle popolazioni di Molarotto 2008 e Corcelli 2008.

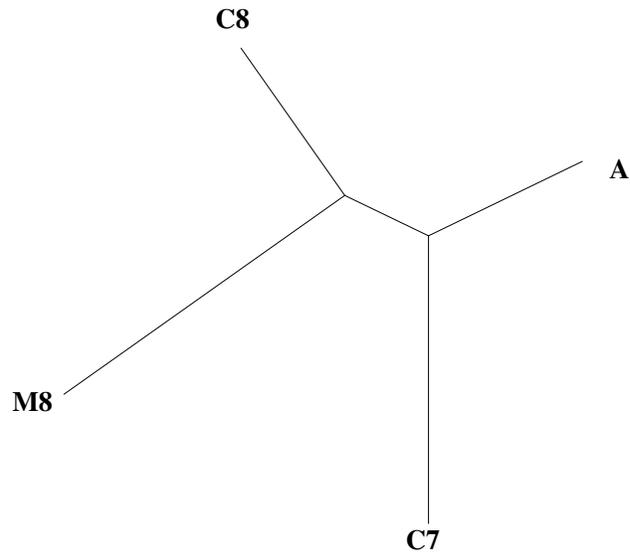


Figura 29. Albero genetico costruito dalle distanze di Reynodsi (1983).

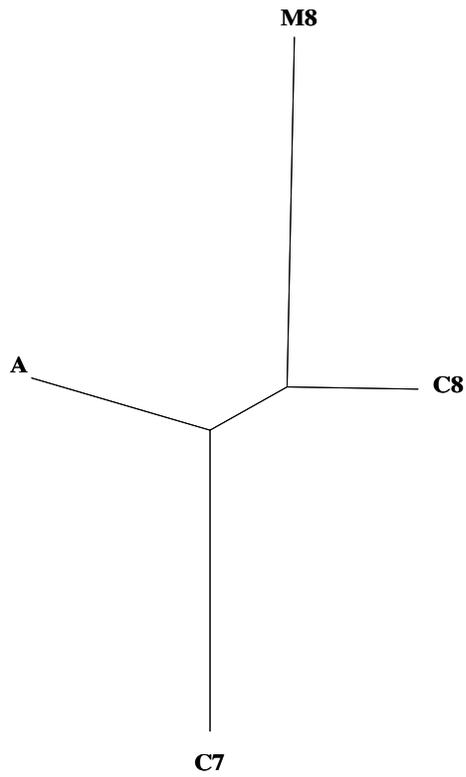


Figura 30. Albero genetico costruito con le distanze di Nei (1972).

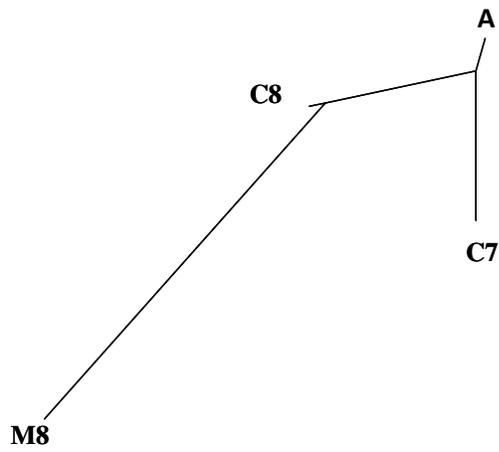


Figura 31 Albero genetico Neighbor Joining costruito con le distanze genetiche $\Delta\mu_2$ (Goldstein et al., 1995).

L'analisi della struttura di popolazione non ha identificato stratificazione tra le popolazioni analizzate, per cui è ragionevole pensare che non siano delle popolazioni geneticamente distinte. La configurazione più probabile derivata dall'analisi dei valori del $\ln P(D)$ è $K=1$ (figura 32).

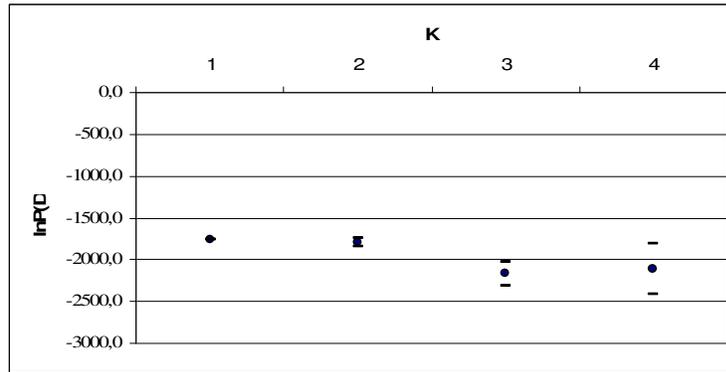


Figura 32. $\ln P(D)$ per ogni valore di K con relativa deviazione standard.

Nei grafici relativi alle analisi eseguite con K che varia da 2 a 4 infatti non è possibile identificare cluster separati (figura 33). Il grafico si presenta come un fittissimo istogramma in cui a ciascuno dei 88 individui corrisponde una sottile barra verticale, ripartita in K colori. Ogni colore rappresenta la probabilità (Q) che ogni singolo individuo ha di appartenere ad uno dei due cluster. In particolare, in questo grafico, gli individui sono disposti lungo l'asse delle ascisse in base all'ordine crescente/decrecente di Q .

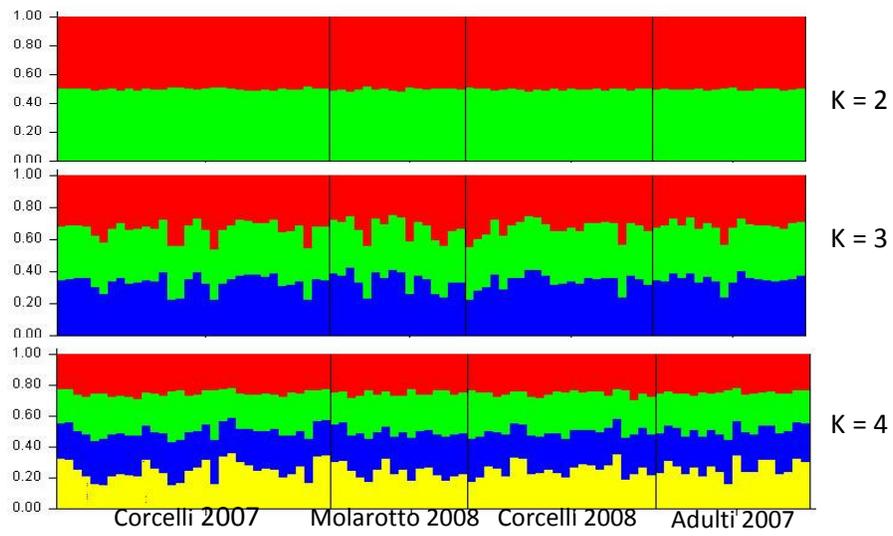


Figura 12. Risultati dell'analisi eseguita con STRUCTURE utilizzando vari K.

8 DISCUSSIONE

Questo lavoro ha messo in evidenza che la popolazione di marangoni daciuffo delle colonie presenti nel nord est della Sardegna non presentano differenziazione genetica per cui possono essere considerate un'unica popolazione panmittica. Lo studio è stato effettuato su pulli di due colonie differenti presenti nell'isola di Corcelli nell'arcipelago di La Maddalena e nell'isola di Molarotto distante circa 50 km in linea d'aria utilizzando come marcatori genetici i microsatelliti.

L'utilizzo dei microsatelliti rispetto al DNA mitocondriale come marcatori genetici è stato preferito in quanto è stato visto essere maggiormente discriminante. Studi effettuati sul cormorano a doppia cresta (*Phalacrocorax auritus*) effettuati utilizzando come marcatore il mtDNA non hanno messo in evidenza differenze genetiche tra le popolazioni migratorie e non migratorie (Waits et al., 2003) mentre l'utilizzo di microsatelliti altamente polimorfici ha permesso di mettere in evidenza una differenziazione genetica tra popolazioni migranti e non migranti (Green et al., 2006).

I primers utilizzati per l'amplificazione dei microsatelliti in questo studio sono stati disegnati su una specie filogeneticamente vicina, il *Phalacrocorax carbo*, e testato sul *Phalacrocorax aristotelis* da Piertney e coll. (1998). Gli stessi primers sono stati utilizzati per lo studio di popolazioni di *Phalacrocoracidi* da numerosi autori (*Phalacrocorax auritus*: Green et al., 2006; *Phalacrocorax carbo*: Goostrey et al., 1998; *Phalacrocorax harrisi*: Duffie et al., 2009). Goostrey et al. (1998) definirono la popolazione del *Phalacrocorax carbo* europei una popolazione non panmittica in quanto potevano essere evidenziate alcune piccole ma significative differenze sia intra che interpopolazione. Duffie et al. (2009), studiando alcune popolazioni del cormorano atterro (*Phalacrocorax harrisi*), hanno evidenziato differenziazione genetica tra colonie dello stesso arcipelago, distanti anche meno di 15 chilometri. I dati di questa tesi, ottenuti con gli stessi microsatelliti utilizzati da Goostrey et al. (1998) non mostrano significativa differenziazione genetica tra le popolazioni dell'isola di Corcelli e di Tavolara. La differenza con gli studi condotti da Duffie et al. (2009) è sicuramente dovuta al fatto che la specie in oggetto presenta ali ridotte che lo rendono inabile al volo, per cui viene impedisce il flusso genico. Guyot (1993) rivelò, studiando la dispersione dei giovani e degli immaturi di marangone, la presenza di animali inanellati in Corsica nelle isole dell'arcipelago toscano, a oltre 100 km di distanza che rinforza i risultati

ottenuti in questa tesi sullo scambio genico tra le diverse colonie del nord est della Sardegna. L'albero Neighbor joining calcolato per i quattro gruppi analizzati mostra una clusterizzazione del gruppo di Corcelli 2007 e degli adulti da una parte e di Corcelli 2008 e Molarotto 2008 dall'altra. Questo dato rinforza ulteriormente l'ipotesi che la popolazione del nord est della Sardegna sia una popolazione panmittica in quanto l'analisi effettuata sui pulli di un dato anno mette in evidenza proprio l'omologia genetica tra colonie diverse nella stessa annata riproduttiva suggerendo uniformità della popolazione riproduttiva.

GRIFONE



1 INTRODUZIONE

Regno	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Classe	Aves
Sottoclasse	Neornithes
Ordine	<u>Accipitriformes</u>
Famiglia	Accipitridae
Sottofamiglia	Aegyptiinae
Genere	<u>Gyps</u>
Specie	G. fulvus
Sottospecie	G. f. fulvus

Gli avvoltoi nel mondo sono rappresentati da 22 specie, appartenenti all'ordine degli *Accipitriformes*, distribuite nel Vecchio Mondo (Europa, Africa e Asia) e con 15 specie tra cui il Grifone e a quello dei *Cathartiformes*, distribuiti nel Nuovo Mondo (America del Sud e del Nord) con 7 specie tra cui il Condor delle Ande e Condor della California. I *Catartidi* o avvoltoi del Nuovo Mondo hanno un'origine molto antica e sono imparentati con i *Ciconiiformes* con i quali condividono alcune caratteristiche anatomiche, morfologiche ed etologiche. L'aspetto simile e le abitudini comuni degli avvoltoi del Vecchio e del Nuovo Mondo rappresentano un caso significativo di convergenza evolutiva, cioè di un processo evolutivo che ha consentito ai due gruppi, pur distanti geneticamente, di raggiungere gli stessi livelli di specializzazione e gli stessi adattamenti ecologici, finalizzati allo sfruttamento di carogne di animali selvatici e domestici, prevalentemente ungulati. In Europa sono presenti soltanto 4 specie di avvoltoi, tutti appartenenti alla famiglia degli *Aegyptiinae*: il Grifone (*Gyps fulvus*), l'Avvoltoio monaco (*Aegypius monachus*), il Capovaccaio (*Neophron percnopterus*) e il Gipeto (*Gypetus barbatus*). Queste specie, distribuite intorno al Mediterraneo, hanno raggiunto nel corso della loro evoluzione differenti livelli di specializzazione alimentare sfruttando le differenti parti delle carogne di ungulati domestici e selvatici: l'Avvoltoio monaco, il più grande, riesce ad intaccare con il becco robusto le parti più dure; i Grifoni, più numerosi, ne utilizzano in prevalenza le parti molli accessibili dagli orifizi naturali, il Capovaccaio, il più piccolo e con un becco sottile, si accontenta dei frammenti ignorati dalle specie più grandi e il Gipeto infine, con la testa e il collo completamente ricoperti di penne, chiude la catena di "smontaggio" ingoiandone le ossa (Aresu M. and Schenk H. 2003b).

1.1 Morfologia

Il grifone è caratterizzato dalle grandi dimensioni del corpo e dalla ampia apertura alare; il suo peso può variare dai 6,5 ai 12 kg (anche 15 kg) e l'apertura alare va dai 240 ai 280 cm. Ha il collo lungo privo di penne e la testa nuda, entrambi ricoperti di un finissimo e corto piumino bianco-sporco e lanoso con un collare bianco di piume setolose negli adulti. Nei giovani e negli immaturi il collare è marrone, costituito da lunghe penne lanceolate. La coda è leggermente graduata e formata da 12 timoniere. Il piumaggio è generalmente di tinta marrone chiaro-giallastro negli adulti, più rossiccio o mattone, con penne attraversate longitudinalmente da una stria chiara, nei giovani e immaturi. Negli adulti le grandi copritrici secondarie sono scure al centro, bordate da un ampio margine chiaro e hanno forma piuttosto tondeggianti. Nei giovani o immaturi le stesse penne sono uniformemente scure con apici più appuntiti. Le zampe sono marrone grigiastro (giovani) o grigie (adulti), ricoperte da scaglie a reticolo; gli artigli sono ben sviluppati ma smussati all'apice (Aresu e Schenk, 2003b). Non si riscontrano differenze significative tra i sessi.

1.2 Habitat

L'*habitat* di nidificazione del Grifone in Sardegna è costituito da aree costiere (da 40m a 300m sul livello del mare nel Bosano e Algherese) e da zone di collina e montagna sino a quote di circa 1250 m (Supramonte di Oliena sino agli anni '80 del secolo scorso), generalmente poco antropizzate e ricche di pareti rocciose (rocce vulcaniche, calcaree, graniti, scisti) con terrazze, cenge e cavità. 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 (Donazar, 1993). Tutti i siti attuali 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 nordoccidentale 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 e Thiesi, Putifigari, caratterizzati 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 (Sulcis-Iglesiente, Gennargentu, Ogliastra, Sarrabus-Gerrei).

1.3 Aspetti riproduttivi

E' una specie sociale che vive in monogamia permanente e raggiunge la maturità sessuale dopo il quinto-sesto anno. Le coppie eseguono i "voli nuziali" (novembre-dicembre) vicino ai siti di riproduzione: volano vicini uno sopra l'altro oppure appaiati eseguendo spirali e scivolate lungo le pareti rocciose. L'accoppiamento (fine dicembre-gennaio) avviene nelle vicinanze del nido preceduto da cerimonie che comprendono inchini, arruffamento delle penne dorsali e movimenti del becco da parte del maschio. Nidificano in colonie posizionate su pareti rocciose sia sul mare sia all'interno. 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'imboccature di piccole caverne o su cenge più o meno protette da tetti di roccia; sono costruzioni molto semplici, poco voluminose, costituite da un ammasso di rami, erbe secche e foglie oppure lana di pecore e altri materiali ottenuti da boli rigurgitati. La costruzione è opera di entrambi i partner e il più delle volte si tratta di un restauro, nel caso di rioccupazione di un nido dell'anno precedente. Sono facilmente individuabili per il colore delle deiezioni che si accumulano sulle rocce sottostanti. La deposizione dell'uovo (due uova in un nido sono eccezionali) inizia a gennaio e prosegue fino a marzo; l'uovo è bianco, ellittico e talvolta assume un colore giallino a causa dei pigmenti assorbiti dal materiale del nido. Viene incubato per 54 giorni da entrambi i componenti della coppia e non viene mai lasciato scoperto per lunghi periodi. 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 80 giorni è delle stesse dimensioni dell'adulto e si differenzia per il piumaggio e il collarino scuro, il collo e la testa di un bianco candido, becco e iride neri. A 4-5 mesi ha ormai imparato a volare per lunghi tratti (luglio-settembre). I giovani vengono nutriti dai genitori anche successivamente all'involo mentre imparano a perlustrare il territorio in cerca di cibo e ad avvicinarsi alla carcassa con gli altri membri della colonia. Il periodo critico per la sopravvivenza dei piccoli è quello immediatamente successivo all'involo (Genero et al., 1996).

1.4 Abitudini alimentari

Il grifone si ciba esclusivamente di carcasse. La ricerca del cibo avviene in volo planato (possono così percorrere centinaia di chilometri con un minimo dispendio energetico) e ogni individuo si tiene a contatto visivo con gli altri. Individuano le carogne sfruttando anche la presenza di altri uccelli (corvidi soprattutto), di volpi e cani rinselvatichiti che fungono da "indicatori". Una volta a terra il pasto è preceduto da scontri che hanno lo scopo di stabilire quali saranno gli uccelli che mangeranno per primi; la dominanza è determinata dal grado di fame dei soggetti. I dominanti si impongono sugli altri con posture particolari ed emissione di soffi e altri suoni; uno dei più vistosi comportamenti ritualizzati è il "passo di parata" durante il quale il grifone avanza verso la preda con il collo teso e le penne scapolari arruffate mostrando alternativamente l'artiglio aperto dell'una e dell'altra zampa. Una volta conquistata una posizione sulla carogna il soggetto assume la "postura del sovrano" con le ali aperte. Se l'animale è morto da poco i grifoni iniziano il pasto dagli orifizi naturali (la bocca, l'ano e gli occhi), mentre se è in decomposizione strappano con facilità la pelle. Viene mangiato tutto con eccezione del pelo e delle ossa più grandi che restano letteralmente pulite. Si ingozzano al massimo e talvolta per potersi involare devono rigurgitare una parte del pasto e in ogni caso l'involo può essere difficoltoso in mancanza di punti sopraelevati per il decollo. In Sardegna le risorse alimentari sono costituite quasi esclusivamente dalle carogne di ungulati domestici (bovini, suini, equini, ovini e caprini), allevati principalmente allo stato brado. Gli ovini e i caprini rappresentano oltre l'80% della base alimentare di questo necrofago obbligatorio. Il grifone dipende dall'uomo per l'alimentazione e ha risentito della recente evoluzione nelle tecniche di allevamento del bestiame. Il pasto non dura

molto (pecore di medie dimensioni vengono terminate in meno di trenta minuti da 20-30 avvoltoi); dopo essersi nutriti amano bere e lavarsi il piumaggio che necessariamente si imbratta nel contatto con le carogne. Dopo un pasto abbondante possono stare senza mangiare per diversi giorni (il fabbisogno alimentare medio giornaliero si aggira sui 500 grammi); la specie è adattata a digiunare per 2 e 3 settimane.

1.5 Eco-etologia

In Sardegna delle 3 grandi specie di avvoltoi presenti fino a metà del 20esimo secolo (*Aegypius monachus*, *Gypaetus barbatus* and *Gyps fulvus*), solo il Grifone è sopravvissuto fino ad oggi. Figura nel Libro Rosso degli Animali d'Italia come specie in pericolo, mentre è stato classificato specie in pericolo critico nell'isola. La specie è particolarmente protetta dalla normativa regionale (L.R. n. 23/1998), nazionale (Legge n. 157/1992) e comunitaria (Direttive "Uccelli selvatici" e "Habitat"). La Sardegna adotta provvedimenti prioritari atti ad istituire un regime di rigorosa tutela del suo habitat (articolo 5, comma 3, L.R. n. 23/1998) (Aresu e Schenk, 2003a). L'areale del grifone in Sardegna comprendeva, intorno al 1945, tutti i sistemi montuosi e la popolazione veniva stimata tra i 1000 e i 1400 esemplari, progressivamente ridottosi ai 100-140 esemplari del 1975, soprattutto a causa dell'uso di sostanze tossiche (lotte contro le cavallette, antimalarica, contro i predatori). Determinante è stato l'uso dei bocconi avvelenati alla stricnina nella lotta dei pastori contro volpi e cani randagi che possono arrecare danni notevoli al patrimonio zootecnico (Schenk, 1976). Dopo una riduzione progressiva sino ai 65-75 esemplari degli anni '80, la specie ha raggiunto alla fine del 1996 una consistenza di 42 coppie territoriali con circa 120 individui, concentrati nella Sardegna nord-occidentale, grazie a programmi di conservazione e di ripopolamento con animali di provenienza spagnola e francese, appartenenti alla sottospecie dei grifoni presenti nell'isola (*Gyps fulvus fulvus*). Negli ultimi 10 anni la situazione è diventata nuovamente critica in relazione ad un temporaneo (1997-1998) ritorno dell'uso delle esche avvelenate utilizzate illegalmente per controllare volpi e cani randagi. Dalle 42 coppie si è così passati a 23 nel 1999, di cui 19 nel Bosano e 4 nell'Algherese. Tra il 2000 e il 2006, è stata registrata una buona ripresa nel Bosano con 30 coppie territoriali nel 2006, mentre nell'Algherese si è verificato un ulteriore tracollo facendo registrare soltanto la presenza di 1-2 coppie. Tra luglio 2006 e aprile 2007 sono venuti a mancare nel Bosano 10-11 coppie territoriali e un totale di 35-40

esemplari. Molto probabilmente anche questa consistente perdita di grifoni va attribuita ad avvelenamenti/intossicazioni. Ad ottobre 2007 erano presenti in Sardegna circa 60-65 esemplari distribuiti esclusivamente nei territori tra Bosa, Montresta (NU), Villanova Monteleone (SS) e lungo la costa alta dell'Algherese, ove sono state censite all'inizio del ciclo riproduttivo 21-22 coppie territoriali, valori che corrispondono alla situazione di circa 20 anni fa (Schenk et al., 2008). Raggiungono un'età media di 30 anni. Vivono in vaste aree aperte con scarsa vegetazione, in particolar modo preferiscono pareti rocciose in aspre zone montane o coste marine rocciose per la nidificazione e per la presenza di correnti termiche o comunque ascensionali per il volo planato. Questi animali trascorrono la notte generalmente su rocce inaccessibili dove si raccolgono in gruppi e vanno a costituire i "dormitori" (roost). Le cause del declino del Grifone sono da attribuire ad un complesso di fattori. Il significativo calo del tasso di mortalità del bestiame registrato in Sardegna dalla fine degli anni '40, soprattutto in relazione al miglioramento delle condizioni igienico sanitarie nel settore zootecnico e alla progressiva diminuzione della pastorizia allo stato brado, ha determinato una minore disponibilità alimentare per questi animali. La causa principale delle massicce morie di avvoltoi sono state soprattutto le "sostanze tossiche" (stricnina, cianuro, arsenito di sodio, DDT) utilizzate nell'ambito della lotta contro le volpi e i cani inselvatichiti, in quella contro le cavallette e durante la campagna antimalarica del periodo post-bellico. A queste si sono poi aggiunte la persecuzione diretta da parte dei bracconieri e collezionisti di trofei e di uova, la restrizione degli habitat adatti alla riproduzione e alla ricerca del cibo (costruzione di dighe, strade ed elettrodotti) e un crescente impatto antropico. Attualmente le maggiori minacce per l'unica popolazione sarda di Grifone nel Bosano sono rappresentate da un ritorno temporaneo dall'uso delle esche avvelenate nella lotta dei pastori contro volpi e cani e dall'incremento dei disturbi antropici diretti e indiretti nelle immediate vicinanze dei nidi causati da: clamore delle battute di caccia grossa, caccia fotografica, escursionismo, taglio del legname, arrampicata, parapendii, curiosi, ricerca scientifica (Aresu e Schenk, 2003b).

2 MATERIALI E METODI

Gli 8 campioni utilizzati per lo studio provengono da individui che sono ospitati presso il Centro Recupero Fauna Selvatica di Bonassai (Alghero) in Sardegna.

Si tratta di 5 soggetti ricoverati permanentemente nel Centro in quanto considerati individui irrecuperabili a causa delle gravi lesioni subite e 3 soggetti che sono stati ricoverati momentaneamente ed in seguito liberati sulle colline di Bosa (Fig. 34)

Da tutti e 8 i soggetti sono stati prelevati, dalla vena ulnare ,1 ml di sangue in provette vacutainer contenenti EDTA come anticoagulante.

2.1 Determinazione del sesso

Sul DNA estratto dall'unico campione di sesso noto, cioè l'unico esemplare che era stato visto deporre l'uovo, è stata testata una coppia di oligonucleotidi descritti in letteratura per la determinazione del sesso in altre specie avicole che ha permesso di mettere in evidenza un polimorfismo sesso specifico presente in un introne del gene Chromobox Helicase DNA binding domain 1 (CHD1) presente in singola copia su entrambi dei due cromosomi sessuali W e Z (Ellegren, 1996). Gli oligonucleotidi testati sono complementari a una regione, altamente conservata tra le varie specie avicole, che permette di amplificare una regione che presenta spesso polimorfismi di lunghezza tra i due cromosomi sessuali (Griffiths et al., 1996).

Marker	Sequenza Primer	TA °C
CHD	F:TCCCAAGGATGAGRAAYTG R:TCTGCATCGCTAAATCCTTT	51°C

La reazione di amplificazione è stata eseguita come già descritto precedentemente.

Il profilo termico è stato il seguente:

DENATURAZIONE INIZIALE	94°C	2'	} 30cicli
DENATURAZIONE	95°C	45''	
ANNEALING	51°C	45''	
ESTENSIONE	72°C	1'	
ESTENSIONE FINALE	72°C	5'	

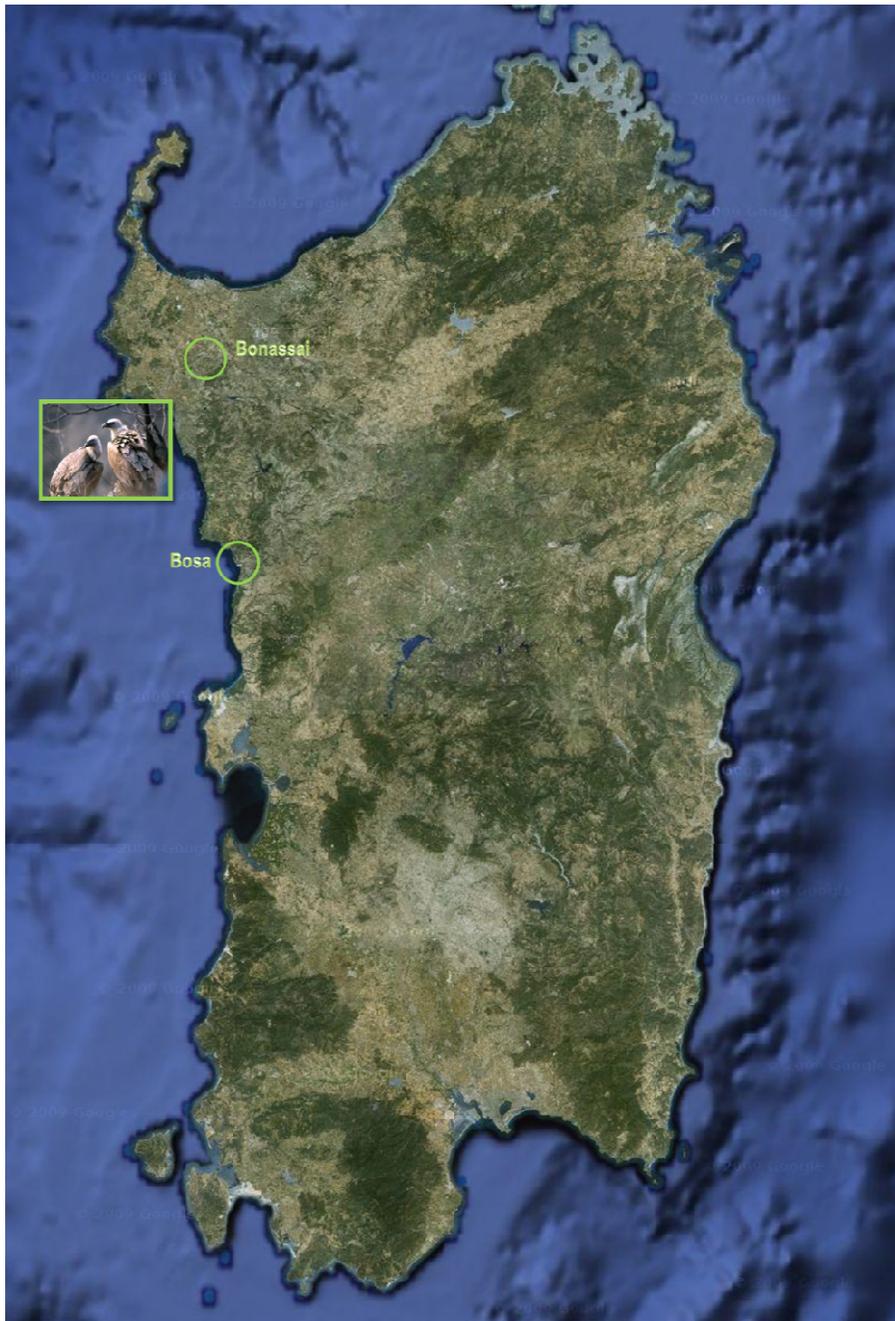


FIGURA 34. Localizzazione dei siti di provenienza dei campioni di grifone utilizzati in questo lavoro.

3 RISULTATI

I risultati, come mostrato nel gel elettroforetico della figura 35, hanno permesso di discriminare i campioni provenienti da individui di sesso maschile da quelli di sesso femminile. Negli individui di sesso maschile, omogametico, è presente una sola banda mentre in quelli di sesso femminile, eterogametico, si possono evidenziare due bande: una corrispondente all'amplificato della sequenza presente sul cromosoma Z e una sulla sequenza presente sul cromosoma W. In questa specie quindi il primo introne di questo gene presenta una delezione nella copia presente nel cromosoma W che rende l'amplificato più veloce nella elettroforesi su gel rispetto all'amplificato sul cromosoma Z che invece non ha questa delezione.

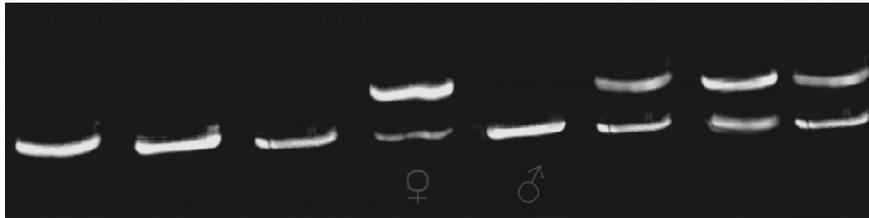


FIGURA 35. Esempio di gel elettroforetico mostrante i risultati dell'amplificazione del gene CHD1 in campioni di DNA di grifone.

L'analisi su gel degli amplificati ci ha permesso la discriminazione del sesso degli 8 individui presi in esame. 4 sono risultati di sesso femminile e 4 di sesso maschile.

3.1 Analisi dei microsatelliti

I campioni del nostro studio sono stati analizzati tramite l'utilizzo di 5 microsatelliti (tabella 27).

La reazione di amplificazione è stata eseguita come già descritto precedentemente.

Marker	Sequenza Primer	T.A. °C	Origine
Gf11A4	F:GATCCCTTCCAACCGAAAAT; R:TGGTGACCAACGGAAGTGTG	51°C	Gyps fulvus
Gf3H3	F:GTAGAATAATTTGCTCCTGG; R:GTGAAGGCACCTCATAGACA	56°C	Gyps fulvus
Gf3F3	F:GATCTTTCCCTTCTGTG; R:TTCGTGCAGTGATGCTGGTG	57°C	Gyps fulvus
Gf8G1	F:TGAGCAGGTGAGTCCAGAAG; R:GCTCTCCTGCATCTTGCAT	56°C	Gyps fulvus
Gf9C1	F:GGTGGACATTACATACTG; R:CAAGGAATCTGGACTACTAA	54°C	Gyps fulvus

TABELLA 27. Generalità sui markers microsatelliti utilizzati

Il profilo termico è stato il seguente:

DENATURAZIONE INIZIALE	94°C	2'	} 34cicli
DENATURAZIONE	95°C	30''	
ANNEALING	X°C	45''	
ESTENSIONE	72°C	45''	
ESTENSIONE FINALE	72°C	5'	

X= temperatura specifica per ogni primers

Visto il numero esiguo dei campioni si è proceduto con l'analisi degli amplificati microsatelliti tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide, questo, a differenza del gel di agarosio, permette la separazione di piccoli frammenti di DNA (da 5 a 500 bp). Il gel di poliacrilammide viene realizzato su un supporto elettroforetico verticale. È costituito dalla polimerizzazione, mediante la formazione di legami crociati, tra due monomeri, l'acrilammide e la bisacrilammide. Tale polimerizzazione viene indotta dalla formazione di radicali liberi generati dalla decomposizione chimica dell'AMMONIO PERSOLFATO in presenza di tracce di ossigeno. Viene quindi aggiunto alla miscela necessaria alla formazione del gel, il composto N',N',N',N'-TETRAMETILENDIAMMINA (TEMED), uno stabilizzatore di radicali liberi. Le proprietà fisiche del gel e le dimensioni dei pori reticolati che si vengono a formare durante la preparazione, dipendono dalla concentrazione di poliacrilammide nel gel, più acrilammide è presente e più piccolo sarà il diametro del poro e delle maglie del gel. Per la miscela è stata utilizzata una soluzione di acrilamide al 30% composta da 29 parti di acrilammide e 1 parte di N-N'metilene bis acrilamide, una soluzione tampone di TRIS, Acido Borico ed EDTA (TBE) a pH 8 all'1%, ammonio persolfato al 10% , 0, 35% di TEMED e acqua bi distillata. La soluzione così ottenuta è stata versata nel

supporto verticale, costituito da 2 vetri di diversa grandezza divisi da dei separatori in plastica, vi è stato immerso il pettine per permettere la formazione dei pozzetti di deposizione del campione. Appena il gel si è polimerizzato, in ogni pozzetto sono stati caricati 10 μ l di amplificato miscelato con 2 μ l di loading buffer (0,25% blu di bromofenolo, 0,25% xilene cianolo, 40% (w/v) saccarosio in acqua) , si è quindi immerso il supporto con il gel, all'interno della camera elettroforetica verticale che conteneva lo stesso tampone della soluzione di acrilamide (TBE 1%) e quindi sottoposto ad una differenza di potenziale di 60 V per 4 ore. Finita la corsa elettroforetica, il gel è stato messo a colorare in una soluzione di EtBr ad una concentrazione di 10 mg/ml per circa 30 minuti. Il risultato dell'amplificazione dei micro satelliti è stata resa visibile sottoponendo il gel a luce ultravioletta, si è quindi potuto riscontrare la presenza di una o due bande per individui omozigoti o eterozigoti rispettivamente.

4 RISULTATI

Attraverso l'analisi del gel, è stato quindi possibile discriminare la presenza di diversi alleli per ogni locus micro satellitare (Figura 36).

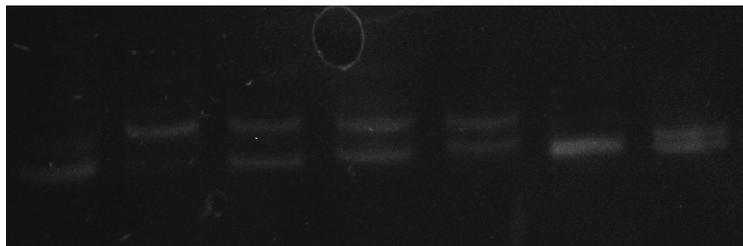


FIGURA 36. Esempio di gel elettroforetico su supporto di poliacrilammide.

Tutte le 5 coppie di primers selezionate hanno amplificato prodotti specifici e polimorfici nel DNA di grifone. Solo 3 coppie di microsatelliti sono risultate polimorfiche, con un numero di alleli che va da 4 a 7.

Visto il numero esiguo di campioni sono state eseguite solo le analisi di variabilità genetica intrapopolazioni, andando quindi a determinare l'eterozigotità osservata e l'eventuale deviazione da quella attesa secondo la legge di Hardy-Weimberg.

Locus	N° alleli	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value
Gf11A4	7	0.50000	0.89167	0.02900
Gf3H3	5	0.75000	0.82500	0.27625
Gf8G1	4	0.37500	0.77500	0.12143

TABELLA 28. Frequenze alleliche osservate e attese secondo la legge di Hardy – Weimberg.

5 DISCUSSIONE

Uno dei principali problemi nei programmi di reintroduzione è di conservare la variabilità genetica nelle popolazioni neo formate. Infatti la deriva genica che interviene nelle popolazioni reintrodotte, con conseguenze simili a quelle dell'effetto fondatore, spesso risultano in una riduzione della diversità genetica (Nei et al., 1975; Robichaux et al., 1997). Un metodo da utilizzare per limitare l'effetto negativo del piccolo numero di fondatori durante le reintroduzioni è di massimizzare la diversità genetica del gruppo fondatore che potrebbe essere ottenuta mediante un monitoraggio genetico a priori (Earnhardt 1999). Infatti per l'incremento del successo a lungo termine di tutti i programmi di reintroduzione viene evitato accuratamente la possibilità di inbreeding tra gli individui reintrodotti (Gautshi et al., 2003a). La scelta di fondatori con una sufficiente diversità genetica è quindi cruciale per permettere il pieno successo della reintroduzione e dipende dallo status genetico della popolazione nativa e reintrodotta, di cui deve essere conosciuta anche la storia e la struttura presente nella popolazione per poter determinare la miglior sorgente per gli individui da reintrodurre.

Un secondo metodo per poter diminuire la perdita di diversità genetica in una popolazione sottoposta a interventi di reintroduzione è di cercare di creare dei corridoi di migrazione con colonie vicine e creare una rete di popolazioni che possano scambiare materiale genetico tra loro (Latches e Rhodes, 2005). In teoria un relativamente basso numero di individui migranti, uno per generazione secondo Newman e Tallmon,(2001), sarebbe sufficiente per bloccare la perdita di diversità genetica in piccole popolazioni (Keller et al., 2001) e diminuire l'effetto dell'inbreeding in popolazioni piccole o frammentate (Couvet 2002). Il monitoraggio genetico di popolazioni piccole o soggette a interventi di reintroduzione è quindi utile per valutare l'effetto fondatore, stimare il flusso genico tra popolazioni reintrodotte e native e valutare gli effetti a lungo termine della diversità genetica. Il primo dato che abbiamo ottenuto negli studi di questa specie è stato quello della possibilità di determinare la genetica di un animale mediante l'utilizzo di penne perse durante la normale attività quotidiana. Il primo carattere di cui è stata valutata la possibilità di determinare è stato il sesso. I grifoni infatti come la maggior parte degli avvoltoi non presenta dimorfismo sessuale nemmeno in età adulta o in periodo riproduttivo. È di basilare importanza quindi, dato la perenne formazione di coppie perenni che si conosca il sesso degli individui reintrodotti. L'importanza della

conoscenza del sesso dell'animale è stata messa recentemente alla ribalta dal tentativo fallito di reintroduzione del gipeto (*Gypetus barbatus*) nel territorio del Supramonte, al centro della Sardegna. Il fallimento di questo tentativo di reintroduzione è stato determinato dalla presenza di bocconi avvelenati, utilizzati da gli allevatori per debellare la predazione degli animali allevati da parte di volpi e cani randagi. I tre animali introdotti sarebbero dovuti essere due di sesso maschile e uno di sesso femminile. Solo dopo la loro morte, in seguito a necropsia si è stabilito che i tre gipeti introdotti erano tutti di sesso maschile.

I risultati di questo lavoro hanno mostrato come anche nel grifone, similmente ad altre specie avicole, sia possibile determinare il sesso in forma veloce e traumatica utilizzando le penne perse per ricambio fisiologico da cui estrarre il DNA da analizzare mediante PCR. In tutti gli animali è stato possibile ottenere un pattern di amplificazione sesso specifico a partire dal bulbo di una sola piuma.

Per la valutazione genetica sono stati utilizzati come marcatori i microsatelliti, sia per la loro attitudine ad essere informativi circa differenze anche a breve termine tra individui, sia perché utilizzati in un precedente lavoro riguardante lo studio genetico su 10 individui appartenenti alla popolazione iberica di questa specie (Mira et al., 2002). Lo studio della popolazione di grifoni della penisola iberica è stato effettuato studiando la variabilità di cinque sequenze microsatellitari Gf11A4, Gf3H3, Gf8G1, Gf3F3 e Gf9G11, che, in questa popolazione si presentavano con 7, 5, 2, 2 e 9 alleli rispettivamente. Dai dati ottenuti negli 8 grifoni sardi studiati in questo lavoro sul numero degli alleli, sembrerebbe che la popolazione sarda presenti un minor grado di diversità genetica della popolazione iberica. I loci Gf11A4, Gf3H3 presentavano 7 e 5 alleli rispettivamente mentre Gf8G1 presentava quattro alleli, due in più di quelli evidenziati nella popolazione portoghese e gli altri due microsatelliti sono risultati monomorfici nella popolazione sarda. Si potrebbe ipotizzare che i due alleli in più evidenziati nel gene Gf8G1 degli individui sardi potrebbero essere geni appartenenti alla popolazione locale autoctona di grifoni. La deficienza di diversità genetica potrebbe essere ipotizzata dal risultato dei due geni che nella popolazione sarda si presentano in forma omozigote. Infatti, mentre nulla si potrebbe dire per quanto riguarda il locus Gf3F3 in cui la differenza di un allele tra le due popolazioni potrebbe essere casuale, suscita molti dubbi la presenza di un solo allele nella popolazione sarda contro i nove della popolazione iberica, che suggerisce una minore diversità allelica in questo marcatore, e di conseguenza una minore diversità genetica che potrebbe essere causata da deriva genica o da effetto fondatore. Questo risultato è

rinforzato anche dal fatto che dei tre marcatori polimorfici uno non è in accordo con la legge di Hardy-Weinberg, presentando una statistica di diminuzione di eterozigoti indicatore della presenza di alleli nulli, di Bottleneck, di perdita di alleli per deriva genica o di inbreeding.

In conclusione, dai dati ottenuti si può affermare di aver messo a punto un sistema di determinazione del sesso mediante analisi molecolare che permetterà in futuro di monitorizzare la sex ratio nella popolazione residente di grifoni e potrà dare un valido contributo alla conoscenza degli animali da reintrodurre nella evenienza di una nuova operazione di reintroduzione recentemente ipotizzata nei programmi di salvaguardia di questa specie nella regione Sardegna. I dati provenienti dall'analisi dei microsatelliti mostrano una diminuzione della diversità genetica della popolazione sarda di Grifoni anche se per poter affermare con più certezza questo risultato bisognerebbe studiare il genotipo di un numero più elevato di animali.

CONCLUSIONI

In conclusione il presente lavoro ha messo in evidenza come sia possibile l'utilizzo di tecniche molecolari per la valutazione dello stato di benessere di popolazioni animali soggette a disturbo antropico.

L'applicazione di queste tecniche ha permesso di valutare lo stato delle popolazioni di Muflone, Lepre, Marangone dal ciuffo e Grifone viventi nel territorio della Sardegna, dando una fotografia della situazione genetica attuale. Queste notizie potranno essere utilizzate per la valutazione dello stato di benessere delle popolazioni animali analizzate, nella previsione di interventi di salvaguardia o recupero, anche in tempi non ancora critici per il loro futuro.

BIBLIOGRAFIA

Aebischer NJ. *Immediate and delayed effects of a gale in late spring on the breeding of the Shag Phalacrocorax aristotelis*. Ibis 135:225–232.(1993)

Aebischer NJ, Potts GR, Coulson JC. *Site and mate fidelity of Shags Phalacrocorax aristotelis at two British colonies*. Ibis 137: 19–28.(1995)

Amori G, Lapini L. *Le specie di mammiferi introdotte in Italia: il quadro della situazione attuale*. In: Spagnesi M, Toso S, Genovesi P (eds). Atti III Convegno Nazionale dei Biologi della Selvaggina, Suppl. Ric. Biol. Selvaggina, XXVII: 249-267.(1997)

Amos W, Sawcer SJ, Feakers RW, Rubinstein DC. *Microsatellites Show Directional Bias and Heterozygote Instability*. Nature genetics, 13: 390-391.(1996)

Angermann R. *The taxonomy of Old WORLD Lepus*. Acta Zool. Fennica 174:17-21.(1983)

Archawaranon M. *Rapid sexing hill mynah Gracula religiosa by sex chromosomes*. Biotechnology 3: 160-164. (2004)

Aresu M and Schenk H. *Status e conservazione del Grifone (Gyps fulvus) in Sardegna*, tratto da “il Grifone in Italia”, rapporto scientifico sullo stato del Grifone (Gyps fulvus) in Italia, prodotto dal primo convegno “Il grifone in Italia” presso il Parco Natura Viva – Bussolengo (VR).(2003a)

Aresu M and Schenk H. *Il Grifone, l'unico avvoltoio rimasto in Sardegna*, pubblicazione nell'ambito del Progetto Entulzu di Bosa, la cui attuazione è stata affidata dal Comune di Bosa a Legambiente Sardegna, con il contributo finanziario della Regione Autonoma della Sardegna.(2003b)

Badyaev AV, Hamstra TL, Oh KP, Acevedo Seaman D. *Sex-biased maternal effects reduce ectoparasite induced mortality in a passerine bird*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 103:406–411.(2006)

Badyaev AV, Acevedo Seaman D, Navara KJ, Hill GE, Mendonça MT. *Evolution of sex-biased maternal effects in birds: III. Adjustment of ovulation order can enable sex-specific allocation of hormones, carotenoids, and vitamins*. J. Evol. Biol. 19, 1044–1057.(2006a)

Ballou JD. *Potential contribution of cryopreserved germ plasma to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity*. Cryobiology 29; 19-25.(1992)

136

Dott.ssa Valentina Satta – Studio della variabilità genetica di specie animali autoctone della Sardegna
Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli studi di Sassari

Balloux F, Goudet J, Perrin N. Breeding system and genetic variance in the monogamous, semi-social shrew, *Crocidura russula*. *Evolution*, 52: 1230-1235.(1998)

Balloux F, Goudet J. *Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model*. *Molecular Ecology*, 11:771–783.(2002)

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. *GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). (2003)

Benussi E. Distribuzione e stima della popolazione nidificante di *Phalacrocorax aristotelis desmarestii* (Payraudeau, 1826) nell'Adriatico settentrionale. *Atti V° Conv. It. Orn.*, Bracciano.(1992)

Booke HE. *The stock concept revisited: perspectives on its history in fisheries*. *Fisheries Research*, 43(1): 9-11.(1999)

Brichetti PA, Guyot I, Monbailliu X and Torre A. *Marangone dal ciuffo Phalacrocorax aristotelis*. In: Brichetti et al. (eds), *Fauna d'Italia XXIX. Aves*. Edizioni Calderini, Bologna 24: 147-174. (1992)

Buchanan FC, Littlejohn RP, Galloway SM, Crawford AM. *Microsatellites and associated repetitive elements in the sheep genome*. *Mamm. Genome*, 4:258-264.(1993)

Buckerell BC, Gartley CJ, Mehern KG, Crawshaw GJ, Johnson WH, Barker IK, Balke J, Coghill C, Challis JRG, Goodrowe KL. *Failure to maintain interspecific pregnancy after transfer of Dall's sheep embryos to domestic sheep*. *J. Reprod. Fertil.* 90: 387-394.(1990)

Burton C, Krebs CJ, Taylor EB. Population genetic structure of the cyclic snowshoe hare (*Lepus americanus*) in southwestern Yukon, Canada. *Molecular Ecology*; 11:1689-1701.(2002)

Cesaraccio G. *Avifauna dell'Arcipelago di La Maddalena*. 2° Quaderno Naturalistico di Italia Nostra.(1990)

Corbet GB. *The Mammals of The Palaearctic Region: A Taxonomic Review*. British Museum (Natural History) and Cornell University Press, London and Ithaca,NY.(1978)

Corbet GB. *Relationships and origins of European lagomorphs*. *Mammal Review* 16:105-110.(1986)

Cornuet JM, Luikart G. *Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data.* Genetics, 144:2001-2014.(1996)

Couvet D. *Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations.* Conserv Biol 16:369–376(2002)

Cramp S and Simmons KEL. *The Birds of the Western Palearctic, Vol. I.* Oxford: Oxford University Press. (1977)

Frank SA. *Sex allocation theory for birds and mammals.* Ann. Rev. Ecol. Syst. 21: 13–55.(1990)

Cugnasse JM. *Revision taxonomique des mouflons des îles méditerranéennes.* Mammalia 58,507-512. (1994)

Zhang D, Hewitt GM. *Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Invited review.* Molecular Ecology, 12: 563-584. (2003)

Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. *Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations.* Proc Natl Acad Sci USA, 91:3166-3170. (1994)

Dietrick W, Katz H, Lincoln SE, Shin HS, Friedman J, Dracopoli NC, Lander S. *A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses.* Genetics 131: 423-447.(1992)

Donázar JA. *Los Buitres Ibéricos. Biología y conservación.* Quercus. Madrid.(1993)

Duffie CV, Glenn TC, Vargas FH, Parker PG. *Genetic structure within and between island populations of the flightless cormorant (Phalacrocorax harrisi).* Molecular Ecology 18, 2103–2111.(2009)

Earnhardt JM. *Reintroduction programmes: genetic trade-offs for populations.* Anim Conserv 2:279–286.(1999)

Eck RV and Dayhoff MO. *Atlas of Protein Sequence and Structure.* National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.(1966)

Ellegren H. *First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds.* Proceedings of the Royal Society of London Series B 263:1635-1641.(1996)

Ellerman JR and Morrison-Scott TCS. *Checklist of Palearctic and Indian Mammals 1758 to 1946.* British Museum (Natural History), London.(1951)

138

Dott.ssa Valentina Satta – Studio della variabilità genetica di specie animali autoctone della Sardegna
Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli studi di Sassari

Excoffier L, Laval G, Schneider S. *Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis*. *Evol Bioinf Online*, 1:47-50.(2005)

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. *Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies*. *Genetics*, 164, 1567–1587.(2003)

Favre L, Balloux F, Goudet J, Perrin N. Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocodyrus russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. *Proceedings of the Royal Society of London series B* ; 264: 127-132.(1997)

Felsenstein, J. *Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach*. *Journal of Molecular Evolution*, 17:368-376.(1981)

Felsenstein J. *PHYLIP: Phylogeny Inference Package (version 3.2)*. *Cladistics*, 5:164-166.(1989)

Flower SS. *Contributions to our knowledge of the duration of life in vertebrate animals*. *Proc. Zool. Soc. London* 145-234. (1931)

Frank SA. *Sex allocation theory for birds and mammals*. *Annu Rev Ecol Syst* 21:13-55.(1990)

Frankel O and Soule M. *Conservation and evolution*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.(1981)

Fridolfsson AK, Ellegren H. Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics* 155:1903-1912.(2000)

Gaggiotti OE, Lange O, Rassmann K, Gliddon C. *A comparison of two indirect methods for average levels of gene flow using microsatellite data*. *Molecular Ecology*, 8:1513–1520.(1999)

Gariboldi A and Bailo M. *I cormorani del Palearctico occidentale*. *Riv.It.Birdwatching*, a.1, vol.1 (2): 11-37.(1993)

Gautschi B, Jacob G, Negro JJ et al. *Analysis of relatedness and determination of the source of founders in the captive Bearded vulture, *Gypaetus barbatus*, population*. *Conserv Genet* 4:479–490.(2003a)

Geist V. *Mountain sheep*. The University Chicago Press.(1971)

Genero F, Perco F, Dentessani B. *Il Grifone in Italia e nel mondo, biologia e strategie di conservazione*. Franco Muzzio Editore, p. 31-48.(1996)

Gerlach G and Musolf K. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation biology*,14:1066-1074.(2000)

Goldstein DB, Ruiz-Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. *An Evaluation of genetic distances for use with Microsatellite loci*. *Genetics*, 139:463-471.(1995)

Goodman SJ. *RST Calc: a collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data*. *Molecular Ecology*, 6:881–885.(1997)

Goossens B, Chikhi L, Taberlet P, Waits LP, Allaine D. *Microsatellite analysis of genetic variation among and within Alpine marmot populations in the French Alps*. *Molecular Ecology*, 10, 41–52.(2001)

Goostrey A, Carss DN, Noble LR and Piertney SB. *Population introgression and differentiation in the great cormorant *Phalacrocorax carbo* in Europe*. *Molecular Ecology* 7:329–338.(1998)

Goudet J. *Fstat, version 2.9.3.2*. University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm.(2002)

Graves J, Ortega J, Slater PJB. Extra pair copulations and paternity in shags: do females chose better males? *Proc. R. Soc. London B*. 253: 3-7.(1993)

Green Mc, Waits JI, Avery MI, Tobin Me, Leberg PI. *Microsatellite Variation of Double-Crested Cormorant populations in Eastern North America*. *Journal Of Wildlife Management* 70(2):579–583.(2006)

Griffin AS, Sheldon BC and West SA. Cooperative breeders adjust offspring sex ratios to produce helpful helpers. *Am. Nat.* 166, 628–632.(2005)

Griffiths R, Tiwari B. *Sex of the last wild Spix's Macaw*. *Nature* 375: 454.(1995)

Griffiths R, Daan S and Dijkstra C. *Sex identification in birds using two CHD genes*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 263:1251-1256.(1996)

Griffiths MC, Double KO and Dawson RJG. A DNA test to sex most birds, *Mol. Ecol.* 7, pp. 1071–1075.(1998)

Guinand B. *Use of a multivariate model using allele frequency distributions to analyse patterns of genetic differentiation among populations*. *Biol J Linn Soc Lond*, 58: 173–195.(1996)

Guo SW, Thompson EA. *Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles*. *Biometrics*, 48:361-372.(1992)

Guyot I. *La reproduction du Cormoran huppé Phalacrocorax aristotelis en Corse*. In: Oiseaux marins nicheurs du Midi et de la Corse: Annales du C.R.O.P., Aix-en-Provence, 2: 70-76.(1985)

Guyot I. *Relationships between shag feeding areas and human fishing activities in Corsica(Mediterranean Sea)*. In: Tasker M.L. (ed), Seabirds Food and Feeding Ecology. Proceedings of third international Conference of the Seabird group:22-23.(1988)

Guyot I. *Relations entre les cormorans huppés et les activités de la pêche professionnelle en Corse*. Trav. Sci. Parc nat. Reg. Corse.(1990)

Guyot I. *Breeding distribution and number of Shag (Phalacrocorax aristotelis desmarestii) in the Mediterranean*. In. Aguilar J.S., Monbailliu X. Y Paterson A.M. (eds). Status and Conservation of Seabirds. SEO – MEDMARAVIS.(1993)

Hadjisterkotis E. *The Cyprus mouflon Ovis g. ophion management, conservation and evolution*. Thesis of Master.(1992)

Halverson J. *Nonsurgical method of avian sex identification*. In Altman RB., Clubb SL., Dorrestein GM., Quesenberry K. Avian medicine and surgery. Saunders WB co. 117-121.(1997)

Harlin RW. *Endoscopy*. In Roskopf W., Woerpel R. Disease of cage and aviary birds. William and Wilkins. 699-717.(1996)

Hanks J. *Conservation strategies for Africa's large mammals*. Reprod. Fertile. Dev. 13, 459-468.(2001)

Hartert E. *Die Vögel der Palaearktischen Fauna. Nachtragsband. [The Birds of the Palaearctic Fauna. Addendum.]* Berlin: Friedländer und Sohn.(1923)

Hasselquist D, Bensch S and Von Schantz T. *Correlation between male song repertoire, extra-pair paternity and offspring survival in the great reed warbler*. Nature 381: 229–232.(1996)

Heim de Balsac H and Mayaud N. *Les oiseaux du nord-ouest de l'Afrique*. Paris.(1962)

Hiendleder S, Hecht W, Dzapo V, Wassmuth R. *Ovine mitochondrial DNA restriction enzyme analysis, mapping and sequencing data*. Animal genetics 23:151.163.(1991)

Hiendleder S, Mainz K, Plante Y, Lewalski H. *Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from Urial and Argali sheep*. J. of Heredity 89; 113-120.(1998)

Hodges KE. *The ecology of snowshoe hares in northern boreal forests*. In: Ecology and Conservation of Lynx in the United States (eds Ruggiero L, Aubry K, Buskirk S et al.), pp. 117–161. University Press of Colorado, Boulder, CO.(2000a)

Holt WV and Pickard AR. *Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation*. Rev. Reprod. 4, 143-150.(1999)

Inoue-Murayama M, Ueda Y., Yamashita T, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Masegi T, Ito S. *Molecular Sexing Of Japanese Cormorants Used For Traditional Fishing On The Nagara River In Gifu City*. Anim Sci J, 73:417.(2002)

Jarne P And Lagoda Pjl. *Microsatellites, from Molecules to Populations and back*. Trends in Ecology and Evolution, 11: 424-430.(1996)

Kalab P, Stratil A, Glasnak V. *Genetic polymorphism of serum vitamin D-binding protein (GC) in sheep and mouflon*. Animal Genet 21:317-321.(1990)

Kato A, Watanuki Y, Shaughnessy P, Le Maho Y, Naito Y. Intersexual differences in the diving behaviour of foraging subantarctic cormorant (*Phalacrocorax albiventres*) and Japanese cormorant (*P. filamentosus*). Life sciences 322: 557-562.(1999)

Keith LB. *Dynamics of snowshoe hare populations*. In: Current Mammalogy, Vol. 2 (ed. Genoways HH), pp. 119–195. Plenum Press, New York.(1990)

Keller LF, Jeffery KJ, Arcese P et al. *Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers*. Proc R Soc Lond B 268:1387–1394.(2001)

Kemp SJ, Bresinsky L, Teale AJ. *A panel of bovine, ovine and caprine polymorphic microsatellites*. Animal Genetics, 24:363-365.(1993)

Kempnaers B, Verheyen GR and Dhondt AA. Extrapair paternity in the blue tit (*Parus caeruleus*): female choice, male characteristics and offspring quality. Behav. Ecol. 8: 481–492.(1997)

Kimura M & Crow J F. *The number of alleles that can be maintained in a finite population*. Genetics 49:725-38.(1964)

Kocher Td, Thomas Wk, Meyer A et al. *Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86: 6196-6200.(1989)

142

Dott.ssa Valentina Satta – Studio della variabilità genetica di specie animali autoctone della Sardegna
Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli studi di Sassari

Lanfranchi F and Weiss MC. *Araguina-Sennola dix annes de fouilles prehistorique a Bonifacio*. Archelogia corsa 2; 1-167.(1977)

Latch E, Rhodes O. *The effects of gene flow and population isolation on the genetic structure of reintroduced wild turkey populations: are genetic signatures of source populations retained?* Conserv Genet 6:981–997.(2005)

Lasley BL, Loskutoff NM. *The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species*. Theriogenology; 41, 119-132.(1994)

Lever C. *Naturalized mammals of the world*. London: Longman.p 487.(1985)

Lewontin RC. *The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models*. Genetics 49: 49–67.(1964)

Locard A. *Note sur les breches osseus des environs de Bastia*. Arch. Hist. Nat. Lyon , 1; 37-51.(1872)

Long JC. *The allelic correlation of Gainj- and Kalam-speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-Statistics*. Genetics, 112:629–647.(1986)

Loskutoff NM. *Role of embryo techniques in genetic management and conservation of wildlife*. In 'Reproduction Science and Integrated Conservation'. (Eds W.V. Holt, A.R. Pickard, J.C. Roger and D.E. Wildt) pp. 183-194. (Cambridge University: Cambridge, UK).(2003)

Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB. *Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks*. J Hered, 89:238-247.(1998)

Luikart G, Cornuet JM. *Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data*. Conservation Biology, 12:228-237.(1997)

Margules CR and Pressey RL. *Systematic conservation planning*. Nature 405, 243-253.(2000)

Massa B. *Atlante degli Uccelli nidificanti in Sicilia (1979-1983)*. Naturalista Siciliano, numero speciale. 242 pp.(1985)

McClelland BE. *Courtship and agonistic behavior in mouflon sheep*. Appl. Anim. Behav. Sci. 29,67—85.(1991)

Miller GS. *Catalogue of the Mammals of Western Europe*. British Museum (Natural History), London. XV + pp 1019.(1912)

143

Dott.ssa Valentina Satta – Studio della variabilità genetica di specie animali autoctone della Sardegna
Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli studi di Sassari

- Mira S, Billot C, Guillemaud T, Palma L, Cancela L. *Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in Eurasian vulture Gyps fulvus*. Mol Ecol Notes 2:557–558.(2002)
- Montgelard C, Nguyen TC, and Dubray D. *Genetic variability in French populations of the Corsican mouflon (Ovis ammon musimon): analysis of 2 blood proteins and red-cell blood groups*. Genet Sel Evol 26:303-315.(1994)
- Moore SS, Sargent LL, King TJ, Mattick JS, Georges M, Hetzel DJS. *The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species*. Genomics 10: 654-660.(1991)
- Mustoni A, Pedrotti L, Zanon E, Tosi G. *“Il muflone” da: Ungulati delle alpi - Biologia-Riconoscimento-Gestione*. Nitida immagine editrice. 389-436.(2002)
- Nadler CF, Hoffmann RS, Woolf A. *G-band patterns as chromosomal markers, and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (Ovis)*. Experientia 29(1):117-9.(1973)
- Naitana S, Ledda S, Cocco E, Manca L, Masala B. *Haemoglobin phenotypes of the wild European mouflon sheep living in the island of Sardinia*. Animal Genetics, 22; 67-75.(1990)
- Naitana S, Ledda S, Floris B, Loi P. *Cationi intraeritrocitari: diversità fra muflone e pecora Sarda*. Atti S.I.S.Vet. XLII, 243.(1988)
- Naitana S, Ledda S, Manca L, Masala B. *Indagine biochimica sulla probabile evoluzione della pecora e del muflone*. Atti 1° Convegno Studio, Gestione e Conservazione della Fauna Selvatica in Sardegna. 259-263. (1993)
- Nei M. *Genetic distances between populations*. Amer Natur, 106:283-292.(1972)
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. *The bottleneck effect and genetic variability in populations*. Evolution 29:1–10.(1975)
- Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. p 164.(1987)
- Newman D, Tallmon DA. *Experimental evidence for beneficial fitness effects of gene flow in recently isolated populations*. Conserv Biol 15:1054–1063.(2001)

Nguyen TC and Bunch TD. *Blood groups and evolutionary relationships among domestic sheep (Ovis aries), domestic goat (Capra hircus), aoudad (Ammotragus lervia) and European mouflon (Ovis musimon)*. Ann Génèt Sèl Anim. 12 :169-180.(1980)

Ohta T, Kimura M. *A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population*. Genet Res 22, 201–204.(1973)

Ouborg Nj, Piquot Y, Van Groenendael Jm. *Population Genetics, Molecular Markers and the Study of Dispersal in Plants*. Journal of Ecology 87: 551-568.(1999)

Palacios OA, Stephens CR, Waelbroeck H. *Emergence of algorithmic language in genetic systems*. Biosystems ; 47:129-47.(1998)

Petit E, Aulagner S, Bon R, Dubois M, Crouau-Roy B. *Genetic structure of populations of the mediterranean mouflon (Ovis Gmelini)*. Journal of Mammalogy, 78(2): 459-467.(1997)

Petit E, Aulagnier S, Vaiman D, Bouissou, Crouau-Roy B. *Microsatellite Variation in an Introduced Mouflon Population*. The Journal of Heredity. 88(6).(1997)

Petrie M, Schwabl H, Brande-Lavridsen N, Burke I. *Maternal investment: Sex differences in avian yolk hormone levels*. Nature 412, 498.(2001)

Petter F. *Elements d'une revision des lievres africains du sous-genre Lepus*. Mammalia 23: 41-67.(1959)

Petter F. *Elements d'une revision des Lievres europeens et asiatiques du sous-genre Lepus*. Zeitschrift für Säugetierkunde 26: 30-40.(1961)

Pfeffer P. *Le Mouflon de corse (Ovis ammon musimon Schreber, 1782). Position systematique, écologie et éthologie comparées*. Mammalia., 31: suppl. 1-262.(1967)

Pfeffer P and Genest H. *Biologie comparée d'une population de mouflons de Corse du Parc Naturel du Caroux*. Mammalia 33: 165-192.(1967)

Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN. *Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant Phalacrocorax carbo*. Molecular Ecology, 7, 138–140.(1998)

Prien S, Peukert R and Teller. *Das Muffelwild*. In: Stubbe H. (ed.); Buch der Hege I. Berlin. 110-147.(1982)

145

Dott.ssa Valentina Satta – Studio della variabilità genetica di specie animali autoctone della Sardegna
Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli studi di Sassari

Prince PA, Wood AG, Barton TR, Croxall JP. Satellite tracking wandering albatrosses (*Diomedea exulans*) in the South Atlantic. *Antartic Sci.* 4 31-36.(1992)

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. *Inference of population structure using multilocus genotypes*. *Genetics*, 155:945–959.(2000)

Pritchard JK, Wen X, Falush D. *Documentation for Structure Software: Version 2.2*. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>.(2007)

Pukazhenthi BS and Wildt DE. *Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife?* *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 33-46.(2004)

Randi E, Fusco G, Lorenzini R, Toso S, Tosi G. *Allozyme divergence and phylogenetic relationships among Capra, Ovis and Rupicapra (Artiodactyla, Bovidae)*. *Heredity* 67: 281-286.(1991)

Rassman K, Schlotterer C, Tautz D. *Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-base dna fingerprinting*. *Electrophoresis*, 12: 113-118.(1991)

Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC. *Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short term genetics distance*. *Genetics*, 105:767-779.(1983)

Rice WR. *Analyzing tables of statistical tests*. *Evolution*, 43:223-225.(1989)

Riedstra BC, Dijkstra C and Daan S. Daily energy expenditure of male and female Marsh Harrier nestlings. *Auk* 115:635-641.(1998)

Robichaux RH, Friar EA, Mount DW. *Molecular genetic consequences of a population bottleneck associated with reintroduction of the Mauna kea silversword [*Argyroxiphium sandwicense ssp sandwicense* (Asteraceae)]*. *Conserv Biol* 11:1140–1146.(1997)

Ruiu D. *Dentro il branco-Muflone*. Oasis 6, Musumeci Editore, Aosta.(1989)

Rutkowska J, Badyaev AV. *Meiotic drive and sex determination: molecular and cytological mechanisms of sex ratio adjustment in birds*. *Philos Trans R Soc: B* 363(1497):1675-1686.(2008)

Sacchi P, Soglia D, Maione S, Meneguz G, Campora M, Rasero R. *A non-invasive test for sex identification Short-toed Eagle (*Circatetus gallicus*)*. *Mol. Cell. Pro.* 18:193-196.(2004)

Saint Jalme M, Lecoq R, Seigneurin F, Blesbois E, Plozeau E. *Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species*. *Theriogenology* 59, 875-888.(2003)

Saitou N, Nei M. *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.(1987)

Samadi S, Erard F, Estoup A, Jarne P. *The influence of mutation, selection and reproductive system on microsatellite variability: a simulation approach*. *Genetic research* 71: 213-222.(1998)

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.(1989)

Schaffer WM. *On reproductive value and fitness*. *Ecology* 62:1683-1685.(1981)

Schaller GB. *Mountain Monarchs. Wild sheep and goats of the Himalaya*. University Chicago Press.(1977)

Schenk H and Torre A. Breeding distribution, numbers and conservation of Seabirds in Sardinia, 1978-1985. In: MEDMARAVIS e Monbailliu X (eds). *Mediterranean Marine Avifauna*. N.A.T.O. ASI series G, 12: 449-463.(1986)

Schenk H. *Analisi della situazione faunistica in Sardegna. Uccelli e Mammiferi*. S.O.S. Fauna, Animali in pericolo in Italia: 465-556, Ed. WWF, Camerino.(1976)

Schenk H, Aresu M, Naitana S. *Proposta di un piano d'azione per il grifone (Gyps fulvus) in Sardegna*. Legambiente Sardegna. Con il patrocinio dell'Assessorato della Difesa dell'Ambiente delle Regione Autonoma della Sardegna e del Comune di Bosa. pag 16.(2008)

Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M and von Haeseler A. *TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing*. [Bioinformatics](#). 18:502-504.(2002)

She J-X, Autem M, Kotoulas G, Pasteur N, Bonhomme F. *Multivariate analysis of genetic exchanges between Solea aegyptiaca and Solea senegalensis (Teleosts, Soleidae)*. *Biol J Linn Soc*, 32: 357–371.(1987)

Silvestri A. *Il Muflone sardo*. Ed. Forum, Forlì.134 pp.(1975).

Slatkin M. *Gene flow in natural populations*. *Annual Review of Ecology And Systematics*; 16: 393-430.(1985)

Smouse PE, Long JC. *A comparative F-statistics analysis of the genetic structure of human populations from Lowland South America and Highland New Guinea*. In: Weir BS, Eisen G, Goodman MM, Namkoong G, eds. Second international conference in quantitative genetics. Sunderland (MA): Sinauer Associates. pp 32–46.(1988)

Soulé ME. *Conservation: Tactics for a Constant Crisis*. Science, 16;253:744-750.(1991)

Spagnesi M, Toso S. (eds) *Iconografia dei Mammiferi d'Italia*. Ministero dell'Ambiente-Servizio Conservazione Naturae Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica.(1999)

Swengel SR. *Special techniques, C: Sex determination*. In: Cranes: Their Biology, Husbandry, and

Conservation; Ellis, D.H.; Gee, G.F.; Mirande, C.M. Eds.; National Biological Service/International Crane Foundation: United States of America, pp223-231.(1996)

Suchentrunk F, Mamuris Z, Sfougaris AI, Stamatis C. *Biochemical genetic variability in brown hares (Lepus europaeus) from Greece*. Biochem Genet; 41:127-140.(2003)

Sunnucks P. *Efficient genetic markers for population biology*. Trends Ecol Evol, 15: 199-203.(2000)

SurrIDGE AK, Bell DJ, Ibrahim KM, Hewitt GM. Population structure and genetic variation of European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in East Anglia. Heredity, 82:479-487.(1999)

Thibault JC, Guyot I, Martin J-L and Cheyland J. *Observations sur les vertébrés terrestres des îles mineures de l'archipel de la Maddalena*. Tav. sci. Parc nat. Rés. Rés.Nat. Corse (17): 47-95.(1988)

Thibault JC, Guyot I, Martin J-L and Cheyland J. *Atlas de repartition vertebres terrestres des îles des Bouches de Bonifacio*. Association de gestion des reserves naturelles Lavezzi et Cerbicales.(1989)

Toschi A. (ed.) *Fauna d'Italia – Mammalia. Lagomorpha, Rodentia, Carnivora, Artiodactyla, Cetacea*. Vol. VII. Edizioni Calderini Bologna, pp. 28-33.(1965)

Trivers RL and Willard DE. Natural selection and paternal ability to vary the sex ratio of offspring. Science 179: 90–92.(1973)

Türcke F and Schminke S. *Das Muffelwild*. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.(1965)

Vaufrey R. *Les elephants nains des iles mediterraneenne set la question des isthmes pleistocenes*. Arch. Inst.Paleont. Humaine men. Masson Paris.(1929)

Velando A. Ecología y comportamiento del cormorant moñudo *Phalacrocorax aristotelis* en las Islas Cíes y Ons. PhD Thesis, Universidad de Vigo. 124.(1997)

Velando A and Freire J. *Population modelling of European shag at their southern limit: conservation implications*. Biological Conservation: 107: 59-69.(2002)

Weimerskirch H, Salamolard M, Sarrazin F, Jouventin P. Foraging strategy of wandering albatrosses through the breeding season : a study using satellite telemetry. *Auk* 110 325-342.(1993)

Weir BS, Cockerham CC. *Estimating F-statistics for the analysis of population structure*. Evolution, 38:1358–1370.(1984)

Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Millaseau MJP, Vayssiex G, Lathrop M. *A second-generation linkage map of the human genome*. Nature 359: 794-801.(1992)

West SA and Sheldon BC. Constraints in the evolution of sex ratio adjustment. *Science* 295, 1685–1688.(2002)

Wildt DE. *Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis*. Anim. Reprod. Sci., 28: 247-257./(1997)

Wildt DE, Rall WF, Crister JK, Monfort SL, Seal US. *Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation*. Bioscience 47, 689-698.(1997a)

Wildt DE and Wemmer C. *Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation*. Biodivers. Conserv. 8, 965-976.(1999)

Wildt DE, Ellis E and Howard JG. *Linkage of reproductive sciences: from 'quick fix' to 'integrated' conservation*. J. Reprod. Fertil. Suppl. 57, 295-307.(2001)

Wright S. *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.(1978)

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. *Strategies for Microsatellite Isolation: a review*. *Molecular ecology* 11(1): 1-16.(2002)

Zhivotovsky LA, Feldman MW. *Microsatellite Variability and Genetic Distances*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92, 11549-11552.(1995)