



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

Corso di Dottorato di Ricerca in

“Evoluzione Biologica e Biochimica” – XXVI° Ciclo

**Gli spermatozoi degli uccelli: caratterizzazione morfologico-ultrastrutturale nell’astore
(*Accipiter gentilis*) e nel fagiano (*Phasianus colchicus mongolicus*) e messa a punto di protocolli
di crioconservazione**

(s.s.d. BIO/05)

Tesi di dottorato di:

Dott. ssa Federica Batocco

Federica Batocco

Coordinatore del corso

Prof.ssa Laura Zucconi

Laura Zucconi

Tutore

Prof.ssa Anna Maria Fausto

Anna Maria Fausto

Co-tutore

Dott.ssa Anna Rita Taddei

Anna Rita Taddei

Data della discussione

16 giugno 2015

A mia madre

INDICE

PREMESSA	p. 1
1 INTRODUZIONE	p. 4
1.1 Biologia riproduttiva degli uccelli e biotecnologie applicate a specie avicole	
1.1.1 La biologia riproduttiva degli uccelli	p. 4
1.1.2 Metodi di prelievo del liquido seminale	p. 8
1.1.3 Morfologia e ultrastruttura degli spermatozoi	p. 10
1.1.4 Anomalie morfologiche ed ultrastrutturali presenti nello sperma fresco.....	p. 31
1.1.5 La crioconservazione degli spermatozoi.....	p. 36
1.1.6 Inseminazione artificiale	p. 40
1.2 L'astore (<i>Accipiter gentilis</i>)	
1.2.1 Distribuzione e sistematica	p. 42
1.2.2 Descrizione della specie	p. 44
1.2.3 Biologia ed ecologia.....	p. 46
1.2.4 Conservazione e gestione.....	p. 50
1.3 Il fagiano (<i>Phasianus colchicus mongolicus</i>)	
1.3.1 Distribuzione e sistematica	p. 52
1.3.2 Descrizione della specie	p. 54
1.3.3 Biologia ed ecologia.....	p. 55
1.3.4 Conservazione e gestione.....	p. 57
1.4 Conservazione delle specie in via d'estinzione: normativa di riferimento e strategie di azione	p. 57
1.5 Conservazione ex situ e allevamento in cattività di specie selvatiche a rischio estinzione	p. 61

2 MATERIALI E METODI	p.66
2.1 Tecniche di allevamento in cattività.....	p.66
2.1.1 Astore	p.66
2.1.2 Fagiano	p.67
2.2 Metodi di raccolta degli spermatozoi	p. 68
2.2.1 Metodo cooperativo	p. 68
2.2.2 Massaggio dorso addominale	p. 69
2.3 Analisi quantitativa e qualitativa dello sperma	p. 70
2.4 Analisi morfologiche ed ultrastrutturali degli spermatozoi di astore e fagiano	p. 76
2.5 Metodi di crioconservazione degli spermatozoi.....	p. 78
2.6 Metodi di scongelamento degli spermatozoi.....	p. 80
3 RISULTATI	p.83
3.1 Raccolta degli spermatozoi.....	p.83
3.1.1 Astore	p.83
3.1.2 Fagiano	p.84
3.2 Analisi quantitativa e qualitativa dello sperma.....	p. 85
3.2.1 Astore	p. 85
3.2.2 Fagiano	p. 93
3.3 Analisi morfologiche ed ultrastrutturali degli spermatozoi di astore e fagiano	p. 94
3.4 Analisi qualitativa delle anomalie ultrastrutturali evidenziate negli eiaculati freschi.....	p. 104
3.5 Valutazione pre e post scongelamento degli spermatozoi.....	p. 112
3.5.1 Astore	p. 112
3.5.2 Fagiano	p. 114
4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	p.129
BIBLIOGRAFIA	p. 144
RINGRAZIAMENTI	p. 174

PREMESSA

Durante lo svolgimento del dottorato mi sono occupata della caratterizzazione morfologico ultrastrutturale e della messa a punto dei protocolli di crioconservazione degli spermatozoi di due specie di uccelli - l'astore (*Accipiter gentilis*) ed il fagiano comune (*Phasianus colchicus mongolicus*). La prima, l'astore è un piccolo rapace selvatico, endemico in Europa, raramente mantenuto in cattività, mentre la seconda, il fagiano, è una specie che viene allevata massivamente con successo per fini commerciali già da diversi anni.

La prima parte del lavoro ha riguardato la caratterizzazione a livello morfologico ed ultrastrutturale degli spermatozoi di queste due specie, mai descritti finora.

La caratterizzazione morfologica ed ultrastrutturale dei gameti maschili rappresenta il primo *step* fondamentale quando si vuole intraprendere il processo di crioconservazione. Infatti, in generale, specie di animali diverse hanno spermatozoi con caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali differenti, per ognuna delle quali devono attuarsi specifici protocolli. Da questi presupposti, e considerando il fatto che in letteratura è presente la descrizione dello spermatozoo di poche specie di uccelli selvatici (ed in particolar modo di nessuna specie appartenente ai rapaci), è nata la necessità di effettuare innanzitutto questo tipo di indagine.

L'astore ha rappresentato, per i fini della tesi, il modello sperimentale per gli uccelli selvatici. La messa a punto di un protocollo di crioconservazione degli spermatozoi di astore contribuirà al raggiungimento degli stessi obiettivi anche in altre specie selvatiche a rischio.

Al momento l'astore non è classificato tra gli uccelli in grave pericolo di estinzione ma, anche se non è a rischio, lo potrebbe diventare data la rapidità con cui gli habitat naturali e selvatici in Europa vengono modificati e antropizzati (Birdlife International, 2013). Avere a disposizione campioni di eiaculati di buona qualità è un elemento di fondamentale importanza quando si vuole intraprendere un processo di crioconservazione degli spermatozoi. Quindi il mio lavoro è stato possibile grazie alla collaborazione messa in atto con il centro di riproduzione assistita "*European Falcons*" di Assisi (Pg), basato su principi innovativi, e che ha partecipato alla mia sperimentazione, fornendo i campioni di

sperma fresco su cui eseguire le varie analisi. Presso il centro, attivo ormai da anni, sono state ottimizzate delle tecniche di allevamento per l'astore che consentono di raccogliere gli eiaculati senza affaticare eccessivamente gli animali. E' noto infatti che lo stress che affligge gli animali allevati in cattività e soprattutto quello aggiuntivo, procurato dall'allevatore durante il prelievo del seme, influiscono negativamente sulla bontà del seme stesso rendendolo molto spesso inutilizzabile per l'inseminazione artificiale e per l'eventuale crioconservazione. L'analisi quantitativa e qualitativa, eseguita durante il mio lavoro di tesi sui campioni di eiaculati raccolti dagli astori allevati presso il centro "European Falcons", si è rivelata un utile mezzo per validare il metodo di raccolta messo in atto in questo centro di allevamento, dimostrando che tale tecnica permette di ottenere campioni di sperma utili per l'inseminazione artificiale e per i processi di crioconservazione.

Il fagiano rappresenta un valido modello per le specie domestiche, ormai da tempo sottoposte ad un allevamento intensivo per scopi principalmente commerciali (Marzoni *et al.*, 2008). Le ultime epidemie aviarie e la riduzione della variabilità genetica nelle specie domestiche hanno notevolmente aumentato il rischio di estinzione di diverse razze di uccelli domestici. Inoltre il fagiano comune è il rappresentante "domestico" del grande gruppo di fagiani, tra cui i cosiddetti "ornamentali" sono a rischio di estinzione e quindi sottoposti a studi per la loro conservazione e per il loro recupero.

Attualmente la sperimentazione per la messa a punto di protocolli di crioconservazione degli spermatozoi del fagiano è in atto, tra gli altri, presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa ed è condotta dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Margherita Marzoni. La mia collaborazione con questo gruppo di ricerca è stata incentrata sulla caratterizzazione morfologica ed ultrastrutturale degli spermatozoi di questa specie, mai effettuata nel dettaglio, necessaria per ottimizzare protocolli di crioconservazione in fase di elaborazione.

Quindi, i risultati inerenti la struttura degli spermatozoi dell'astore e del fagiano ottenuti in questo lavoro di tesi hanno permesso da una parte di ottimizzare i protocolli di crioconservazione per gli spermatozoi di fagiano (lavoro condotto dal gruppo di Pisa) e dall'altra di metterne a punto alcuni per l'astore, tenendo presente la relazione tra "conservazione della struttura dello spermatozoo-efficacia del metodo di crioconservazione", ben delineato proprio nell'ambito del modello "fagiano".

Per dare un'ulteriore valenza a questa ricerca insieme all'Università di Pisa è stata intrapresa una collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof.ssa Ewa Lukaszewicz ("Institute of Animal Breeding", "University of Environmental and Life Science - Wroclaw", Polonia), che sta sperimentando, con una buona percentuale di successo, protocolli di crioconservazione per spermatozoi di diverse specie avicole selvatiche tra cui il gallo cedrone. Durante il mio soggiorno presso i laboratori della Prof.ssa Ewa Lukaszewicz ho avuto modo di apprendere nuove tecniche di analisi e crioconservazione degli spermatozoi, utili per ottimizzare quelle già impiegate nella mia sperimentazione. Inoltre ho intrapreso delle indagini sulla morfologia e sull'ultrastruttura degli spermatozoi del gallo cedrone, sia freschi sia crioconservati, con lo scopo di analizzare approfonditamente i danni causati dal processo di crioconservazione. I risultati ottenuti saranno utilizzati per apportare modifiche alle metodiche già utilizzate così da ottimizzarle.

Gli obiettivi raggiunti in questo lavoro possono rivestire una notevole importanza nella prospettiva di poter allestire una "criobanca" per la salvaguardia ed il miglioramento genetico di specie avicole selvatiche a rischio estinzione.

1 INTRODUZIONE

1.1 Biologia riproduttiva degli uccelli e biotecnologie applicate a specie avicole

1.1.1. La biologia riproduttiva degli uccelli

Gli uccelli sono animali ovipari e il loro apparato riproduttore, sia maschile che femminile, presenta delle caratteristiche peculiari che gli consentono di essere molto efficiente anche a condizioni ambientali altamente variabili. Hanno una riproduzione stagionale e le loro gonadi restano piccole e inattive durante il resto dell'anno in modo da alleggerire il carico durante il volo. I cicli biologici sono distribuiti nel tempo e sono influenzati dal fotoperiodo. Solitamente si svolgono quando le condizioni meteorologiche e le disponibilità alimentari lo consentono (Mitchell *et al.*, 1999).

La fecondazione è interna e, tranne che per alcune specie acquatiche e gli struzzi che possiedono un organo copulatore, il trasferimento degli spermatozoi avviene mediante il contatto diretto delle cloache dei due sessi (Miller-Harley, 2006; Barnes *et al.*, 2001).

I cicli estrali sono specie specifici e vengono classificati in base alla lunghezza del ciclo ed al momento dell'anno nel quale ogni specie diventa attiva dal punto di vista riproduttivo. La maggior parte degli uccelli non domestici, che vivono e si riproducono nelle zone temperate, subartiche ed artiche, hanno cicli annuali, mentre altre specie che si sono adattate a vivere in condizioni desertiche o tropicali hanno cicli semestrali o quando le condizioni ambientali lo permettono.

Per quanto riguarda i rapaci, in particolare, finora non è stata rivolta molta attenzione allo studio dell'apparato riproduttore e molte informazioni di base, quali la presenza e la posizione dei tubuli seminiferi e la durata del periodo fertile, sono ancora sconosciute (Blanco *et al.*, 2007).

Come noto, nelle femmine degli uccelli, durante lo sviluppo, si formano due ovari e due ovidotti, ma generalmente solo quelli di sinistra completano la loro formazione, mentre quelli di destra si riducono ad organo vestigiale (Hickman *et al.*, 2012; 2008) (Figura 1).

Nei rapaci, ed in particolare nei Falconiformes e negli Accipitriformes, invece, sono presenti due ovari funzionali (Madeddu *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2007) e due ovidotti (Madeddu *et al.*, 2008).

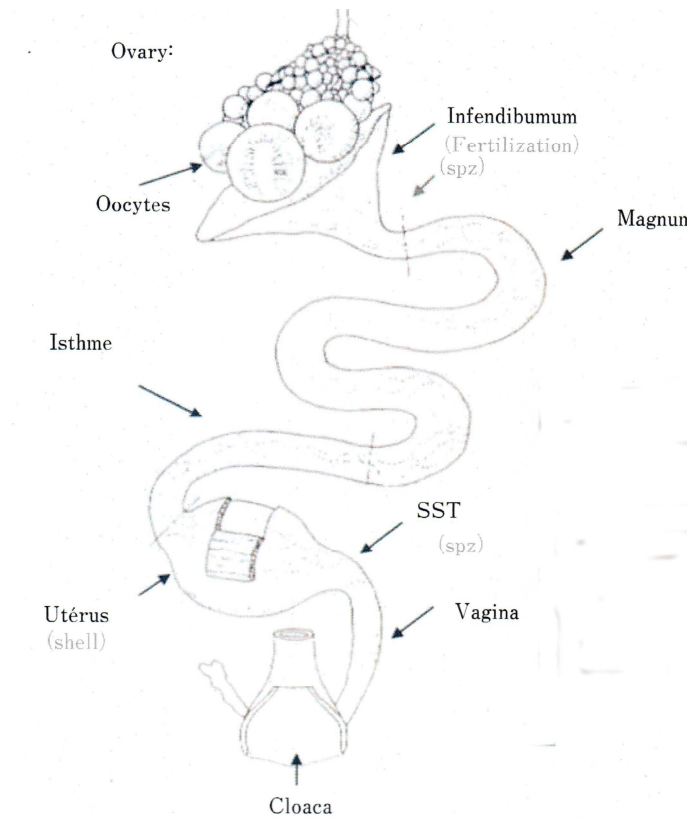


Figura 1: schema dell'ovaio e dell'ovidotto del pollo (adattata da Sauver, 1988, da Romanoff e Romanoff, 1949) (Blesbois, 2011)

L'apparato riproduttore femminile è la sede della formazione delle uova, dello stoccaggio degli spermatozoi, e della fertilizzazione.

Le due funzioni principali dell'ovario sono: la formazione dell'uovo e la produzione degli ormoni femminili, estrogeno e progesterone.

L'ovidotto può essere suddiviso in cinque regioni ben distinguibili (Figura 1):

1. Infundibulum: regione dell'ovidotto dove avviene la fertilizzazione dell'oocita da parte dello spermatozoo e dove viene prodotto il primo strato di albume che prende il nome di strato infundibolare;

2. Magnum: è il segmento più lungo dell'ovidotto e può essere facilmente distinto dall'*infundibulum* in quanto ha un diametro maggiore. E' il sito dove viene prodotta la maggior parte dell'albume;
3. Istmo: è la regione dove vengono prodotte le membrane interna ed esterna del guscio. Elementi caratteristici dell'istmo che permettono di distinguerlo dal magnum sono uno strato di muscolatura circolare e il tessuto ghiandolare meno sviluppato;
4. Utero (o ghiandola del guscio): il carattere peculiare di questa regione è uno spesso strato di muscolatura longitudinale, con cellule tubulari ghiandolari e caliciformi;
5. Vagina: costituisce l'ultimo tratto dell'ovidotto e presenta muscoli ben sviluppati dal momento che lo sfintere muscolare e la giunzione utero-vaginale hanno la funzione di espellere l'uovo. La vagina si apre nella cloaca che costituisce l'apertura sia dell'apparato digestivo che di quello riproduttivo ed è composta da tre diverse regioni: il coprodeo, l'urodeo e il proctodeo. L'apertura della vagina si trova nella parete superiore dell'urodeo.

L'ovidotto ha due funzioni principali: la prima è la raccolta, lo stoccaggio e la selezione degli spermatozoi prima della fecondazione dell'oocita che avviene nell'*infundibulum*; la seconda è la formazione della membrana vitellina esterna, dell'albume e del guscio con il conseguente sviluppo di uova notevolmente specializzate che permettono all'embrione di svilupparsi autonomamente all'interno di un micro ambiente altamente protetto (Blesbois, 2011). L'ovidotto è anche il sito dove si forma lo zigote e dove avvengono le prime divisioni cellulari fino all'ovodeposizione, quando viene attivato il genoma dell'embrione (Blesbois, 2011).

Una caratteristica peculiare dell'apparato riproduttore femminile degli uccelli è la presenza dei tubuli di stoccaggio degli spermatozoi (SST), posizionati a livello della giunzione utero vaginale (Figura 1), la cui funzione è quella di conservare gli spermatozoi anche per un periodo prolungato. Tale particolarità consente alle femmine degli uccelli di deporre uova fertilizzate anche in assenza di individui maschi (Blesbois, 2011).

Il ciclo che porta alla deposizione delle uova si sviluppa in tre differenti fasi (ovulazione, formazione delle uova e successiva deposizione) e differisce nelle diverse specie. Negli uccelli domestici (polli, tacchini, ecc) il ciclo di ovodeposizione può variare dalle 24 alle 26 ore, tuttavia negli uccelli selvatici ci sono molte eccezioni. Solitamente nei falconi l'intervallo di deposizione delle uova è di 52 ore. Secondo quanto riportato da Weaver (1985) l'inseminazione nei falconiformi deve avvenire entro 6 ore dall'ovodeposizione e comunque non oltre le 16 ore in quanto servono circa 36 ore per la formazione di un uovo. Il numero di uova deposte per ogni singola covata e il numero stesso delle covate sono specie-specifiche e variano anche in base alla stagione.

Per quel che riguarda gli esemplari maschi, è noto che, durante l'intero ciclo riproduttivo, l'obiettivo principale è quello di produrre il maggior numero di spermatozoi con il minimo dispendio di energia (Blesbois, 2011). I gameti maschili sono prodotti nei testicoli ed in tutte le specie aviarie la spermatogenesi avviene alla temperatura corporea di 41-43° C. Gli spermatozoi rilasciati dai tubuli seminiferi sono in sospensione nel fluido seminifero e vengono trasportati verso la cloaca da diversi dotti formanti la *rete testis* (che comprende una regione intra-testicolare ed una extra-testicolare), dal dotto efferente e da quello di collegamento, dall'epididimo e dal dotto deferente (Kirby & Froman, 2000) (Figura 2).

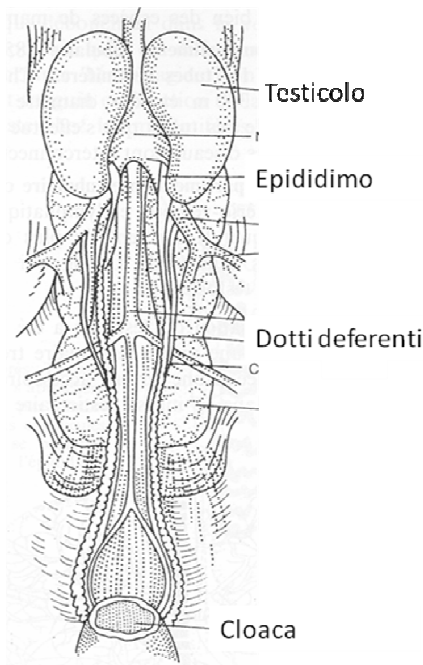


Figura 2: apparato genitale maschile degli uccelli (Bernard Sauver 1988, INRA)

Gli spermatozoi vengono trasportati lungo il tratto riproduttivo maschile molto rapidamente e, prima dell'eiaculazione, vengono immagazzinati per un periodo limitato di tempo all'interno dei dotti deferenti (Blesbois, 2011). La rapidità con cui gli spermatozoi vengono trasportati nell'apparato riproduttore maschile è in netto contrasto con l'elevata complessità della selezione che subiscono in quello femminile (Blesbois, 2011; Aire, 2007). Infatti, i gameti maschili, dal momento che entrano nelle vie genitali femminili, subiscono una drastica selezione e solo l'1% raggiunge la giunzione utero-vaginale (UVJ) (Brillard e Bakst, 1990) e di questi ultimi solo l'1% arriva allo strato perivitellino dell'uovo. Quindi solo uno spermatozoo su mille è in grado di raggiungere il sito di fecondazione (Blesbois, 2011; Blesbois e Brillard, 2007). Per questo motivo gli spermatozoi degli uccelli hanno sviluppato degli adattamenti particolari al loro complesso sistema di fecondazione interna (Blesbois, 2011, Deviche *et al.*, 2011). Gli spermatozoi aviari risultano estremamente sottili e possono essere suddivisi in due regioni principali: la testa e la coda. Nella testa sono localizzati la vescicola acrosomiale il nucleo. All'interno della vescicola acrosomiale sono contenuti diversi enzimi idrolitici, coinvolti nella digestione dello strato perivitellino interno (IPVL) che circonda l'oocita. Il nucleo è circondato da una doppia membrana, e contiene cromatina estremamente condensata, che ha la funzione di proteggere il genoma durante il passaggio nell'ovidotto prima della fusione con l'oocita. La prima regione della coda, denominata pezzo intermedio, è il "motore" energetico degli spermatozoi.

1.1.2 Metodi di prelievo del liquido seminale

Il liquido seminale degli uccelli è stato raccolto per la prima volta nel pollo da Burrows e Quinn nel 1935 (Gee *et al.*, 2004; Samour, 2004; Burrows e Quinn, 1935). Da allora la raccolta degli spermatozoi è diventata una procedura consolidata non solo nell'industria del pollame ma anche nei programmi di allevamento in cattività delle specie selvatiche a rischio estinzione (Samour, 2004).

A differenza dell'industria del pollame, dove gli animali vengono allevati per circa 30-60 settimane con il solo scopo di massimizzare la produzione dello sperma e delle uova, gli uccelli selvatici hanno una stagione riproduttiva relativamente breve (30-120 giorni) (Blanco *et al.*, 2009). Questo limitato periodo di tempo utile per la raccolta e per la conservazione dello sperma richiede che gli animali vengano addestrati per la raccolta

degli spermatozoi prima dell'inizio della stagione riproduttiva (Blanco *et al.*, 2009; Gee *et al.*, 1996; Birkhead *et al.*, 1995; Gee *et al.*, 1990).

Nel corso degli anni sono stati messi a punto e standardizzati i seguenti metodi di raccolta degli spermatozoi degli uccelli:

1. Massaggio della regione dorso-caudale e addominale: dei diversi metodi sviluppati questo è sicuramente quello più pratico e quindi anche il più utilizzato (Madeddu *et al.*, 2008 a; Gee *et al.*, 2004). Questa tecnica generalmente richiede l'intervento di due operatori, uno che pratica il massaggio e l'altro che raccoglie lo sperma e può essere utilizzata sia con specie imprintate che non. Con questa metodologia il seme può essere raccolto dallo stesso esemplare frequentemente, tuttavia la qualità degli eiaculati è notevolmente condizionata dai fattori di stress che influenzano l'animale durante la raccolta (Madeddu *et al.*, 2008 a; Gee *et al.*, 2004). Quindi il massaggio ed il prelievo devono essere effettuati con la massima cautela per evitare l'espulsione, insieme al liquido seminale, di feci e urine che possono contaminare lo sperma e comprometterne il successivo impiego (Blanco *et al.*, 2009; Madeddu *et al.*, 2008).
2. Metodo cooperativo: questa metodologia è stata sviluppata per la prima volta dai falconieri sui rapaci imprintati sessualmente e consiste nell'interazione dell'allevatore con gli animali attraverso la simulazione dei loro richiami, dei loro gesti e attraverso l'approvvigionamento di cibo. Durante la stagione riproduttiva l'interazione "operatore-rapace" viene intensificata e, una volta che è stato raggiunto il necessario livello di condizionamento, i maschi arrivano a rilasciare gli spermatozoi sulla mano guantata dell'operatore, eseguendo la stessa manovra che in natura effettuano con i partner femminili (Blanco *et al.*, 2009; Gee *et al.*, 2004; Samour *et al.*, 2004). Questa tecnica di raccolta è stata utilizzata, con elevate percentuali di successo, su diverse specie di rapaci tra le quali *Aquila chrysaetos* (Grier, 1973; Hammerstom, 1970), *Buteo jamaicensis* (Temple, 1972), *Falco mexicanus* (Boyd e Boyd, 1976).
3. Elettrostimolazione: dal momento che molti uccelli selvatici sono difficili da tenere fermi l'elettrostimolazione è una metodica che permette di raccogliere il seme

molto rapidamente riducendo lo stress causato dalla manipolazione da parte dell'operatore (Gee *et al.*, 2004; Harrison e Wasmund, 1983). È un metodo che richiede adeguata manualità in quanto è necessaria l'anestesia o la sedazione profonda dell'animale, che, se non vengono effettuate con le dovute accortezze possono provocare danni ai tessuti interni; ed anche quando viene eseguito con la massima attenzione gli eiaculati sono possono risultare contaminati dalle urine (Blanco *et al.*, 2009). L'elettrostimolazione viene utilizzata frequentemente sia nei mammiferi che negli uccelli dove viene usata soprattutto in specie selvatiche difficili da manipolare come alcuni pappagalli, ma anche anatre, oche e piccioni (Blanco *et al.*, 2009; Samour *et al.*, 1988; Betzen, 1985; Harrison e Wasmund, 1983).

4. Impiego di una vagina artificiale: in questo caso, due esemplari di sesso diverso vengono posti nella stessa gabbia. Quando il maschio sale sul dorso della femmina e inizia a muovere le timoniere (ossia le penne della coda), con i classici movimenti che compie anche in natura, interviene l'operatore che posiziona la vagina in prossimità della cloaca del maschio e con una lieve pressione della regione dorso caudale dell'animale determina l'eiaculazione all'interno della vagina artificiale per spremitura dei dotti deferenti (Marzoni *et al.*, 1992).

1.1.3 Morfologia e ultrastruttura degli spermatozoi

Lo studio della morfologia e dell'ultrastruttura degli spermatozoi insieme ad un'analisi approfondita di diversi parametri quali il volume, la concentrazione, la vitalità e la motilità degli spermatozoi sono di fondamentale importanza quando si vogliono intraprendere i processi di crioconservazione e di inseminazione artificiale in una determinata specie. Queste due tecniche negli ultimi anni hanno acquisito un ruolo sempre più rilevante tra le biotecnologie riproduttive utilizzate per aumentare la produttività sia nelle specie di interesse commerciale sia in quelle in via d'estinzione (Du Plessis *et al.*, 2014; Gee *et al.*, 2004). Tuttavia, considerando l'aumento esponenziale del numero di uccelli selvatici a rischio estinzione è sempre più necessario ampliare il campo di applicazione di tali biotecnologie anche a queste specie.

La descrizione dettagliata della morfologia e dell'ultrastruttura del gamete maschile, unitamente all'analisi della concentrazione e della motilità, sono i tre parametri fondamentali per la valutazione della qualità del seme (Du Plessis *et al.*, 2014, 2012, 2011; Cooper *et al.*, 2002; Jørgensen *et al.*, 1997; Zamboni *et al.*, 1992; MacLeod *et al.*, 1951; Hotchkiss *et al.*, 1938).

Numerose ricerche scientifiche effettuate sull'uomo (Zamboni, 1992; Menkeveld *et al.*, 1991; Holstein *et al.*, 1981), e su animali quali il toro (Freneau *et al.*, 2010; Barth *et al.*, 1989), lo stallone (Brito, 2007; Jasko *et al.*, 1990; Dowsett *et al.*, 1984), il cinghiale (Briz, 1996) e il cane (Martinez *et al.*, 2004; Oettlè *et al.*, 1993; Oettlè *et al.*, 1988) hanno dimostrato l'importanza che riveste lo studio della morfologia e dell'ultrastruttura degli spermatozoi nella valutazione della capacità fecondante degli spermatozoi stessi e per il successo riproduttivo quando si utilizza l'inseminazione artificiale.

Dal 1800 fino ad oggi sono stati effettuati numerosissimi lavori per descrivere la struttura degli spermatozoi degli uccelli.

I primi studi al microscopio ottico sulla morfologia degli spermatozoi degli uccelli risalgono alla fine del 1800 e gli inizi del 1900 e sono stati effettuati da Ballowitz (1913, 1888, 1886) e Retzius (1912, 1911, 1909). I lavori di questi due autori rivestono tuttora una notevole importanza negli studi di spermatologia aviaria (Jamieson, 2007).

Come illustrato nelle figure 3 - 4 lo spermatozoo degli uccelli può essere suddiviso in due regioni principali: la testa e la coda. Tuttavia già dagli studi di Ballowitz e Retzius è emersa un'enorme variabilità morfologica tra i gameti maschili delle diverse specie aviarie. In particolare, in base alla loro struttura gli spermatozoi degli uccelli possono essere suddivisi in due categorie (Jamieson, 2007; Asa *et. al.*, 1987): “*non-passeriformi*”, (con una struttura relativamente semplice con una testa che può essere più o meno falciforme ed una lunga coda (Figura 3)) e “*passeriformi*” (nei quali invece la testa appare fortemente spiralizzata ed in molte specie lungo la coda è localizzata una membrana elicoidale (Figura 4)) (Asa *et. al.*, 1987). Il primo modello di spermatozoi (non-passeriforme), dal momento che presenta diverse somiglianze (canale endonucleare, *perforatorium*, guaina fibrosa e allungamento del centriolo distale) (Jamieson 2007; 1999) con gli spermatozoi dei rettili, viene considerato filogeneticamente più primitivo rispetto al secondo modello (passeriforme) (Asa *et. al.*, 1987). Nelle tabelle 1 e 2 vengono riportati i taxa e le specie studiate al microscopio ottico da Ballowitz e Retzius.

Uno studio più approfondito degli spermatozoi degli uccelli al microscopio ottico, utilizzando anche quello a contrasto di fase, è stato eseguito da McFarlane nel 1963 ed è riportato nel suo lavoro “*The Taxonomic Significance of Avian Sperm*” dove, oltre alla morfologia degli spermatozoi precedentemente osservati da Ballowitz e Retzius, sono stati studiati i gameti maschili di nuove specie di uccelli. Nelle tabelle 3 e 4 vengono riportati tutti gli ordini, le famiglie e il numero di specie e generi oggetto dello studio di McFarlane. Per quanto riguarda l’ultrastruttura degli spermatozoi degli uccelli invece, il primo studio risale al 1949 quando Grigg and Hodge hanno descritto al microscopio elettronico a scansione e a trasmissione il gamete maschile di gallo (*Gallus gallus*), il cui spermatozoo era già stato classificato come appartenente ai non-passeriformi (Jamieson, 2007). Il primo lavoro di microscopia elettronica dello spermatozoo di una specie aviaria catalogata come passeriforme al microscopio ottico risale invece al 1961 quando Furieri descrisse al microscopio elettronico a scansione il gamete maschile dello storno comune (*Sturnus sturnus*). Gli studi di microscopia elettronica, oltre a confermare le differenze morfologiche, precedentemente osservate al microscopio ottico, hanno anche evidenziato molteplici diversità ultrastrutturali tra i due modelli di spermatozoi degli uccelli, non-passeriformi e passeriformi. Inoltre, grazie a questi studi, è stato possibile suddividere la seconda tipologia di spermatozoi degli uccelli in due sub-categorie: gli “*oscine*” che rappresentano i passeriformi in *sensu strictu* e i “*sub-oscine*” che invece mostrano caratteristiche peculiari sia dei non passeriformi che dei passeriformi.

Le specie di cui fino ad oggi ne è stata descritta l’ultrastruttura sono elencate nelle tabelle 5 e 6 rielaborate partendo dalla review “*Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny*” redatta da Jamieson nel 2007, nella quale l’autore oltre a descrivere gli spermatozoi di nuove specie ha riportato tutti i lavori effettuati fino a quel momento. Inoltre, ho integrato questa tabella con i nuovi studi di microscopia ottica ed elettronica eseguiti sui gameti maschili fino ad oggi (2015). Come risulta dalle tabelle, nonostante dal 2007 siano stati fatti diversi studi sulla crioconservazione degli spermatozoi degli uccelli e sull’inseminazione artificiale (Gloria *et al.*, 2014; O’Brien *et al.*, 2014; Neumann, 2013; Varadi, 2013; Rybnik, 2012; Della Volpe, 2011; Waldoch *et al.*, 2011, 2007), i lavori in cui è stata descritta l’ultrastruttura degli spermatozoi sono relativamente pochi (Du Plessis *et al.*, 2014, 2012, 2011; Simoes *et al.*, 2012).

Per quanto riguarda i rapaci, ai quali appartiene una delle due specie oggetto del presente studio, l’astore, la morfologia dello spermatozoo è stata analizzata al microscopio ottico

per la prima volta nel 1888 da Ballowitz nel nibbio bruno (*Milvus migrans*), e successivamente da Retzius nel 1909 nell'allocco (*Strix aluco*). Negli ultimi anni, invece, nonostante i diversi lavori sulla crioconservazione e inseminazione artificiale effettuati sui rapaci (Umapathy *et al.*, 2005; Gee *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2002, 2000; Knowles-Brown *et al.*, 2001) la morfologia degli spermatozoi al microscopio ottico è stata descritta solo da Madeddu *et al.* (2008) per il grifone (*Gyps fulvus*). A livello ultrastrutturale, invece, l'unica immagine al microscopio elettronico a scansione che si ha è relativa allo spermatozoo di falco pellegrino (Jamieson, 2007; Wagley, 1980).

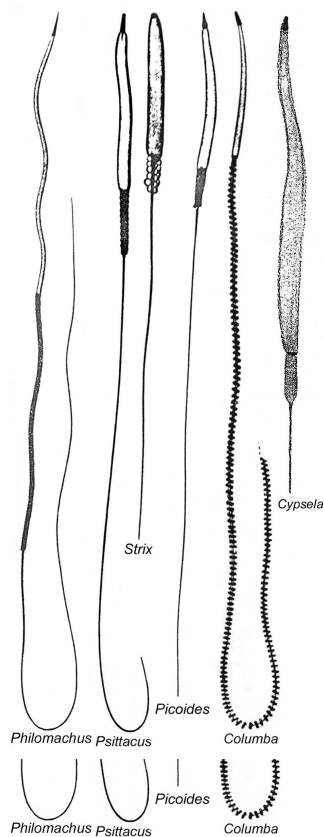


Figura 4: Disegni rielaborati da immagini al microscopio ottico di spermatozoi non-passeriformi. *Philomachus pugnax*, Ruff; *Psittacus* sp.; *Strix aluco*, Allocco; *Dendrocopos* (= *Picoides*) maggiore, Picchio; *Columba livia*, piccione domestico. Dopo Retzius, G. 1909. Biologische Untersuchungen, Neue Folge 14 (10): 89-122 Taf XXX, Fig. 14, XXXI, 13, 23, 27. Apus (= *Cypsel*) apus, rapida comune. Dopo Retzius, G. 1911. Biologische Untersuchungen, Neue Folge 16: 89-92 Taf XXVII, Fig. 24. La tavola è stata estratta dalla review "Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny" (Jamieson, 2007)

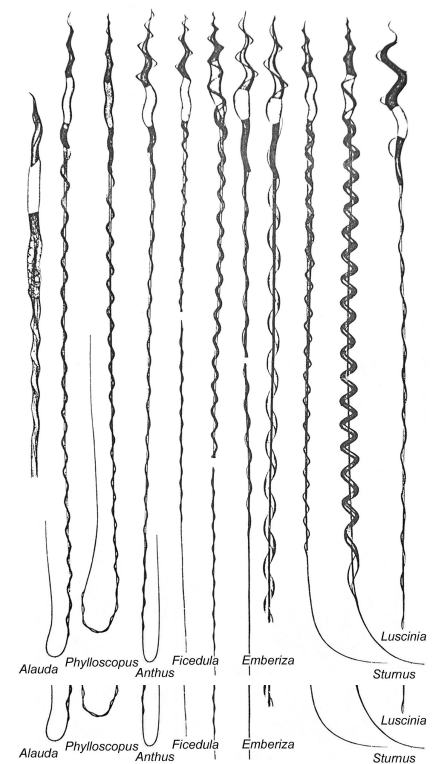


Figura 3: Immagini al microscopio ottico di spermatozoi passeriformi: *Alauda arvensis*, allodola, Skylark *Phylloscopus sibilatrix*, lui verde, *Anthus spinoletta*, spioncello; *Ficedula hypoleuca*, balia nera, *Emberiza citrinella*, zigolo giallo; *Sturnus vulgaris*, storno comune; *Luscinia Luscinia*, usignolo maggiore. Dopo Retzius, G. 1909. Biologische Untersuchungen, Neue Folge 14 (10): 89-122 Tafel XXXVII, figg. 1, 3, 5, 7, 9, 13, 15, 17, 19, 20. La tavola è stata estratta dalla review "Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny" (Jamieson, 2007)

Ordine	Specie	Referenze
Anseriformes	<i>Tadorna tadorna</i> <i>Anas platyrhynchos</i> <i>Aythya fuligula</i>	Ballowitz (1888) Retzius (1909) Retzius (1909)
Apodiformes	<i>Cypselus apus</i>	Retzius (1911)
Caprimulgiformes	<i>Caprimulgus europaeus</i>	Ballowitz (1888)
Columbiformes	<i>Columba livia</i>	Ballowitz (1888); Retzius (1909-1911)
Charadriiformes	<i>Larus ridibundus</i> <i>Larus canus</i> <i>Vanellus vanellus</i> <i>Uria aalge</i> <i>Larus fuscus</i> <i>Calidris alpina</i> <i>Tringa ochropus</i> <i>Scolopax rusticola</i> <i>Philomachus pugnax</i>	Ballowitz (1888) Ballowitz (1888) Ballowitz (1888); Retzius (1909) Retzius (1909) Retzius (1909) Retzius (1909) Retzius (1909) Retzius (1909) Retzius (1909)
Cuculiformes	<i>Cuculus canorus</i>	Ballowitz (1888)
Falconiformes	<i>Milvus ater</i>	Ballowitz (1888)
Galliformes	<i>Gallus domesticus</i> <i>Meleagris gallopavo</i>	Ballowitz (1888); Retzius (1909) Ballowitz (1888);
Gruiformes	<i>Fulica atra</i> <i>Rallidae</i> <i>Crex crex</i>	Retzius (1909) Retzius (1909) Retzius (1909)
Piciformes	<i>Dendrocopos major</i>	Ballowitz (1888); Retzius (1909)
Psittaciformes	<i>Psittacus sp.</i>	Retzius (1909)
Strigiformes	<i>Strix aluco</i>	Retzius (1909)
Struthioniformes	<i>Struthio camelus</i>	Retzius (1911)

Tabella 1: Taxa e specie che presentano spermatozoi non-passeriformi esaminati al microscopio ottico da Ballowitz e Retzius. La tabella è stata modificata in base a quelle riportate da Jamieson (2007) nella review “Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny”

Ordine	Famiglia	Referenze
Passeriformes	<i>Corvus frugilegus</i>	Ballowitz (1888); Retzius (1912)
	<i>Corvus corone</i>	Retzius (1909)
	<i>Perisoreus infaustus</i>	Retzius (1912)
	<i>Corvus monedula</i>	Retzius (1911)
	<i>Pica pica</i>	Retzius (1911)
	<i>Oriolus oriolus</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Lanius collurio</i>	Ballowitz (1888); Retzius (1911)
	<i>Passer domesticus</i>	Ballowitz (1888); Retzius (1909)
	<i>Muscicapa striata</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Hirundo rustica</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Chelidon urbica</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Sylvia nisoria</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Sylvia atricapilla</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Sylvia cinerea</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Sylvia hortensis</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Rubicilla phoenicura</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Motacilla flava</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Phyllopneuste hypolais</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Phyllopneuste sibilatrix</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Sitta europaea</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Carduelis canabina</i>	Ballowitz (1888)
	<i>Fringilla coelebs</i>	Ballowitz (1888); Retzius (1909)
	<i>Carduelis chloris</i>	Ballowitz (1888); Retzius (1909)
	<i>Emberiza citronella</i>	Ballowitz (1888); Retzius (1909)
	<i>Uria lomvia</i>	Ballowitz (1913)
	<i>Sturnus vulgaris</i>	Retzius (1909)
	<i>Turdus philomelos</i>	Retzius (1909)
	<i>Luscinia luscinia</i>	Retzius (1909)
	<i>Ficedula hypoleuca</i>	Retzius (1909)
	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	Retzius (1909)
	<i>Alauda arvensis</i>	Retzius (1909)
	<i>Anthus spino letta</i>	Retzius (1909)
	<i>Carduelis spinus</i>	Retzius (1909)

Tabella 2: Taxa e specie che presentano spermatozoi passeriformi esaminati al microscopio ottico da Ballowitz e Retzius. La tabella è stata modificata in base a quelle riportate da Jamieson (2007) nella review “*Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny*”

Ordine	Famiglia	Numero di specie e generi esaminati
Anseriformes	Anatidae	1 gen., 1 sp.
Apodiformes	Apodidae	1 gen., 1 sp.
	Trochilidae	5 gen., 5 spp.
Caprimulgiformes	Caprimulgidae	1 gen., 1 sp.
Ciconiiformes	Ardeidae	2 gen., 2 spp.
Columbiformes	Columbidae	5 gen., 6 spp.
Charadriiformes	Charadriidae	1 gen., 1 sp.
	Recurvirostridae	1 gen., 1 sp.
	Rynchopidae	1 gen., 1 sp.
	Scolopacidae	2 gen., 2 spp.
	Laridae	3 gen., 7 spp.
	Alcidae	1 gen., 1 sp.
culiformes	Cuculidae	1 gen., 1 sp.
Falconiformes	Accipitridae	1 gen., 1 sp.
Galliformes	Phasianidae	1 gen., 1 sp.
	Tetraonidae	1 gen., 1 sp.
Gruiformes	Rallidae	1 gen., 1 sp.
Piciformes	Picidae	1 gen., 1 sp.
	Ramphastidae	1 gen., 1 sp.
Procellariiformes	Hydrobatidae	1 gen., 1 sp.
Strigiformes	Strigidae	1 gen., 1 sp.
Trogoniformes	Trogonidae	1 gen., 1 sp.

Tabella 3: Ordini e famiglie che presentano spermatozoi non-passeriformi esaminati al microscopio ottico da McFarlane. La tabella è stata modificata in base a quelle riportate da Jamieson (2007) nella review “*Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny*”

Ordine	Famiglia	Numero di specie e generi esaminati
Passeriformes	Dendrocolaptidae	2 gen., 3 spp.
	Furnariidae	1 gen., 1 sp.
	Formicariidae	2 gen., 2 spp.
	Cotingidae	4 gen., 4 spp.
	Pipridae	2 gen., 3 spp.
	Tyrannidae	12 gen., 14 spp.
	Corvidae	2 gen., 2 spp.
	Laniidae	1 gen., 1 sp.
	Alaudidae	1 gen., 1 sp.
	Bombycillidae	1 gen., 1 sp.
	Coerebidae	1 gen., 1 sp.
	Fringillidae	17 gen., 23 spp.
	Hirundinidae	4 gen., 4 spp.
	Icteridae	8 gen., 8 spp.
	Mimidae	3 gen., 3 spp.
	Paridae	1 gen., 4 spp.
	Parulidae	13 gen., 27 spp.
	Ploceidae	1 gen., 1 sp.
	Sylviidae	2 gen., 2 spp.
	Sittidae	1 gen., 2 spp.
	Sturnidae	1 gen., 1 sp.
	Thraupidae	7 gen., 8 spp.
	Troglodytidae	2 gen., 2 spp.
	Turdidae	3 gen., 7 spp.
	Vireonidae	2 gen., 4 spp.

Tabella 4: Ordini e famiglie che presentano spermatozoi passeriformi esaminati al microscopio ottico da McFarlane. La tabella è stata modificata in base a quelle riportate da Jamieson (2007) nella review “*Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny*”

Taxon	Specie	Referenze
Struthioniformes	<i>Rhea americanus albisceus</i>	Phillips and Asa 1989 ¹ ; Asa <i>et al.</i> 1986 ¹
	<i>Struthio camelus</i>	Soley 1989 ¹ , 1993 ¹ ,1994a,b ¹ , 1996 ¹ , 1999 ¹ . Soley and Roberts 1994 ² ,Baccetti <i>et al.</i> 1991 ^{1 2}
	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	Du Plessis <i>et al.</i> 2011 ^{1 2} ; 2012 ^{1 2} ; 2014 ^{1 2} ,Baccetti <i>et al.</i> 1991 ^{1 2}
Tinamiformes	<i>Eudromia elegans</i>	Asa and Phillips 1987 ¹ ; Asa <i>et al.</i> 1986 ^{1 2}
Anseriformes	<i>Anas platyrhynchos</i>	Maretta 1975a, b ¹ ; Humphreys 1972 ¹ ; Simoes <i>et al.</i> ^{1 2} ,2012
	<i>Branta sandvicensis</i>	Humphreys 1972 ¹
Craciformes	_____	Nessuna referenza
Galliformes	<i>Gallus gallus</i>	Grigg and Hodge 1949 ^{1 2} ; Bonadona 1954 ² ; Nagano 1960 ¹ , 1962 ¹ ; McIntosh and Porter 1967 ¹ ; Nicander and Hillstrom 1967 ¹ ; Krustev and Danov 1968 ¹ ; Lake <i>et al.</i> 1968 ¹ ; Nicander 1970b ¹ ; Tingari 1973 ¹ ; Bakst and Howarth 1975 ¹ ; Gunawardana and Scott 1977 ¹ ; Bakst and Sexton 1979 ¹ ; Bakst 1980 ¹ ; Xia <i>et al.</i> 1985 ¹ ; Xia <i>et al.</i> 1986 ¹ ; Xia <i>et al.</i> 1988 ¹ ; Bae and Kim 1987 ¹ ; Woolley and Brammall 1987 ¹ ; Thurston and Hess 1987 ¹ ; Sprando and Russell 1988 ¹ ; Jamieson 1999 ¹
	<i>Coturnix japonica</i>	Saita <i>et al.</i> 1980 ¹ ; Maretta <i>et al.</i> 1982 ¹ ; Lin and Jones 1993 ¹ ; Woolley 1995 ¹ ; Tripepi <i>et al.</i> 1991 ¹ ; Vernon and Woolley 1999 ¹
	<i>Coturnix chinensis</i>	Jamieson 2007 ¹

Tabella 5Contd...

		<i>Tabella 5Contd....</i>
	<i>Meleagris gallopavo</i>	Marquez and Ogasawara 1975 ² ; Bakst and Sexton 1979 ¹ ; Baccetti <i>et al.</i> 1980 ¹ ; Bakst 1980 ¹ ; Bradley <i>et al.</i> 1986 ¹ ; Thurston and Hess 1987 ^{1 2}
	<i>Tragopan caboti</i>	Wen <i>et al.</i> 1997 ¹
	<i>Numida meleagris</i>	Hess <i>et al.</i> 1986 ¹ ; Thurston <i>et al.</i> 1982 ^{1 2} ; Thurston and Hess 1987 ² ; Aire and Soley 2003 ¹
Turniciformes	_____	Nessuna referenza
Piciformes	<i>Melanerpes carolinus</i>	Henley <i>et al.</i> 1978 ¹
Galbuliformes	_____	Nessuna referenza
Bucerotiformes	_____	Nessuna referenza
Upupiformes	_____	Nessuna referenza
Coraciiformes	_____	Nessuna referenza
Coliiformes	_____	Nessuna referenza
Cuculiformes	<i>Crotophaga ani</i>	Saita <i>et al.</i> 1982; Triepi <i>et al.</i> 1991 ¹ ; Jamieson 2007 ¹
Psittaciformes	<i>Melopsittacus undulatus</i>	Humphreys 1975 ¹ ; Samour <i>et al.</i> 1986 ^{1 2} , Jamieson <i>et al.</i> 1995 ¹
	<i>Agapornis roseicollis</i>	Jamieson <i>et al.</i> 1995 ¹
	<i>Platycercus elegans</i>	Jamieson 1999 ¹
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Jamieson <i>et al.</i> 1995 ¹
Apodiformes	<i>Apus apus</i>	Triepi <i>et al.</i> 1984 ¹ ; Jamieson 2007 ¹ ; Jamieson and Triepi 2005 ¹
	<i>Apus melba</i>	Triepi <i>et al.</i> 1991 ¹
Trochiliformes	_____	Nessuna referenza
Musophagiformes	_____	Nessuna referenza
Caprimulgiformes	<i>Caprimulgus europaeus</i>	Triepi <i>et al.</i> 1991 ¹ ; Jamieson 2007 ¹
Columbiformes	<i>Columba livia</i>	Yasuzumi and Yamaguchi 1977 ¹ (spermiogenesis only); Vernon and Woolley 1999 ¹
	<i>Streptopelia roseogrisea</i>	Mattei <i>et al.</i> 1972 ¹
	<i>Geopelia striata</i>	Jamieson <i>et al.</i> 1995 ¹ ; 1999 ¹ ; Jamieson 2007 ¹
<i>Tabella 5Contd...</i>		

	<i>Ocyphaps lophotes</i>	<i>Tabella 5Contd...</i> Jamieson <i>et al.</i> 1995 ¹ ; 1999 ¹ ; Jamieson 2007 ¹
Gruiformes	<i>Grus vipio</i>	Asa and Phillips 1987 ^{1 2} ; Phillips <i>et al.</i> 1987 ^{1 2}
Charadriiformes	<i>Jacana jacana</i>	Saita <i>et al.</i> 1983 ¹ ; Tripepi <i>et al.</i> 1991 ¹
Falconiformes	<i>Falco peregrinus</i>	Wagley 1980 ²
	<i>Accipiter gentilis</i>	Questo studio
Procellariiformes	_____	Nessuna referenza
Pelecaniformes	_____	Nessuna referenza
Podicipediiformes	_____	Nessuna referenza
Gaviiformes	_____	Nessuna referenza

Tabella 5: Famiglie e specie che presentano spermatozoi “non-passeriformi” esaminati a livello ultrastrutturale. La tabella è stata modificata in base a quelle riportate da Jamieson (2007) nella review “Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny”

<i>SUBOSCINE</i>		
Famiglia	Specie	Referenze
Tyrannidae	<i>Tyrannus verticalis</i>	McFarlane 1971 ¹
	<i>Tyrannus tyrannus</i>	Feduccia 1979 ¹
	<i>Contopus virens</i>	Feduccia 1979 ¹
	<i>Myiarchus crinitus</i>	McFarlane 1971 ¹ ; Asa and Phillips 1987 ¹
<i>OSCINE</i>		
Famiglia	Specie	Referenze
Corvidae	<i>Cyanocitta cristata</i>	Henley <i>et al.</i> 1978 ¹
	<i>Corvus splendens</i>	Bawa <i>et al.</i> 1990 ^{1 2}
<i>Tabella 6Contd...</i>		

Grallinidae	<i>Grallina cyanoleuca</i>	Tabella 6Contd... Jamieson 1995 ¹ ,1999 ¹
	<i>Vireo olivaceus</i>	McFarlane 1971; Henley et al.1978 ¹
Vireonidae	<i>Vireo griseus</i>	Asa and Phillips 1987 ¹
	<i>Myrmecocichila formicivora</i>	Jamieson 2007 ¹
Muscicapidae (inclusi Turdidae)	<i>Turdus greyi</i>	McFarlane 1963 ¹
	<i>Turdus merula</i>	Furieri 1961 ¹
	<i>Turdus migratorius</i>	McFarlane 1971; Henley et al.1978 ¹
	<i>Sturnus vulgaris</i>	Koehler 1995 ^{1 2} ‘ Vernon and Woolley 1999 ^{1 2}
Sturnidae	<i>Parus bicolor</i>	McFarlane 1971; Henley et al.1978 ¹
Paridae	<i>Tachycineta thalassina</i>	McFarlane 1971
Hirundinidae	<i>Thryothorus ludovicianus</i>	Asa and Phillips 1987 ¹
	<i>Troglodytes troglodytes</i>	Tripepi and Perrotta 1991 ¹
Troglodytidae	<i>Certhia brachydactyla</i>	Tripepi and Perrotta 1991 ¹
Certhiidae	<i>Sitta europaea</i>	Tripepi and Perrotta 1991 ¹
Sittidae	<i>Dendroica pinus</i>	Asa and Phillips 1987 ¹
	<i>Dendroica dominica</i>	Asa and Phillips 1987 ¹
	<i>Protonotaria citrea</i>	Asa and Phillips 1987 ¹
Parulidae	<i>Ammodramus maritimus</i>	McFarlane 1963 ¹
	<i>Fringilla coelebs</i>	Furieri 1962 ¹ ; Tripepi and Perrotta 1991 ¹
	<i>Pipilo erythrophthalmus</i>	Henley et al.1978 ¹
Fringillidae	<i>Piranga rubra</i>	Henley et al.1978 ¹
	<i>Serinus canaria</i>	Humphreys 1972 ¹
	<i>Serinus canaria, Canary x Cardeulis cardeulis Goldfinch, hybrid</i>	Swan 1985 ¹
	<i>Zonotrichia albicollis</i>	Henley et al.1978 ¹
	<i>Carduelis chloris</i>	Tripepi and Perrotta 1991 ¹
	<i>Agelaius phoeniceus</i>	Asa and Phillips 1987 ¹ ; Koehler 1995 ²
	<i>Icterus galbula</i>	Asa and Phillips 1987 ¹
	Tabella 6Contd...	

	<i>Molothrus ater</i>	Tabella 6Contd... Koehler 1995 ¹
	<i>Quiscalus quiscula</i>	Koehler 1995 ¹⁻²³
Emberizidae	<i>Cardinalis cardinalis</i>	Henley <i>et al.</i> 1978 ¹ ; Koehler 1995 ¹
	<i>Emberiza cirrus</i>	Tripepi and Perrotta 1991 ¹ ; Tripepi <i>et al.</i> 1991 ¹
Estrildidae	<i>Lonchura striata</i>	Yasuzumi and Sugioka 1966 ¹ ; 1971 ¹ ; Yasuzumi 1974 ¹⁻² ; Kondo <i>et al.</i> 1988 ¹
	<i>Lonchura castaneothorax</i>	Swan and Christidis 1987 ¹
Passeridae	<i>Passer diffusus</i>	Jamieson 2007 ¹
	<i>Passer domesticus</i>	Koehler 1995 ¹⁻²
	<i>Passer italiae</i>	Furieri 1961 ¹
Thraupidae	<i>Piranga rubra</i>	McFarlane 1971 ¹
Poaceidae	<i>Philetairus socius</i>	Jamieson 2007 ¹
	<i>Euplectes orix</i>	Jamieson 2007 ¹
	<i>Ploceus capensis</i>	Jamieson 2007 ¹
	<i>Quelea qualea</i>	Jamieson 2007 ¹
Prunellidae	<i>Prunella collaris</i>	Chiba and Nakamura 2001 ¹⁻²

Tabella 6: Famiglie e specie che presentano spermatozoi passeriformi esaminati a livello ultrastrutturale. La tabella è stata modificata in base a quelle riportate da Jamieson (2007) nella review “Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny”

¹ Specie studiate al microscopio elettronico a trasmissione.

² Specie studiate al microscopio elettronico a scansione.

Di seguito viene riportata una descrizione generale degli spermatozoi degli uccelli:

La testa dello spermatozoo

La testa dello spermatozoo sia nei non passeriformi sia nei passeriformi comprende una vescicola acrosomiale ed il nucleo. Nei primi (Figure 5 A-E; 6 A-B) la testa appare come una struttura cilindrica che si assottiglia gradualmente all' estremità anteriore; nei secondi possiede una caratteristica forma spiralata in 17 specie delle 18 studiate nel 2006 da Birkhead *et al.* al microscopio ottico (Figure 5 F-K; 7 A-B). L'unica eccezione è rappresentata dal *Pyrrhula pyrrhula* (Birkhead *et al.*, 2006).

Acrosoma

La vescicola acrosomiale nelle due tipologie di spermatozoi è posizionata nella regione anteriore della testa e forma un cappuccio che riveste il nucleo.

Per quanto riguarda i “non-passeriformi”, nella maggior parte delle specie appare come una struttura conica (Figura 6 A-B) la cui lunghezza risulta notevolmente minore rispetto a quella del nucleo. Le uniche eccezioni sono rappresentate negli spermatozoi di *Anas platyrhynchos* (Anseriformes) dove tale struttura apicalmente risulta estremamente sottile. In *Melanerpes carolinus* (Piciformes), *Trogon collaris* (Trogoniformes), *Jacana Jacana* e *Larus marinus* (Charadriiformes) (Figura 5 A-B), *Grus vipio* (Gruiformes) (Philips *et al.*, 1987) invece appare piuttosto corta ed allargata; tale conformazione della vescicola acrosomiale è stata definita da Henley *et al.* (1978) come “*button like*”.

Per ciò che concerne i “passeriformi” nei “*sub-oscine*” la vescicola acrosomiale è simile a quella della maggior parte dei non passeriformi. Negli “*oscine*” invece ha una lunghezza che può essere tre o quattro volte quella del nucleo ed una forma elicoidale piuttosto che conica (Figura 7 A-B). In molte specie appartenenti a questo raggruppamento l'acrosoma è circondato da un rivestimento, anch'esso elicoidale, distinto rispetto al resto della cellula (Figura 5 F,J,K).

Le uniche due eccezioni osservate nei passeriformi sono rappresentate da *Myrmecocichla formicivora* e *Philetairus socius*, specie lontane filogeneticamente rispetto alle altre, dove una cresta acrosomiale sovrasta un *core* acrosomiale fortemente elettrondenso. In questi casi l'acrosoma è stato definito “*bipartite acrosome*” (Jamieson 2007).

Perforatorium

Uno dei caratteri peculiari dei non passeriformi è la presenza del *perforatorium*, struttura di forma cilindrica, costituita da filamenti di actina (Baccetti *et al.*, 1980; Campanella *et al.*, 1979). Tale struttura è localizzata al di sotto della vescicola acrosomiale nello spazio subacrosomiale ed ha origine dalla porzione anteriore dello spermatozoo, inserendosi distalmente nel canale endonucleare nella regione anteriore del nucleo. Tra i non passeriformi le uniche eccezioni sono rappresentate da *Dromaius novaehollandiae* (Struthioniformes) (Du Plessis *et al.*, 2014; Jamieson 2007), *Apus apus* (Apodiformes), *Geopelia striata*, *Ocyphaps lophotes* (Columbiformes) e *Melanerpes carolinus* (Piciformes) dove il *perforatorium* è assente. In *Anas platyrhynchos* (Anseriformes), invece, dal momento che, come descritto in precedenza, la vescicola acrosomiale apicalmente è molto sottile, il *perforatorium* si estende quasi fino all'estremità anteriore dello spermatozoo e prende il nome di spina acrosomiale (Jamieson, 2007).

Nelle specie appartenenti ai due raggruppamenti dei passeriformi, invece, il *perforatorium* è assente.

Nucleo

Nei non passeriformi il nucleo è una struttura cilindrica ad eccezione della zona di transizione con l'acrosoma in cui si assottiglia notevolmente a formare il rostro nucleare (Figura 6 B).

In tutti i passeriformi, al contrario, tale regione dello spermatozoo appare come un cilindro elicoidale ed è molto più corto rispetto a quello dei non passeriformi (Figura 7 B). Infatti nelle specie appartenenti ai passeriformi la lunghezza del nucleo è nell'ordine di 3-5 μm ; nei non passeriformi invece varia dai 6,5-10 μm dei psittaciformes, ai 6-21 μm dei galliformi.

In entrambi i modelli di spermatozoo il nucleo è caratterizzato dalla presenza di cromatina fortemente condensata, con la sola eccezione di *Grus vipio* (Gruiformes - non passeriforme), unica specie appartenente alla classe degli uccelli in cui la cromatina del nucleo durante la spermatogenesi non diventa altamente compattata (Jamieson, 2007).

Il collo dello spermatozoo

Nelle due tipologie di spermatozoi la zona di transizione tra la testa e la coda è rappresentata dal collo dove è localizzato il complesso centriolare; si tratta di una regione difficilmente distinguibile ad un'analisi morfologica esterna.

Invece, tramite lo studio dell'ultrastruttura è stato osservato negli spermatozoi non passeriformi che tale complesso è formato dal centriolo prossimale, posizionato al di sotto della fossa di impianto del nucleo, e da quello distale che funge da corpo basale per il flagello (Figura 6 C). Nella maggior parte delle specie appartenenti a tale raggruppamento i due centrioli sono posizionati perpendicolarmente l'uno all'altro. Le uniche eccezioni sono rappresentate da *Coturnix Japonica*, *Coturnix chinensis* e *Numida meleagris* (tutte specie dell'ordine dei Galliformi) dove i due centrioli si trovano in linea l'uno all'altro (Jamieson, 2007).

Il centriolo distale funge da corpo basale per il flagello e in alcune specie, quali *Struthio camelus*, *Rhea americana albiscens* (Strutioniformes), *Eudromia elegans* (Tinamiformes), e *Apus apus* (Apodiformes) si estende lungo l'intera lunghezza del pezzo intermedio (Figura 6 C); nelle restanti specie appartenenti ai non passeriformi, invece, solo in parte.

Per quanto riguarda i passeriformi, i “*sub-oscine*” presentano i due centrioli come nei non passeriformi; negli “*oscine*” invece, il complesso centriolare, è formato dal solo centriolo distale.

La coda dello spermatozoo

In entrambe le categorie di spermatozoi, al microscopio ottico la coda appare come una struttura omogenea e compatta con un diametro che diminuisce gradualmente e termina con un'estremità notevolmente sottile (Figure 6-7 A). Con l'analisi al microscopio elettronico a trasmissione, invece, è stato possibile suddividere la coda in tre porzioni differenti (pezzo intermedio, pezzo principale e pezzo terminale) caratterizzate da diversa ultrastruttura. Tale suddivisione risulta più evidente nella coda dello spermatozoo dei non passeriformi piuttosto che in quello dei passeriformi. La prima regione della coda è rappresentata dal pezzo intermedio che nella maggior parte delle specie appartenenti ai non-passeriformi è delimitato alla sua estremità distale dall'*annulus*, che segna il punto di transizione con il pezzo principale (Figura 6 C). L'unica eccezione è stata osservata nei Psittaciformes dove tale struttura è assente e quindi alle osservazioni al microscopio

elettronico a scansione il passaggio tra i due segmenti della coda è individuabile soltanto dalla diminuzione di diametro del pezzo principale.

Nei passeriformi non è presente una struttura analoga all'*annulus*, quindi il pezzo intermedio e il pezzo principale della coda sono difficilmente distinguibili ad un'analisi morfologica esterna.

In tutti gli spermatozoi degli uccelli nella regione della coda sono posizionati i mitocondri dai quali proviene l'energia per far muovere lo spermatozoo. Nei non passeriformi i mitocondri sono localizzati lungo il pezzo intermedio e appaiono come un manicotto che circonda il complesso centriolare e il tratto prossimale dell'assonema.

Negli "*oscine*" invece sono organizzati in un filamento elicoidale (Figura 7 C) la cui lunghezza è altamente specie-specifica ed è compresa in un range che va da 1,86 μm in *Pyrrhula pyrrula* a 138,48 μm in *Carduelis cannabina* (Birkhead *et al.*, 2006).

I "*sub-oscine*", invece, presentano una combinazione delle due organizzazioni osservate nei non-passeriformi e negli "*oscine*". Infatti in alcune sezioni trasversali della coda di tali specie i mitocondri circondano il centriolo distale e l'assonema, in altre invece risultano raggruppati lateralmente.

L'assonema in entrambe i modelli presenta la sua classica organizzazione "9+2" (ovvero 9 coppie di microtubuli esterni ed una coppia di microtubuli interni). Associate ai 9 doppietti esterni si trovano 9 fibre dense che nei non passeriformi sono localizzate solo lungo il pezzo intermedio della coda e vengono perse in quello principale, nei passeriformi, invece, sono visibili per quasi l'intera lunghezza della coda. Alle osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione tali fibre nei non passeriformi appaiono meno marcate rispetto a quanto osservato negli "*oscine*".

Nei non passeriformi l'assonema, lungo il pezzo principale della coda, è circondato da una guaina fibrosa, che invece, non è presente nei passeriformi a nessun livello della coda (Figura 6 D).

In tutte le specie aviarie il diametro della coda dello spermatozoo diminuisce progressivamente fino ad arrivare al pezzo terminale, che risulta estremamente sottile, in quanto è formato esclusivamente dal plasmalemma e dall'assonema. Verso la fine della coda l'assonema perde gradualmente la sua classica organizzazione "9+2".

In tabella 7 vengono riassunti i caratteri distintivi di ciascun raggruppamento:

Carattere	Non-passeriformi	Passeriformi	
		<i>Oscine</i>	<i>Sub-oscine</i>
Acrosoma	Struttura conica, di lunghezza minore rispetto al nucleo	Struttura elicoidale, di lunghezza maggiore rispetto al nucleo	Struttura conica, di lunghezza minore rispetto al nucleo
<i>Perforatorium</i>	Presente	Assente	Assente
Canale endonucleare	Presente	Assente	Assente
Nucleo	Struttura cilindrica	Struttura elicoidale	Struttura elicoidale
Centriolo prossimale	Presente	Assente	Presente
Organizzazione dei mitocondri	Manicotto che circonda il pezzo intermedio	Filamento elicoidale localizzato lungo la coda	Combinazione delle organizzazioni dei non-passeriformi e degli oscine
Fibre dense	Presenti	Presenti	Presenti
<i>Annulus</i>	Presente	Assente	Assente
Guaina fibrosa	Presente	Assente	Assente

Tabella 7: schema riassuntivo dei caratteri distintivi di ciascun raggruppamento

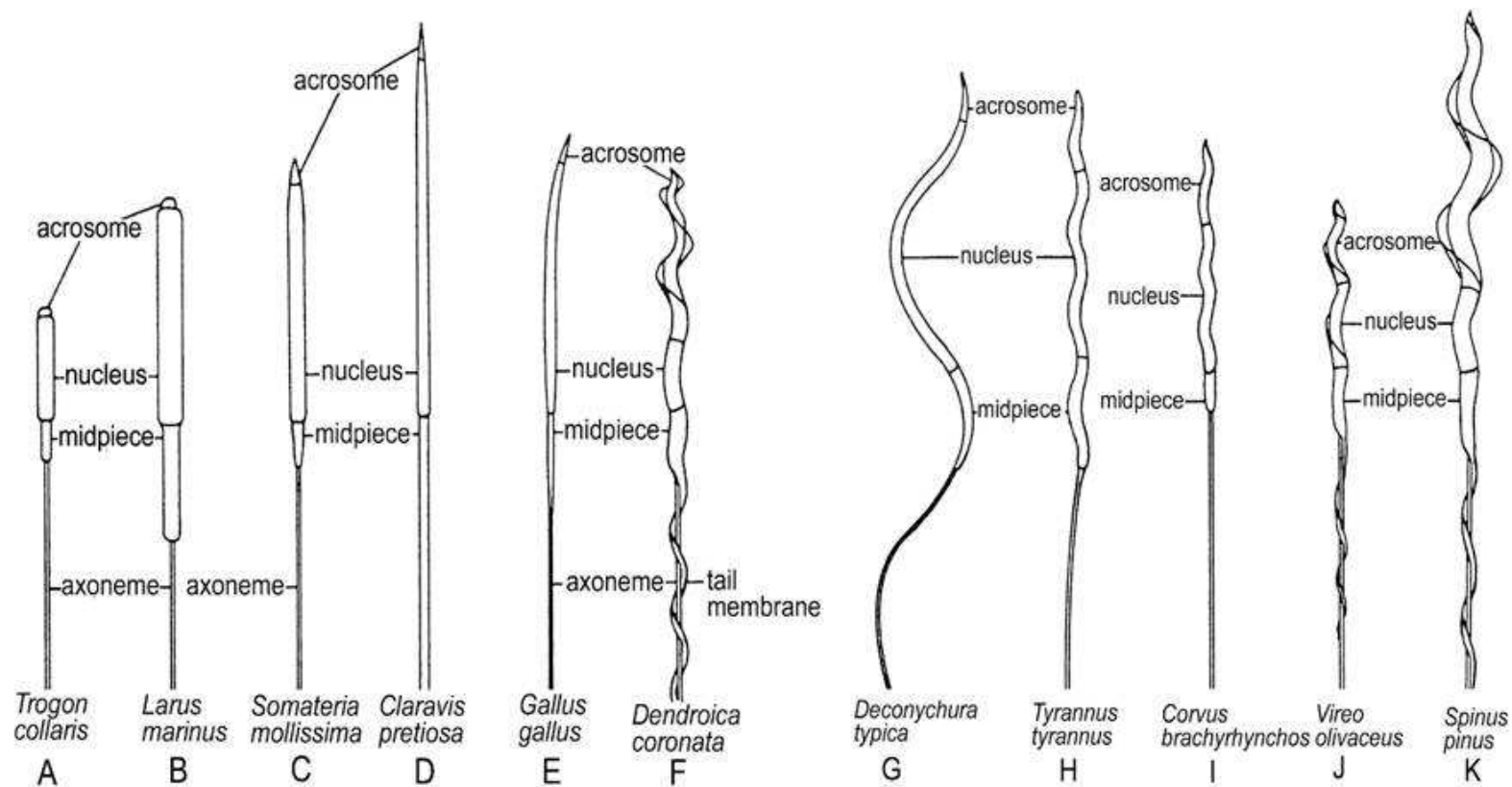


Figura 5: Disegni rielaborati da immagini al microscopio ottico di spermatozoi di diverse specie di uccelli. A. *Trogon collaris*, Trogoniformes. B. *Larus marinus*, Caradriiformi. C. *Somateria mollissima*, Anseriformi. D. *Claravis Pretiosa*, Columbiformes. E. *Gallus gallus*, Galliformi. F. *Dendroica coronata*, Passeriformi. G-K. Variabilità tra gli spermatozoi di specie appartenenti ai passeriformi. G. *Deconychura typica*, Dendrocalaptidae. H. *Tyrannus*, Tyrannidae. I. *Corvus brachyrhynchos*, Corvidae. J. *Vireo olivaceus*, Vireonidae. K. *Cardeulis* (= *Spinus*) *pinus*. Fringillidae. Rietichettato dopo McFarlane, RW 1963. Atti del XIII Internazionale ornitologica Congresso: 91-102, Fig. 1 e 2. La tavola è stata estratta dalla review “Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny” (Jamieson, 2007)

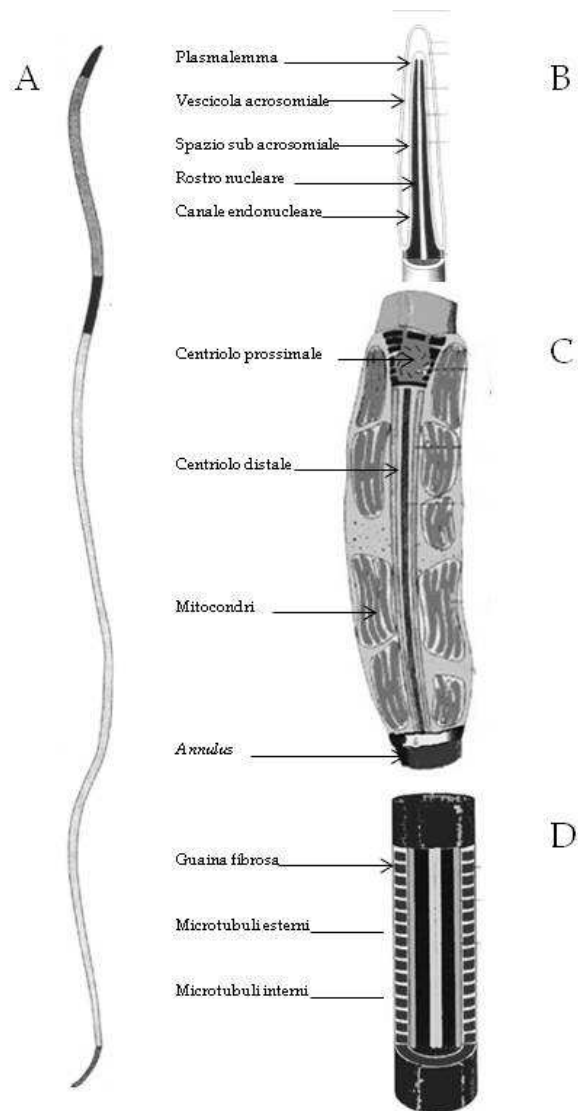


Figura 6: Rappresentazione schematica di uno spermatozoo di struzzo (specie appartenente ai “non-passeriformi”) che illustra le varie componenti della testa (acrosoma e nucleo) e la coda (tratto intermedio, pezzo principale e pezzo terminale). Le tre figure sulla destra mostrano i dettagli, non disegnati alla stessa scala dell’intero spermatozoo (a sinistra). B. Acrosoma. C. tratto intermedio. D. Pezzo principale. Relabeled after Soley, J. 1999. Pp. 129-158. In D. C. Deeming (ed). The Ostrich: Biology, Production and Health, CAB International, Fig. 6.5. La tavola è stata estratta dalla review “*Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny*” (Jamieson, 2007)

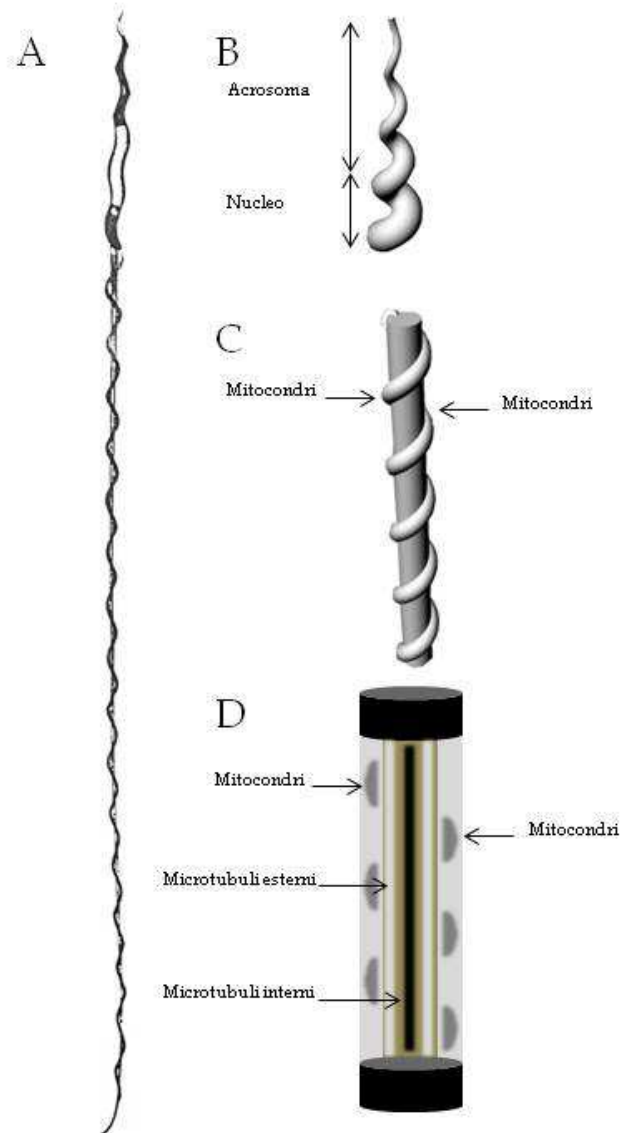


Figura 7: Rappresentazione schematica di uno spermatozoo passeriforme che illustra le varie componenti della testa (acrosoma e nucleo) e della coda. A: immagine dello spermatozoo di *Alauda arvensis* al microscopio ottico. L'immagine è stata estratta dalla review "*Avian Spermatozoa: Structure and Phylogeny*" (Jamieson, 2007). B: Rappresentazione della testa con la tipica forma spiralizzata dello spermatozoo dei passeriformi. C-D: Rappresentazione della coda dello spermatozoo dei passeriformi in cui i mitocondri mostrano la peculiare organizzazione elicoidale caratteristica di questo raggruppamento degli spermatozoi degli uccelli.

1.1.4 Anomalie morfologiche ed ultrastrutturali presenti nello sperma fresco

Attraverso gli studi di microscopia nel liquido seminale degli uccelli, accanto a spermatozoi morfologicamente normali, è possibile osservare anche gameti con una struttura anomala. L'analisi delle anomalie presenti nello sperma fresco riveste grande importanza quando si vogliono intraprendere i processi di crioconservazione e di inseminazione artificiale. Infatti il confronto tra la percentuale e la tipologia di anomalie del liquido seminale fresco e quelle degli spermatozoi dopo il processo di congelamento/scongelo è un ottimo indicatore della qualità del metodo di crioconservazione.

Inoltre una diminuzione della fertilità, fino alla sterilità nei casi più gravi, è stata documentata in diverse specie di mammiferi (Du Plessis *et al.*, 2014; Menkveld, 1991; Feito 1990; Barth *et al.*, 1989; Oetlé *et al.*, 1988; Holstein *et al.*, 1988), compreso l'uomo, in concomitanza ad un'elevata presenza di spermatozoi anomali all'interno del liquido seminale, quindi l'utilizzo di tali eiaculati per l'inseminazione artificiale potrebbe comprometterne il successo.

Lo studio delle anomalie degli spermatozoi presenta diverse difficoltà e tra queste la maggiore è senz'altro la mancanza di un'unica classificazione di tali anomalie sia tra diversi gruppi animali sia all'interno dello stesso gruppo. L'importanza di adottare un unico criterio di classificazione è stata sottolineata da diversi autori (Card, 2005; Graham, 2005; Malmgren *et al.*, 1997) e nel corso degli anni sono stati proposti diversi sistemi di classificazione delle anomalie morfologiche specialmente per i mammiferi (Mocé *et al.*, 2008; Nöthling, *et al.*, 2008; Chenoweth, 2005; Saacke *et al.*, 1994; Menkveld *et al.*, 1991; Barth *et al.*, 1989; Blom *et al.*, 1972).

Tutti questi criteri sono basati su accurate osservazioni al microscopio ottico supportate da numerosi studi ultrastrutturali (Du Plessis *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda gli uccelli, nonostante la presenza di spermatozoi anomali sia stata riportata in numerosi lavori (Łukaszewicz *et al.*, 2008; Stelzer, 2005; Umapathy *et al.*, 2005; Rozenboim, 2003; Alkan *et al.*, 2002; Hemberger *et al.*, 2001; Penfold *et al.*, 2000; Lindsay, 1999; Malecki, 1998; Bertschinger, 1992; Ferdinand 1992; Marquez *et al.*, 1975; Kamar *et al.*, 1972) non c'è uniformità nella descrizione morfologica delle anomalie che spesso vengono descritte con termini talmente diversi che risulta estremamente difficile fare dei confronti significativi. Questa mancanza è notevolmente amplificata dalla carenza di dati ultrastrutturali a supporto di quelli ottenuti al microscopio ottico (Du Plessis *et al.*,

2011). Infatti finora gli studi effettuati al microscopio elettronico a scansione e a trasmissione sulle anomalie presenti nel liquido spermatico degli uccelli sono relativamente pochi (Du Plessis *et al.*, 2014; Hess *et al.*, 1986; Maeda *et al.*, 1986; Bakst *et al.*, 1979; Marquez *et al.*, 1975; Ferdinand 1992; Froman 1987; Bakst *et al.*, 1979; Marett, 1979),

Per esempio per descrivere una delle anomalie maggiormente osservate negli spermatozoi dei non passeriformi (“ripiegamento dello spermatozoo”), sono state utilizzate diverse terminologie. Alcuni autori lo hanno descritto semplicemente come ripiegamento della testa, del pezzo intermedio o della coda in base alla regione dove è localizzata l’anomalia (Penfold *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 1986; Ferdinand, 1992). Altri autori, invece, lo hanno descritto più dettagliatamente definendo anche il grado di flessione (90 ° o 180 °) della testa, del pezzo intermedio o della coda. (Du Plessis *et al.*, 2012; 2011; Tabatabaei *et al.*, 2009; Alkan *et al.*; 2002).

Du Plessis *et al.* (2011) studiando le anomalie presenti negli spermatozoi dell’emu hanno cercato di uniformare le diverse classificazioni proposte e in base alla loro esperienza e a quanto riportato in letteratura hanno ritenuto opportuno sviluppare un sistema basato sulle parti principali dello spermatozoo (testa e coda); e quindi le hanno suddivise in:

- Anomalie della testa
- Anomalie della coda

Inoltre hanno creato una terza categoria *ad hoc* per descrivere la presenza di gocce citoplasmatiche dal momento che questa anomalia può interessare o la testa o il pezzo intermedio della coda o entrambe in contemporanea.

Di seguito vengono descritte le prime due categorie.

Anomalie della testa

Le anomalie della testa possono essere suddivise in base alla loro precisa localizzazione in:

1. Anomalie dell’acrosoma, che può essere:
 - a. Mancante
 - b. Deforme: quando presenta una morfologia diversa rispetto al normale

2. Anomalie del nucleo, con le seguenti morfologie:

- a. Testa ripiegata: con diversi gradi di curvatura;
- b. Testa distaccata: quando la testa e la coda appaiono come due strutture separate;
- c. Assenza della testa: gli spermatozoi presentano collo e coda con morfologia normale ma non hanno la testa;
- d. Arrotondata: il nucleo appare arrotondato piuttosto che cilindrico e di conseguenza anche la testa assume una forma tondeggiante;
- e. Macrocefalo: il nucleo ha dimensioni più grandi rispetto alla media;
- f. Microcefalo: il nucleo ha dimensioni più piccole rispetto alla media.

Anomalie della coda

Similmente a quanto osservato per la testa anche le anomalie della coda possono essere suddivise in base alla loro localizzazione in:

1. Anomalie del collo/pezzo intermedio, che può essere:

- a. Disgiunto: il nucleo è posizionato parallelamente al pezzo intermedio ma è distaccato da quest'ultimo;
- b. Deforme: tale regione presenta una forma diversa rispetto al normale. Una delle maggiori anomalie osservate in questo tratto è la rottura o l'assenza della membrana plasmatica;
- c. Ripiegato: questa regione dello spermatozoo appare ripiegata, con diversi gradi di curvatura.

2. Anomalie del pezzo principale della coda, che può essere:

- a. Ridotto: la coda è notevolmente più corta rispetto al normale;
- b. Multiflagellato: sono presenti due o più flagelli;
- c. Ripiegato: quando la coda appare ripiegata o attorcigliata su se stessa

Infine in alcuni spermatozoi è stata osservata la mancanza della coda. Questa anomalia è spesso in associazione con la mancanza dell'acrosoma.

All'interno del liquido seminale, inoltre, sono stati osservati spermatozoi che presentano in contemporanea più anomalie in diverse regioni della cellula. Tali anomalie sono state classificate da Du Plessis *et al.* (2011) come "Anomalie multiple".

In tabella 8 vengono riassunte le anomalie sopra descritte e le specie di uccelli in cui sono state osservate. Tale tabella è stata elaborata in base a quella riportata nel lavoro di Du Plessis *et al.* (2011) "*Incidence, structure and morphological classification of abnormal sperm in the emu (Dromaius novaehollandiae)*".

Categoria	Regione della cellula	Anomalia specifica	Specie	Referenze
Anomalie della testa	Acrosoma	Mancante	Anatra Tacchino	Ferdinand, 1992 Alkan <i>et al.</i> , 2002
		Deforme	Anatra Tacchino Gallo	Ferdinand, 1992 Alkan <i>et al.</i> , 2002 Tabatabaei <i>et al.</i> , 2009
		Testa ripiegata	Emu Tacchino Anatra	Du Plessis <i>et al.</i> , 2011 Alkan <i>et al.</i> , 2002 Ferdinand, 1992
	Nucleo	Testa arrotondata	Emu	Du Plessis <i>et al.</i> , 2011
		Macrocefalo	Emu	Du Plessis <i>et al.</i> , 2011; Malecki <i>et al.</i> , , 1998
			Ubara	Lindsay, 1999
			Diversi Psittacini	Stelzer, 2005
		Microcefalo	Diversi Psittacini	Stelzer, 2005
		Assenza della testa	Emu	Du Plessis <i>et al.</i> , 2011
		Testa distaccata	Emu	Bertschinger, 1992
			Tacchino Anatra	Alkan <i>et al.</i> , 2002 Ferdinand, 1992

Tabella 8
Contd...

Anomalie della coda	Collo/pezzo intermedio	Disgiunto	Emu	<i>Tabella 8 Contd...</i> Du Plessis <i>et al.</i> , 2011
		Deforme	Emu Tacchino Gallo Anatra	Bertschinger, 1992 Alkan <i>et al.</i> , 2002 Tabatabaei <i>et al.</i> , 2009 Ferdinand, 1992
		Ripiegato	Emu Tacchino Gallo Diversi non-passeriformi e passeriformi	Bertschinger, 1992 Alkan <i>et al.</i> , 2002 Tabatabaei <i>et al.</i> , 2009 Saeki, 1960; Humphreys, 1972
	Pezzo principale	Ridotto	Emu Anatra	Du Plessis <i>et al.</i> , 2011 Ferdinand, 1992
		Multiflagellato	Emu	Du Plessis <i>et al.</i> , 2011
		Ripiegato	Anatra Grifone indiano Gallo	Ferdinand, 1992 Umapathy, 2005 Tabatabaei <i>et al.</i> , 2009
		Mancanza della coda	Tacchino Anatra	Tabatabaei <i>et al.</i> , 2009 Ferdinand, 1992
Gocce citoplasmatiche	Diverse regioni dello spermatozoo		Emu	Du Plessis <i>et al.</i> , 2011
Anomalie multiple	Diverse regioni dello spermatozoo		Emu	Du Plessis <i>et al.</i> , 2011

Tabella 8: Classificazione delle anomalie degli spermatozoi degli uccelli rielaborata in base a quella riportata da Du Plessis *et al.* (2011) in “*Incidence, structure and morphological classification of abnormal sperm in the emu (Dromaius novaehollandiae)*”

1.1.5 La crioconservazione degli spermatozoi

La crioconservazione degli spermatozoi di animali domestici rappresenta, insieme all'inseminazione artificiale, una delle biotecnologie maggiormente utilizzate per il mantenimento della biodiversità genetica e per la salvaguardia delle specie in via d'estinzione (Blesbois, 2007).

La crioconservazione degli spermatozoi è diventato un argomento di notevole interesse dal 1776 quando Spallanzani ha condotto con successo un esperimento di inseminazione artificiale in un cane, riuscendo ad ottenere 6 nuovi nati. Da allora sono stati fatti numerosi tentativi di conservazione degli spermatozoi in diverse specie animali (Tajima, 2013).

Per quanto riguarda le specie aviarie, la messa a punto di un protocollo idoneo per la crioconservazione degli spermatozoi di pollo è stato un argomento fondamentale all'interno della comunità scientifica per quasi 100 anni. Luyet e Gehenio (1940), nella loro monografia sugli effetti delle basse temperature sulle uova di gallina riportano le prime osservazioni, effettuate da Atkins (1909) e Moran (1925). Dopodichè i primi studi sulla crioconservazione degli spermatozoi di uccelli risalgono al 1941 quando Shaffner *et al.* hanno dimostrato che è possibile ottenere delle uova di gallina fertili utilizzando spermatozoi di pollo congelati.

Dal 1949, anno in cui Polge *et al.* hanno casualmente scoperto gli effetti benefici dell'utilizzo del glicerolo nel processo di crioconservazione degli spermatozoi, sono stati condotti numerosi studi con lo scopo sia di migliorare e standardizzare i metodi per la conservazione dei gameti maschili sia di ampliare il campo di applicazione della crioconservazione degli spermatozoi a diverse specie animali.

La crioconservazione degli spermatozoi è un processo “non-fisiologico” che richiede un elevato livello di adattamento delle cellule agli shock termici e osmotici che si verificano durante l'intero processo di congelamento e scongelamento che comprende diverse fasi che vanno dalla preparazione e diluizione del liquido seminale fino al mantenimento delle funzionalità degli spermatozoi scongelati (Blesbois *et al.*, 2011). La preparazione delle cellule per la crioconservazione richiede l'aggiunta delle seguenti sostanze:

- a) diluente: soluzione salina in grado di contrastare l'azione di eventuali sostanze tossiche e di riprodurre in vitro, anche a basse temperature, un'ambiente (pH, osmolarità, fonte energetica) idoneo alla sopravvivenza degli spermatozoi integri e funzionali anche a basse temperature;

- b) crioprotettore: sostanza che permette di ridurre al minimo i danni causati alla cellula dai cristalli di ghiaccio che si formano durante il processo di crioconservazione, e di regolare i cambiamenti di fase indotti dalle variazioni di temperatura. Il crioprotettore, tuttavia, può avere anche degli effetti negativi per la cellula, specialmente a livello osmotico; quindi nella scelta di tale sostanza vanno presi in considerazione sia i possibili effetti tossici che può avere per la cellula sia le eventuali interazioni con il metabolismo intracellulare (Blesbois, 2011).

Inoltre, i lipidi delle membrane biologiche e degli organelli subcellulari hanno delle frazioni di acidi grassi polinsaturi, e delle temperature di transizione di fase altamente specie-specifiche che li rendono estremamente sensibili agli stress osmotici e termici provocati dal processo di crioconservazione (Blesbois, 2011).

Quindi il protocollo di crioconservazione ideale è quello che permette di conservare nel maggior numero di spermatozoi possibili l'integrità delle diverse strutture cellulari, ed in particolar modo della membrana (Madeddu *et al.*, 2008).

Negli uccelli, la crioconservazione degli spermatozoi presenta notevoli difficoltà ed anche nei casi in cui si sono avuti dei risultati positivi è stata osservata un'elevata percentuale (30-70) di spermatozoi morti dopo il processo di congelamento/scongelo (Blesbois, 2011). Tali difficoltà sono dovute all'elevata specie-specificità della capacità di risposta al congelamento (Massip *et al.*, 2004), ed alle particolari caratteristiche fisiologiche degli spermatozoi degli uccelli (Madeddu *et al.*, 2008). Questi ultimi, infatti, a differenza di quelli di toro, ariete e verro, hanno un minor volume citoplasmatico; questo può comportare una minore capacità da parte degli spermatozoi degli uccelli di far penetrare il crioprotettore e quindi di sopravvivere al processo di congelamento. Inoltre la coda dello spermatozoo è piuttosto lunga (Thurston e Hess, 1987), approssimativamente 8 volte la lunghezza della testa e questo rende gli spermatozoi degli uccelli più suscettibili ai danni del congelamento (Donoughe e Wishart, 2000).

In particolare le maggiori criticità che si incontrano durante il processo di crioconservazione degli spermatozoi sono le seguenti (Madeddu *et al.*, 2008; Blesbois, 2011; Bellagamba *et al.*, 1993):

1. Scelta del diluente e del crioprotettore. Il diluente deve avere proprietà fisiche compatibili con la sopravvivenza degli spermatozoi e quindi si deve trovare

nell'intervallo di osmolarità compreso tra 320 e 450 milliosmoli e nel range di pH che va da 6.8 a 7.4. L'utilizzo del crioprotettore è indispensabile nel processo di crioconservazione degli spermatozoi (Fujihara e Buckland, 1987; Mitchell *et al.*, 1977) e la scelta della sostanza da utilizzare e della sua concentrazione è una fase estremamente critica nella procedura di crioconservazione;

2. Metodo di prerefigerazione del materiale seminale;
3. La curva di temperatura del processo di congelamento/scongellamento;
4. I contenitori utilizzati per lo stoccaggio degli spermatozoi in quanto influenzano notevolmente la curva di temperatura;
5. La procedura di scongelamento.

A livello cellulare le maggiori problematiche che si possono incontrare durante il processo di crioconservazione degli spermatozoi sono le seguenti (Blesbois, 2011; Madeddu *et al.*, 2008):

1. Il mantenimento del metabolismo energetico. Gli spermatozoi aviani possiedono scarse riserve energetiche quindi il metabolismo energetico deve essere mantenuto inalterato prima, durante e dopo la conservazione in vitro;
2. L'integrità della membrana plasmatica. I danni alla membrana plasmatica, causati dal processo di crioconservazione, provocano una diminuzione della capacità degli spermatozoi di sopravvivere all'interno dei tubuli di raccolta dello sperma e quindi un decremento della fertilità. Tale perdita può essere solo parzialmente compensata aumentando la concentrazione dei campioni utilizzati e la frequenza delle inseminazioni;
3. Il mantenimento della reazione acrosomiale. Negli uccelli questa reazione può essere indotta in vitro molto rapidamente, quindi durante il processo di crioconservazione bisogna far in modo di non far avvenire tale reazione.

Da quando Shaffner *et al.*, (1941) hanno dimostrato che era possibile fecondare le uova di gallina con spermatozoi di pollo congelati/scongellati semplicemente senza l'aggiunta di crioprotettore e diluente, senza ottenere però dei nuovi nati, numerosi protocolli di crioconservazione sono stati messi a punto sia su specie domestiche di interesse commerciale (Varadi *et al.*, 2013; Blanco *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2011; Massip *et al.*,

2004; Blesbois e Labbé, 2003; Penfold, 2001; Donoghe e Wishart 2000; Surai e Wishart 1996; Hammerstedt, 1995; Bellagamba *et al.*, 1993; Lake, 1986), sia su specie selvatiche (Kowalczyk *et al.*, 2012; Blanco *et al.*, 2011; Madeddu *et al.*, 2008; Umapathy *et al.*, 2005; St. Jalme *et al.*, 2003; Knowles-Brown *et al.*, 2001; Gee *et al.*, 1993, 1985; Brock and Bird, 1991; Samour *et al.*, 1988). Molti di questi metodi sono stati prima messi a punto nel pollo e successivamente applicati ad altre specie. Lake e Stewart (1978) sono i primi ad aver ottenuto dei risultati positivi nella crioconservazione degli spermatozoi di pollo utilizzando il glicerolo come crioprotettore, fiale di vetro come contenitori per lo stoccaggio degli spermatozoi e congelando e scongelando gli spermatozoi lentamente (Blesbois *et al.*, 2011).

Da allora l'efficacia di tale metodo è stata notevolmente aumentata migliorando le curve di temperatura e utilizzando dei capillari di vetro per lo stoccaggio dello sperma anziché delle fiale (Seigneurin and Blesbois, 1995; Long *et al.*, 2004) e cambiando il crioprotettore. Infatti è stato dimostrato che l'immissione nelle vie genitali femminili del glicerolo non permette agli spermatozoi di fecondare l'uovo, quindi quando si utilizzano per l'inseminazione artificiale campioni di spermatozoi crioconservati con questo crioprotettore bisogna prima rimuoverlo attraverso un processo di dialisi (Blesbois *et al.*, 2011; Lake 1986). Gli altri crioprotettori maggiormente utilizzati nei diversi esperimenti di crioconservazione degli spermatozoi degli uccelli sono: il dimetil-acetammide (DMA); il glicol-etilene; il dimetilsolfossido (DMSO), e il dimetilformammide (DMF). Anche per quanto riguarda i diluenti nel corso degli anni ne sono stati sperimentati molteplici con differenti composizione a diversa osmolarità.

In tabella 9 vengono riportati alcuni esempi dei diversi diluenti e crioprotettori utilizzati in differenti specie di uccelli domestici e non:

Specie	Crioprotettore	Diluente	Referenze
<i>Meleagris gallopavo</i>	DMA Glicerolo	Lake ASG	Long <i>et al.</i> , 2014
<i>Falco sparverius</i>	DMA	Lake	Brock <i>et al.</i> , 1991
<i>Tetrao urogallus</i>	DMA	EK diluent	Kowalczyk <i>et al.</i> , 2012
<i>Numida meleagris</i> Tabella 9 Contd...	DMA Glicol-etilene	Lake Lake	Varadi <i>et al.</i> , 2013

	Dimetilformammide	Lake	<i>Tabella 9 Contd...</i>
<i>Gyps bengalensis</i>	DMA	Talp	Umapathy <i>et al.</i> , 2005
<i>Columba livia</i>	DMA	Talp	Sontakke <i>et al.</i> , 2005
<i>Falco peregrinus</i>	DMA	Lake	Blanco <i>et al.</i> , 2000
<i>Gallus gallus</i>	DMA	Lake	Madeddu <i>et al.</i> , 2008
	Glicerolo	Lake	<i>Tabella 9 Contnd.....</i> Madeddu <i>et al.</i> , 2008
<i>Alectoris barbara</i>	DMA	Lake	Madeddu <i>et al.</i> , 2008
	Glicerolo	Lake	Madeddu <i>et al.</i> , 2008
<i>Gyps fulvus</i>	Glicerolo	Talp	Madeddu <i>et al.</i> , 2008
<i>Anser anser</i>	DMF	EK diluent	Łukaszewicz <i>et al.</i> , 2004

Tabella 9: Esempi dei diversi diluenti e crioprotettori utilizzati in differenti specie di uccelli domestici e non.

1.1.6 Inseminazione artificiale

L'inseminazione artificiale è la tecnica maggiormente utilizzata per la riproduzione assistita in diverse specie selvatiche (Blanco *et al.*, 2009; Lasley *et al.*, 1994).

Nelle specie avicole, il primo esperimento di inseminazione artificiale riuscito con successo risale agli inizi del 1900 quando Ivanov ha ottenuto delle uova di pollo fertili inseminandole con spermatozoi prelevati dai dotti deferenti (Blanco *et al.*, 2009; Quinn e Burrows, 1936).

Sin da quando si è iniziato ad applicare tale tecnica nelle specie animali, grande attenzione è stata posta nello sviluppo di metodiche non invasive che limitassero al minimo lo stress per l'animale: oggi la più utilizzata è quella intravaginale descritta per la prima volta da Quinn e Burrows (1936). In questa metodica il seme viene posizionato a 2-4 cm nell'orifizio vaginale dopo aver delicatamente indotto l'eversione di quest'ultimo con una leggera pressione sull'addome della femmina (Quinn e Burrows, 1936). Tale pressione viene interrotta in contemporanea con la deposizione del seme.

Dal 1936 l'inseminazione artificiale si è notevolmente evoluta e ad oggi è stata applicata in diverse specie appartenenti ai seguenti ordini: Casuariformi, Anseriformi, Falconiformi, Galliformi, Gruiformi, Columbiformi, Psittaciformi e Passeriformi (Scheres, 1998; Stunden *et al.*, 1998; Saint Jalme *et al.*, 1994; Brock, 1991; Gee *et al.*, 1990; Gee, 1994;

1983; Boyd, 1988; Park *et al.*, 1986; Samour *et al.*, 1986; Cain, 1978; Spiller *et al.* 1976; Wentworth and Mellen, 1963). La riproduzione assistita è di fondamentale importanza nei programmi di salvaguardia di specie selvatiche che sono a rischio estinzione per diverse ragioni quali: la mancanza di una coppia stabile al momento dell'ovodeposizione da parte della femmina, maschi particolarmente aggressivi o con disabilità fisiche, inizio della stagione riproduttiva in ritardo rispetto alle femmine (Blanco *et al.*, 2009). Sebbene molte di queste specie vengano preservate grazie agli allevamenti in cattività, si possono presentare altre problematiche quali, ad esempio, una gestione sbagliata dell'allevamento che può portare carenze nutrizionali e malattie, arrivando a compromettere spesso la fertilità sia nei maschi che nelle femmine. Tutti i problemi sopraelencati possono essere affrontati e superati con un'attenta applicazione dell'inseminazione artificiale che, tra l'altro, può essere effettuata anche con spermatozoi crioconservati oltre che con quelli "freschi". Finora l'inseminazione artificiale, mediante l'impiego di seme scongelato, è stata applicata (ottenendo anche la schiusa delle uova) è stata applicata ad un numero limitato di specie selvatiche tra cui il gheppio americano (Gee *et al.*, 1993; Brock *et al.*, 1991), la grù canadese (Gee *et al.*, 1985; Sexton and Gee, 1978), l'oca del Canada (Gee and Sexton, 1990), il passero domestico (Gee, 1983) e il parrocchetto ondulato (Samour *et al.*, 1988), il codone comune (Penfold *et al.*, 2001), l'oca selvatica (Lukaszewicz *et al.*, 2004), e il gallo cedrone (Kowalczyk *et al.*, 2012). Sebbene negli ultimi anni siano stati fatti numerosi progressi nella messa a punto delle metodiche di inseminazione artificiale, questa tecnica presenta ancora due criticità fondamentali. La prima è rappresentata dalla scarsa conoscenza sulla stagionalità, sulla ciclicità, sulla durata della fertilità e sui comportamenti di copula delle diverse specie di uccelli. Tali fattori sono altamente specie-specifici (Blanco *et al.*, 2000-2009) e quindi prima di intraprendere il processo di inseminazione artificiale in una determinata specie andrebbero studiati approfonditamente. La seconda criticità riguarda i maschi, dai quali si deve ottenere seme di buona qualità: succede invece, in particolare nelle specie di uccelli selvatici, che gli eiaculati ottenuti siano poco concentrati e contaminati da feci e urine, per cui poco utili per l'inseminazione artificiale. Per quanto riguarda le femmine, invece come descritto in precedenza, la criticità maggiore è quella di ridurre al minimo lo stress per l'animale. Queste problematiche possono essere risolte utilizzando esemplari "imprantati" tra i quali è stato osservato che i maschi rilasciano eiaculati maggiormente concentrati, mentre le femmine anticipano la stagione riproduttiva e depongono più uova (Blanco *et al.*, 2009).

1.2 L'astore (*Accipiter gentilis*)

1.2.1 Distribuzione e sistematica



Figura 8: Astore (*Accipiter gentilis*), Centro “European falcons”

L'astore (*Accipiter gentilis* - Linnaeus 1758) (Figura 8), è un rapace appartenente all'ordine dei Falconiformes (famiglia Accipitridae): in tutto il mondo esistono circa 8-12 sottospecie (Squires e Reynolds, 1997; Del Hoyo *et al.*, 1994; Brown e Amadon;1968). È stato stimato che la popolazione mondiale di *Accipiter gentilis* è di circa 500.000 individui (Rich *et al* , 2004) ed è distribuito in quasi tutta la regione paleartica (Gensbol, 1992) e nel Nord America dove la sua presenza è limitata alle foreste vergini. In Europa manca in Islanda, in Irlanda e in alcune isole del Mediterraneo (Figura 9).

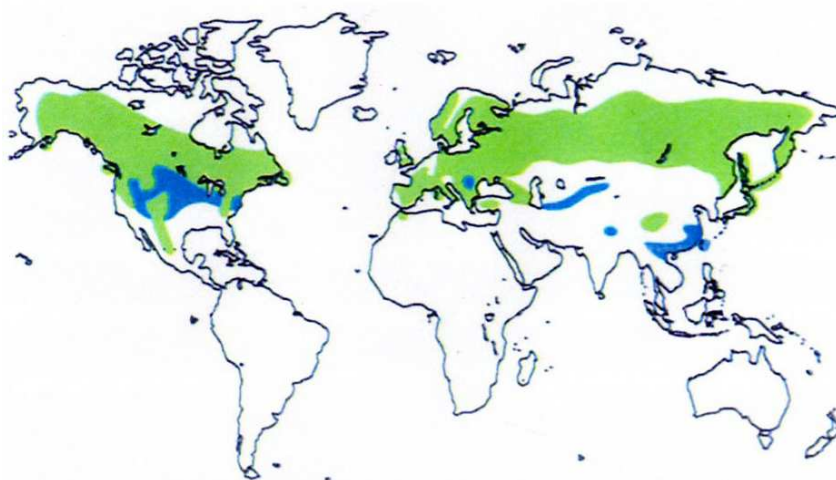


Figura 9: Distribuzione mondiale dell'astore

In Italia, sono presenti 2 sottospecie di astore: *A. gentilis gentilis* nel continente e *A. gentilis arrigonii* in Sardegna. In particolare l'astore nidifica sull'arco alpino, con maggiore densità nel settore centro-orientale (Benussi e Zanghellini in Brighetti, 1986). Lungo l'Appennino fino in Calabria ha una distribuzione frammentaria (Schenk, 1976). È diffuso nelle zone montane, soprattutto in una fascia compresa tra i 1200 e i 1500 m s.l.m. mentre è quasi totalmente assente nella Pianura Padana (Venditti, 2007). In presenza di boschi d'alto fusto, a ridosso del mare nell'Italia nordorientale (Carso triestino) sono stati segnalati esemplari di astore a quote molto basse (in media 380 m) (Benussi e Perco, 1984). In Liguria è presente ad altitudini tra i 300 e i 1500 m s.l.m. (Pieretti e Silveri in AA.VV., 1989), mentre in Sardegna la specie è presente ad altitudini tra i 300 e i 1000 m s.l.m. (Murgia *et al.*, 1988) (Figura 10).

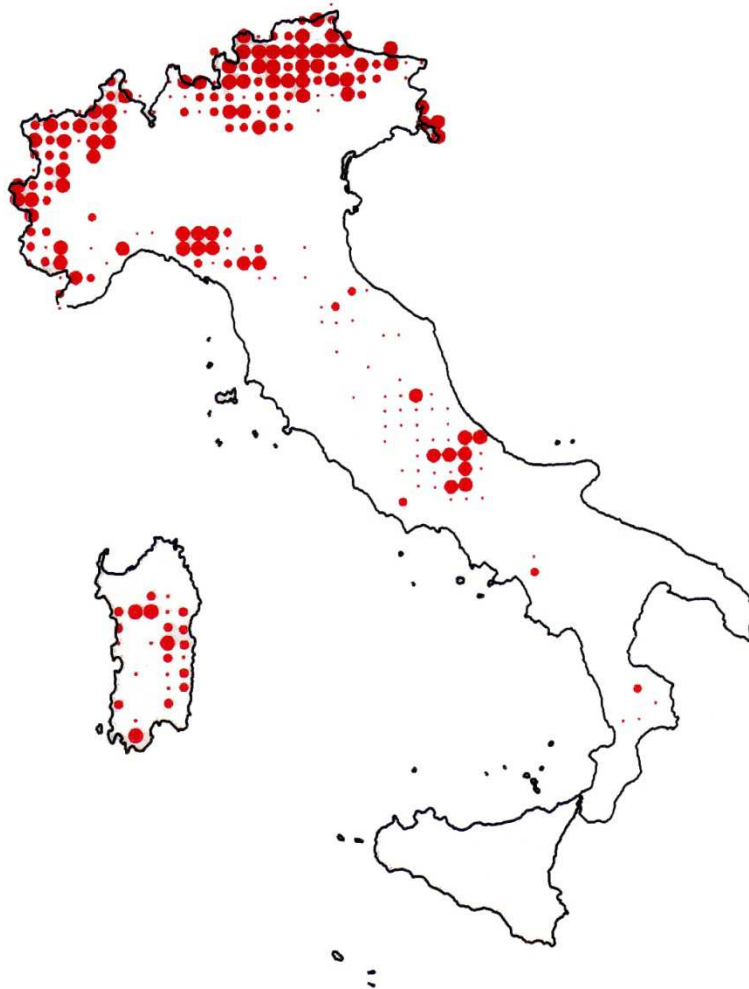


Figura 10: Distribuzione dell'astore in Italia

1.2.2. Descrizione della specie

Le specie appartenenti alla famiglia Accipitridae differiscono da quelle della famiglia Falconidae per il comportamento, il carattere, il tipo di volo e la tecnica di caccia. Le tonalità del piumaggio variano in base all'età, al sesso e alla provenienza geografica (Figura 11):



Figura 11: *Accipiter gentilis albidus* in cui sono ben evidenti le diverse tonalità del piumaggio rispetto a quelle degli astori che vivono alle nostre latitudini.

Negli adulti (Figura 12 A-B) la gola si presenta biancastra, il petto e l'addome bianchi con delle striature nere trasversali, la coda grigio scura e il sottocoda bianco. La parte superiore delle ali e il dorso sono di colore grigio ardesia mentre nella zona ascellare ritroviamo le stesse striature nere del petto. La testa è nero ardesia con sopracciglia bianche. Nei maschi le parti superiori del corpo sono grigio ardesia scuro, il cappuccio e il sopracciglio sono ben definiti (Figura 12 A). Nelle femmine, invece, la parte superiore è grigio-bruno, e il cappuccio e il sopracciglio sono meno definiti (Figura 12 B). Gli occhi negli adulti sono di color arancio (Figura 12 A-B).



Figura 12: Maschio (A) e femmina di astore (B) in cui sono ben visibili le differenti colorazioni del piumaggio della parte superiore del corpo (grigio-ardesia per il maschio e grigio-bruno per la femmina)

Negli esemplari più giovani, invece, le parti superiori del corpo sono marrone scuro mentre il petto e l'addome variano da bianco sporco a crema e rossiccio con striature verticali grigie o marrone scuro. Gli occhi, invece, possono variare da grigio a giallo pallidi con cera giallo verdognola (Figura 13) (*Osservazioni fatte presso il Centro "European Falcons" di Assisi*).



Figura 13: Giovane di astore in cui è ben visibile la differente colorazione rispetto agli esemplari adulti illustrati in figura 12

L'astore ha una struttura tale da renderlo sicuramente il più temibile predatore del bosco. In volo le ali sono larghe e arrotondate; la coda è lunga e larga con gli angoli smussati. Le penne remiganti invece, conferiscono all'animale un caratteristico profilo a "S" del bordo alare posteriore (Figura 14). Gli astori hanno un numero inferiore di penne remiganti secondarie rispetto alle aquile e agli avvoltoi che presentano ali più lunghe.



Figura 14: astore in volo

1.2.3. Biologia ed ecologia

L'astore abitualmente vive nei boschi di latifoglie, conifere o misti, e i nidi sono solitamente posti sui versanti nord nella parte centrale della chioma. Negli ultimi decenni la specie ha iniziato a colonizzare anche ambienti urbani di tutta l'Europa (Rutz *et al.*, 2006) e attualmente occupa l'intera gamma degli habitat (Altenkamp, 2002; ; Rutz ,2001; Würfels, 1999). Comunemente gli astori e altri rapaci nidificano gli uni vicini agli altri (Reynolds e Wight, 1978).

L'astore è una specie stanziale ad eccezione degli individui nidificanti nelle quote più alte, che possono compiere migrazioni verticali durante l'inverno in coincidenza con una minore disponibilità di prede (Spagnesi *et al.*, 2004). I giovani tendono a spostarsi più lontano rispetto agli adulti, e i giovani maschi tendono a spostarsi maggiormente rispetto

alle femmine, mentre i maschi adulti sono più sedentari rispetto alle femmine. La maggior parte delle coppie ritorna nei territori di nidificazione da marzo (Dewey *et al.*, 2003; Roberson, 2001; Reynolds e Wight, 1978; Beebe, 1974; Zirrer, 1947) ai primi di aprile (Dewey *et al.*, 2003; McGowan, 1975).

La costruzione del nido è operata dal maschio. E' stato osservato che i maschi più giovani hanno un tasso più elevato di fallimento rispetto ai più anziani (Tottrup Nielsen *et al.*, 2003). Anche se l'astore solitamente utilizza lo stesso nido per diversi anni nell'areale di nidificazione è possibile trovare da uno a otto nidi alternativi posizionati mediamente a 400 metri l'uno dall'altro (Dewey *et al.*, 2003; Woodbridge e Detrich, 1994; Reynolds *et al.*, 1994). Il fallimento della nidificazione può essere dovuto a vari fattori, quali: disturbo umano, deforestazione (Hoglund, 1964; Hennessy, 1978; Buhler *et al.*, 1987); predazione da parte del gufo reale (*Bubo bubo*) che nel corso di diverse notti consecutive può mangiare l'intera covata di astori (Tella e Manosa, 1993); predazione delle aquile reali che uccidono gli astori in svernamento (Squires e Ruggiero, 1995); intemperie (Hennessy, 1978; Boal *et al.*, 2002) e scarsità di cibo.

Beier e Drennan (1997) e Drennan e Beier (2003), nei loro studi, sono giunti alla conclusione che gli astori non selezionano le aree di foraggiamento in base all'abbondanza di prede, ma piuttosto in base alla densità degli alberi, in quanto le caratteristiche morfologiche ed il comportamento della specie sono adatti per la caccia in foreste mature moderatamente dense. L'astore è un predatore opportunisto e la tipologia di preda varia a seconda della stagione, della zona e della disponibilità. Tra gli alimenti principali troviamo piccoli o medi mammiferi come scoiattoli, conigli, lepri. (Squires e Reynolds, 1997). Tuttavia gli uccelli come cornacchie, colombi, colombacci, allocco, gufo comune, gheppio, e galliformi di grandi dimensioni (come il gallo cedrone) sono le sue prede preferite e costituiscono il 60% della sua dieta. Raramente si nutre di rettili ed insetti. In periodi dove la disponibilità di prede è minore è in grado di adattarsi perfettamente alla disponibilità di cibo nutrendosi anche di qualche carogna. La preda viene attaccata con le zampe e uccisa. Gli artigli del primo e secondo dito sono molto forti e vengono infilzati nell'animale finché questo non smette di muoversi. Una volta catturata la preda, le carcasse vengono divorate a terra (Figura 15) o sopra i rami più bassi degli alberi, tranne che nel periodo di riproduzione, dove tutte le prede vengono consumate direttamente nelle vicinanze del nido (Venditti, 2007). L'astore ha un territorio di caccia molto ampio, e la distanza alla quale cacciano i maschi dai loro nidi dipende dall' habitat, dalla grandezza dell'areale di

nidificazione, e dalla densità di prede (US Fish and Wildlife Service, 1998). Nelle aree dove è presente con molti individui l'astore è in grado di regolare le popolazioni delle sue prede (Tornberg, 2001).



Figura 15: terzuolo di astore su cornacchia

Gli astori iniziano la loro attività riproduttiva in un'età compresa tra 1 e 4 anni (Fischer, 1983; Cramp e Simmons, 1980; Glutz *et al.*, 1971). I rituali del corteggiamento degli astori possono variare a seconda della territorialità. Gli individui stanziali avviano il corteggiamento all'inizio della stagione, e molto prima rispetto ai migranti (Dewey *et al.*, 2003).

L'accoppiamento è breve ma con una frequenza elevata (Moller, 1987, Palmer, 1988) e il momento della giornata in cui sono stati registrati un numero maggiore di accoppiamenti è il mattino. I due sessi hanno ruoli distinti durante la stagione riproduttiva. I maschi si occupano di procurarsi il cibo per loro e per le femmine che si occupano della cova delle uova e della cura dei piccoli.

Gli astori effettuano un'unica covata l'anno (Glutz *et al.*, 1971) producendo una quantità di uova che varia da 2 a 5 che vengono covate per 34-36 giorni (Arcioni, 2010).

Le uova (Figura 16) hanno una forma leggermente ellittica (Palmer, 1988) La schiusa delle uova all'interno della stessa covata avviene in modo asincrono (Kenward, 2006).



Figura 16: Uova di astore deposte dalle femmine allevate presso il Centro “European Falcons”

I due sessi hanno ruoli distinti nell’ accudire i piccoli: mentre il maschio si occupa della caccia e quindi di reperire il cibo, la femmina trascorre la maggior parte del suo tempo all'interno o vicino al nido ed è l'unica responsabile dell'alimentazione e del riscaldamento dei piccoli (Figura 17) (Squires e Reynolds, 1997; Kenward, 2006). Le femmine sono estremamente aggressive nel difendere i nidi dagli intrusi.



Figura 17: Femmina di astore che si occupa del piccolo presso il Centro “European Falcons”

Il periodo neonatale è molto importante in quanto è quello durante il quale i giovani imparano a cacciare e difendersi (Reynolds *et al.*, 1992). Quando i piccoli diventano indipendenti e iniziano ad alimentarsi da soli, si sviluppa rapidamente tra i membri della covata una gara per l'accesso al cibo. In genere i giovani astori di maggiori dimensioni hanno accesso al cibo prima di quelli più piccoli. Dopo aver trascorso più di un mese nel nido, i piccoli iniziano a volare ad una età di 44-46 giorni (Kenward *et al.*, 1993). Durante

il periodo in cui i piccoli dipendono ancora dalle cure parentali le loro attività sono concentrate vicino ai nidi, ma con il passare del tempo iniziano ad allontanarsi sempre di più (Kennedy e Ward; 2003; Kennedy *et al.*, 1994; Kenward *et al.*, 1993; Zachel, 1985). In questo periodo gli adulti possono continuare a nutrire i piccoli ma portando loro la preda lontano dal nido. Dopo l'involto i fratelli di entrambi i sessi spesso rimangono insieme, in gruppo coeso, nei pressi del nido fino alla dispersione (Kenward *et al.*, 1993 a; Reynolds e Wight, 1978). L'area post-involto è molto importante in quanto viene utilizzata dai genitori per insegnare ai piccoli le tecniche di difesa dai predatori e per fornire loro le prede su cui apprendere le opportune competenze per la caccia. Quindi quest'area viene utilizzata dalla famiglia dalla nascita dei piccoli fino a che i giovani non diventano completamente autonomi (Kennedy *et al.*, 1994; Reynolds *et al.*, 1992). Il numero dei piccoli nati che raggiungono l'involto aumentano gradualmente fino a raggiungere un picco massimo intorno al 6°-7° anno di età della femmina, dopodiché è stato osservato un declino (Sæther, 1990). Una possibile spiegazione a questo fenomeno potrebbe essere che con l'avanzare dell'età le femmine acquisiscono maggiori competenze nel procurarsi il cibo (Wunderle, 1991). La capacità riproduttiva ed il tasso di crescita sono influenzate notevolmente anche dalla qualità del territorio: habitat eterogenei e qualitativamente migliori, contribuiscono ad innalzare questi due parametri. Byholm *et al.*, (2007) hanno dimostrato che coppie di astori presenti in territori qualitativamente migliori producono più prole rispetto a coppie presenti in zone aride. Anche le variazioni annuali delle condizioni climatiche possono influenzare la produttività e altri parametri demografici (Elkins, 1983).

Gli astori, al di fuori della stagione riproduttiva, sono animali schivi e solitari e non accettano che altri individui invadano i loro spazi. Durante la migrazione possono essere osservati con altri rapaci ma questa interazione non viene considerata come un comportamento sociale. I membri di una coppia durante l'inverno non interagiscono tra loro dal momento che spesso utilizzano aree di svernamento diverse. Dopo l'involto i piccoli di una stessa covata rimangono uniti vicino al nido (Kenward *et al.*, 1993 a; Reynolds and Wight, 1978)

1.2.4 Conservazione e gestione

Le popolazioni di astore nel 19° e nel 20° secolo hanno subito un rapido declino a causa della deforestazione, dell'alterazione degli habitat, della perdita di biodiversità delle

specie arboree e degli incendi (Birdlife International, 2013). Questo calo ha subito una notevole accelerazione tra il 1950 e il 1960 a causa dell'aumento esponenziale dell'uso dei fitofarmaci, dei pesticidi e dei metalli pesanti (Birdlife International, 2013). Ulteriori minacce per questa specie sono rappresentate dai cambiamenti climatici (Herfindal *et al.*, 2014) e dagli impianti eolici (Strix, 2012).

Nonostante questi fattori di minaccia il trend delle popolazioni di astore negli ultimi anni è risultato stabile e, dal momento che non raggiunge le condizioni (areale ristretto - <20,000 km²; declino della popolazione - >30 negli ultimi dieci anni; ridotto numero di individui - < 10,000 individui adulti) per essere classificata entro una delle categorie di minaccia viene considerato dallo IUCN a minore preoccupazione. Tuttavia, nonostante questi dati, considerati i numerosi fattori che minacciano le popolazioni di astore e che, solo nell'ultimo anno due specie appartenenti al genere *Accipiter* sono passate da specie a "minore preoccupazione" a "prossime alla minaccia", anche per questa specie vanno adottate delle misure di salvaguardia a scopo precauzionale, ed una di queste è senza dubbio l'allevamento in cattività.

I primi allevamenti in cattività di questa specie risalgono alla fine degli anni settanta, quando con la ratifica della Conservazione di Washington sul commercio degli animali selvatici, ne è stato vietato il prelievo in natura.

L'astore non è un rapace "facile" da allevare a causa del suo particolare temperamento comportamentale infatti l'aggressività fra i due partners durante il corteggiamento crea grossi problemi di convivenza in voliera. Nel corso degli anni è stata sperimentata la riproduzione "naturale" sia in voliera condivisa dai partners, sia in voliere separate da finestra mobile ma i risultati sono risultati scarsi e sporadici. Quindi l'ideale sarebbe lavorare con esemplari imprintati che sono molto più tranquilli rispetto a quelli non imprintati.

In Europa sono presenti 26 allevamenti di astore e di seguito viene fornito il dettaglio per ogni nazione (<http://www.falconry.ca>).

Austria: 4; Belgio: 4; Germania: 2; Olanda: 3; Italia: 1; Portogallo: 1; Spagna: 1; Francia: 1; Scozia: 1; Inghilterra: 6; Irlanda: 1; Scozia: 1

1.3 Il fagiano (*Phasianus colchicus mongolicus*)

1.3.1 Distribuzione e sistematica



Figura 18: Fagiano (*Phasianus colchicus*)

Il fagiano comune (*Phasianus colchicus* – Linnaeus 1758), (Figura 18) è un galliforme selvatico appartenente all'ordine dei Galliformes (famiglia Phasianidae) originario dell'Asia. Ne esistono circa 30 sottospecie che sono state raggruppate in 5 gruppi distinti: A) gruppo “*colchicus*” (4 sottospecie); B) gruppo “*principalis-chrysomelas*” (6 sottospecie); C) gruppo “*mongolicus*” (2 sottospecie); D) gruppo “*tarimensis*” (1 sottospecie); E) gruppo “*torquatus*” (17 sottospecie) (Figura 19) (Cocchi *et al.*, 1998).

La sua ampia distribuzione geografica ha fatto sì che ad oggi il fagiano venga considerato una specie cosmopolita. È diffuso in quasi tutte le regioni temperate occidentali quali: Europa, America del Nord (Stati Uniti e Canada), America del Sud, Australia e Nuova Zelanda (Draghi, 2007) (Figura 19).

Tra i galliformi selvatici, è una delle specie maggiormente diffusa in Europa centrale e nelle regioni centro settentrionali dell'Italia dove è stato introdotto all'epoca dei Romani con scopi alimentari e ornamentali (Draghi, 2007).

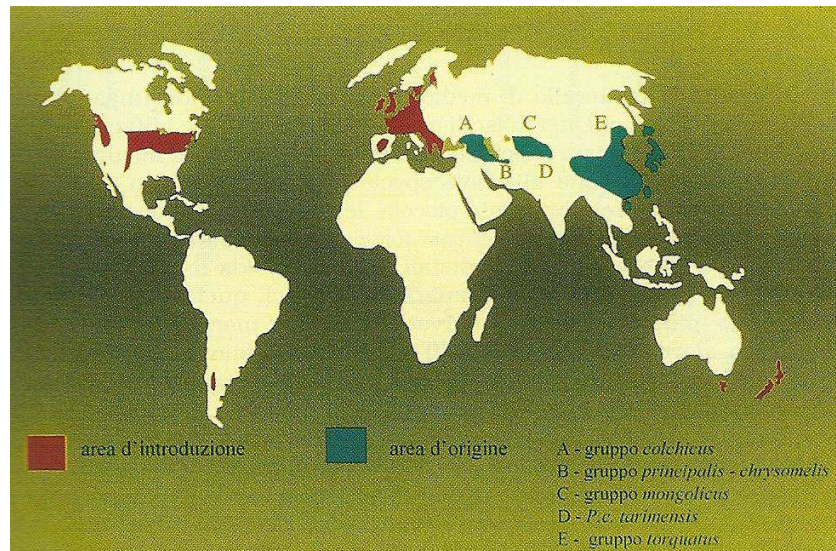


Figura 19: Area di origine e di introduzione dei gruppi sottospecifici di *Phasianus colchicus* (Cocchi *et al.*, 1998)

In Italia (Figura 20) occupa quasi tutti gli ambienti della penisola che si estendono dal livello del mare fino ad altitudini massime di 1500 m s.l.m. (Peraro, 2014; Draghi, 2007). Le sottospecie introdotte in Italia appartengono ai gruppi “*colchicus*”, “*mongolicus*”, “*torquatus*” (Meriggi, 1992).



Figura 20: Areale di distribuzione del fagiano (Cocchi *et al.*, 1998)

1.3.2 Descrizione della specie

Il fagiano comune è un'uccello di medie dimensioni con una lunga coda in entrambi i sessi, ed un elevato dimorfismo sessuale. I maschi presentano un piumaggio con colori molto vivaci (blu-verde-violaceo cangiante, fulvo-rossiccio brillante, bianco) mentre le femmine sono molto più piccole rispetto ai maschi e il loro piumaggio va dal beige al bruno (Figura 21).

Nei maschi adulti l'occhio è circondato da un'ampia area papillosa di colore rosso scarlatta, in parte erettile, che forma due pieghe più o meno accentuate che scendono posteriormente e lateralmente al becco. Tale area papillosa non è presente nelle femmine. Sia i maschi che le femmine adulte presentano il becco di colore avorio, tarsi e dita grigiastre e l'iride che varia dal giallo dorato al rosso-arancio-bruna (Meriggi, 1992).

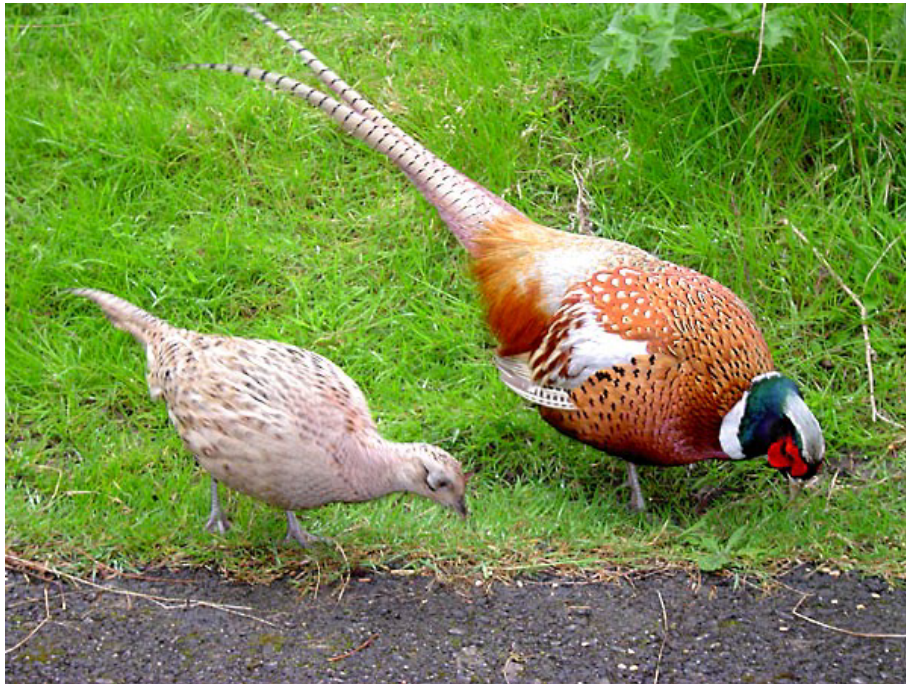


Figura 21: fagiano maschio e femmina in cui appare ben evidente il dimorfismo sessuale

Nei giovani il piumaggio è simile a quello della femmina adulta (Figura 22). La distinzione tra maschi e femmine diventa evidente dopo la muta post-giovanile che i piccoli iniziano dopo 23 giorni dalla nascita (Meriggi, 1992).



Figura 22: giovane di fagiano

1.3.3. Biologia ed ecologia

Il fagiano comune può essere considerato un generalista a livello di habitat. Lo si può trovare in diversi ambienti quali ad esempio campi coltivati (soprattutto a cereali), golene fluviali, boschi di limitata estensione, parchi, pioppeti e margini degli stagni (Bonora, 1994). Tuttavia, le sue condizioni ottimali sono gli ambienti con diverse tipologie di vegetazioni quali ad esempio aree coltivate alternate ad incolti, siepi e piccoli boschi cedui. Durante il periodo riproduttivo è stato osservato che le femmine preferiscono gli incolti e i campi in cui vengono coltivate specie erbacee a rotazione (mais, cereali e foraggiere). I maschi invece durante la stagione degli amori preferiscono i boschi naturali e i pioppeti (Draghi, 2007).

Tra le coltivazioni predilige le foraggiere come ad esempio l'erba medica e il trifoglio ed i cereali come frumento ed orzo. Queste ultime due coltivazioni assicurano al fagiano maggiore successo nella nidificazione dal momento che non vengono raccolte fino a fine giugno-inizio luglio, quando ormai la maggior parte delle uova sono schiuse. Negli erbai invece dal momento che i tagli iniziano nel mese di maggio e si protraggono per tutta l'estate, quindi per l'intero periodo in cui avviene l'incubazione delle uova, si ha un'elevata percentuale di insuccesso della nidificazione. Durante il periodo di deposizione e cova delle uova gli esemplari dei due sessi utilizzano aree più ristrette rispetto a quelle usate durante il resto dell'anno. Non appena nascono i pulcini l'area vitale del fagiano viene nuovamente allargata (Meriggi *et al.*, 1996).

Per quanto riguarda l'alimentazione il fagiano è una specie poco specializzata. A parte la necessità di nutrirsi di una notevole componente animale nelle prime settimane di vita, che varia dal 98% nelle prime tre settimane di vita all'8,5% alla dodicesima settimana (Johnsgard, 1986), è stato visto che le scelte alimentari del fagiano cambiano in base alla disponibilità delle varie specie vegetali presenti nelle diverse stagioni (Meriggi, 1992).

Nei maschi di fagiano la stagione riproduttiva dura circa 5 mesi e solitamente ha inizio nella seconda metà di marzo. Tuttavia sono stati registrati dei cambiamenti legati all'andamento climatico. Normalmente l'attività riproduttiva del fagiano termina tra agosto e settembre, con dei picchi massimi rilevati tra aprile e maggio (Meriggi, 1992). E' possibile distinguere la stagione riproduttiva del fagiano grazie al tipico canto territoriale del maschio che è strettamente legato alla disponibilità di femmine per l'accoppiamento, e quindi è molto più lungo nelle zone dove la deposizione delle uova e le schiuse sono distribuite in un periodo prolungato di tempo (Meriggi, 1992). Il sistema riproduttivo del fagiano può essere poliginico, in cui un solo maschio può accoppiarsi con più femmine (in genere da 2 fino ad un massimo di 10), o promiscuo in cui la femmina può avere diversi partners durante la stessa stagione riproduttiva (Meriggi, 1992).

Le prime uova vengono deposte nel mese di marzo con variazioni correlate alle condizioni meteo. Generalmente la stessa femmina può arrivare fino a 4 deposizioni nella stessa stagione, e solitamente negli ambienti dove vengono distrutti diversi nidi le femmine costruiscono anche un secondo ed un terzo nido. La dimensione della covata e le schiuse variano di anno in anno ed in base alle diverse zone; l'incubazione è di 23 giorni e la cova inizia subito dopo la deposizione dell'ultimo uovo, quindi i pulli nascono tutti in poche ore. Normalmente entro il mese di giugno si schiude circa il 50% delle covate ed entro la metà di luglio il 90%.

Con la schiusa delle uova la madre e i nuovi nati formano i cosiddetti "gruppi familiari" che sono più frequenti in agosto. Dopo l'allontanamento dal nido, che solitamente avviene tra settembre e ottobre, i giovani si uniscono agli individui adulti. È proprio in questo periodo che si osserva una ripresa dell'attività territoriale e che si definiscono le gerarchie che verranno poi rispettate nei gruppi invernali (Meriggi, 1992).

Al di fuori del periodo riproduttivo, quindi durante l'inverno, nel fagiano è stata osservata una fase gregaria durante la quale si formano dei gruppi sia eterosessuali sia monosessuali. Dal momento che non esistono legami stretti tra alcuni componenti della popolazione piuttosto che con altri questi gruppi sono altamente variabili sia nella composizione sia nel

numero. Con l'avvicinarsi della primavera contemporaneamente al manifestarsi del periodo territoriale ha inizio una fase di dispersione. La scelta del territorio da occupare durante la stagione riproduttiva avviene in base all'ordine gerarchico definito durante il periodo autunno-invernale che in parte è legata all'età. Quindi ai maschi alla loro prima stagione riproduttiva, essendo subordinati a quelli più anziani, rimangono solamente zone di scarso valore.

1.3.4 Conservazione e gestione

Il fagiano, tra le specie stanziali, è la preda più comune per la maggior parte dei cacciatori. Infatti nonostante sia citato nell'Allegato III (specie protette) della Convenzione internazionale di Berna per questa specie non sono previsti particolari divieti venatori, e rientra tra quelle citate nella Direttiva "Uccelli" negli Allegati II/1 e III/1, in cui vengono elencate tutte le specie che possono essere oggetto di prelievo e commercio.

La sua distribuzione, nel territorio italiano, è caratterizzata da una notevole discontinuità e la sua presenza come specie naturalizzata è limitata alle zone dove vige il divieto assoluto di caccia.

Affinchè una popolazione sia in grado di auto sostenersi, senza che l'uomo intervenga con i ripopolamenti, il prelievo venatorio deve essere mantenuto al di sotto del 70% per i maschi e del 20% delle femmine rispetto al numero di individui censiti durante la stagione invernale (Cocchi *et al.*, 1998). Spesso però, queste percentuali non vengono rispettate e comunque non sono sufficienti a garantire la sopravvivenza della popolazione, quindi bisogna intervenire con ripopolamenti con esemplari allevati in cattività.

1.4 Conservazione delle specie in via d'estinzione: normativa di riferimento e strategie di azione

L'estinzione di una specie è un processo intrinseco all'evoluzione delle specie animali e quindi irreversibile, che, nel corso degli anni ha subito una notevole accelerazione con la conseguente perdita di numerosissime specie (Argano *et al.*, 2007).

In particolare ad oggi sono state identificate le sei seguenti cause che hanno portato alla progressiva diminuzione della biodiversità (Soulè, 1991):

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.

Considerata la velocità con la quale avvengono tali processi negli ultimi decenni si è notevolmente sviluppata la comune consapevolezza (sia in ambito scientifico sia tra “i non addetti”) che in tempi brevi scompariranno un enorme numero di specie sia aviarie che non. Per questo motivo, i governi hanno cominciato ad impegnarsi per assicurare il mantenimento della biodiversità, emanando numerose leggi nazionali e stipulando svariate convenzioni internazionali che hanno portato alla definizione dell’attuale quadro giuridico di riferimento in materia di conservazione della biodiversità (Piscione, 2008). Ad oggi 193 Paesi hanno sottoscritto la convenzione sulla diversità ecologica (CBD) presentata nel 1992 e ratificata in Italia con la legge n° 124 del 14 febbraio 1994.

I tre obiettivi primari di tale Convenzione, esplicitati nell’articolo 1, sono i seguenti:

1. la conservazione della diversità biologica;
2. l'uso sostenibile delle sue componenti;
3. la giusta ed equa divisione dei benefici nell'utilizzo delle risorse genetiche, attraverso un giusto accesso ed un appropriato trasferimento delle tecnologie necessarie.

La più importante organizzazione che si occupa della valorizzazione e della conservazione della natura garantendo l’applicazione dei principi fondamentali della Convenzione sulla Diversità Ecologica è lo IUCN (International Union for Conservation of Nature) al quale aderiscono più di 1200 enti tra governi e organizzazioni non governative. Uno dei programmi più importanti dello IUCN è lo “*IUCN Global Species Programme*” nato nel 1964 con lo scopo di valutare lo stato di conservazione delle diverse specie appartenenti ai differenti gruppi animali e vegetali, e di evidenziare quelle in via di estinzione, e promuoverne quindi la loro conservazione (iucn.org).

Gli animali, le piante e i funghi indicati nelle liste rosse elaborate dallo IUCN sono tutti elementi fondamentali per la salvaguardia degli ecosistemi e per il mantenimento della variabilità genetica intra ed interspecifica. Le informazioni sulla loro distribuzione e sul loro stato di conservazione sono quindi di fondamentale importanza per la tutela della biodiversità a livello locale e globale. La “*Lista Rossa IUCN delle specie minacciate* TM” offre informazioni sulla tassonomia e sulla distribuzione delle diverse specie di piante, funghi e animali. Inoltre, fornisce una valutazione a livello globale del loro stato di conservazione utilizzando dei criteri predefiniti e riassunti in figura 23 (iucn.org).

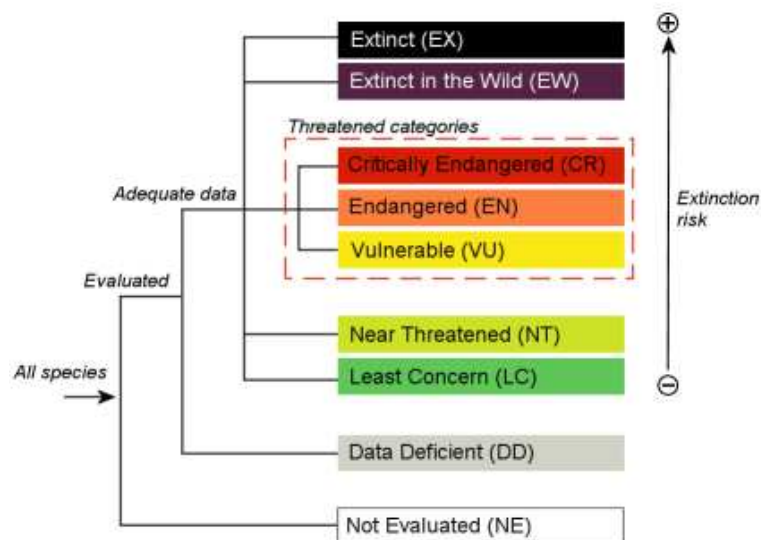


Figura 23: categorie di rischio utilizzate dallo IUCN per classificare lo stato di conservazione delle diverse specie di piante, funghi e animali. Figura presa dal sito <http://www.iucnredlist.org/>

Le principali normative europee di riferimento per la conservazione delle specie sono la Convenzione relativa alla conservazione della vita selvatica e dell’ambiente naturale in Europa, adottata a Berna il 19 settembre 1979 e recepita in Italia con la legge n. 503 del 5 agosto 1981, e la direttiva 92/43/CEE “Habitat”. Tale Direttiva è stata recepita in Italia con il DPR n° 357 del 8 settembre 1997 e successivamente modificato e integrato con il DM 20 gennaio 1999 e DPR 12 marzo 2003. Secondo quanto stabilito dal DPR 357 sono le regioni (o le Province nel caso del Trentino – Alto Adige) a dover emanare le normative necessarie per l’applicazione della Direttiva Habitat. L’obiettivo fondamentale della Direttiva Habitat è il mantenimento della biodiversità a livello europeo attraverso l’attuazione di misure di conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche

(Piscione,2008). L'applicazione della Direttiva Habitat ha previsto in primo luogo la creazione della Rete Natura 2000, costituita da un insieme di Zone Speciali di Conservazione all'interno delle quali vengono applicati opportuni piani di gestione per assicurare una rigorosa protezione delle specie animali e vegetali presenti.

Il sistema di conservazione sviluppato per i mammiferi non può essere applicato direttamente agli uccelli viste le particolari caratteristiche anatomiche e fisiologiche del loro uovo. Per questo motivo, per le specie aviarie, è stata emanata una direttiva *ad hoc*, la Direttiva 2009/147/CE, adottata il 30 novembre 2009, che ha abrogato la precedente Direttiva 79/409/CEE con la quale gli Stati membri hanno voluto incoraggiare le ricerche necessarie per lo sviluppo di un sistema per la conservazione delle risorse genetiche aviarie.

In particolare, secondo l'art.10 della Dir. 2009/147/CE per le specie indicate nell'allegato I sono previste misure speciali di conservazione, riferite in modo particolare all'habitat e finalizzate a garantirne la riproduzione e la sopravvivenza nella loro area di distribuzione e altrove.

Per la salvaguardia delle specie minacciate sono state individuate diverse strategie di azione, tra cui, quelle che hanno avuto maggiore sviluppo negli ultimi anni sono la conservazione *in situ* e quella *ex situ* (Pukazhenthil *et al.*, 2006).

La prima tipologia di azione prevede la tutela, generalmente su larga scala, di tutti quegli habitat a basso impatto antropico al fine di proteggere tutte le specie animali e vegetali presenti all'interno di esso (approccio *in situ*) (Soulé, 1991; Margules e Pressey, 2000; Hanks, 2001). Tuttavia, questi territori con il tempo tendono al degrado e quindi hanno poche possibilità di sopravvivenza se non adeguatamente sostenuti con la seconda tipologia di azione quella *ex situ* (Soulé, 1991), che prevede la conservazione e la propagazione delle specie in cattività (Blesbois *et al.*, 2007). La conservazione *ex situ* viene svolta principalmente all'interno di giardini botanici, zoo, acquari e istituzioni analoghe (Soulé, 1991).

1.5 Conservazione *ex-situ* e allevamento in cattività di specie selvatiche a rischio estinzione

Nell'ambito delle strategie di conservazione *ex-situ* delle specie a rischio di estinzione l'allevamento in cattività ha guadagnato un diffuso consenso sia nel mondo scientifico sia in quello politico (Bowkett, 2008).

Gli zoo e gli acquari, dal momento che mantengono in cattività numerosi animali a rischio estinzione, hanno un compito fondamentale nella conservazione delle specie minacciate e il ruolo di queste istituzioni è stato formalizzato per la prima volta dalla “*World Zoo Conservation Strategy*” (IUDZG/CBSG 1993).

Nel corso degli anni sono stati fatti numerosi tentativi di allevamento in cattività di diverse specie che hanno permesso di evidenziare una serie di criticità (Bowkett, 2008), alcune delle quali già osservate da McAtee nel 1935:

If all the survivors of a certain rare form were caged, their descendants in a few generations probably would depart from natural conformation and colour to such an extent as not to be typical of the species. The latter would then be almost as truly extinct as if the last individual had perished in the wild... (McAtee, 1935)

Una delle maggiori limitazioni dell'allevamento in cattività è quella di riuscire a mantenere la variabilità genetica all'interno di piccole popolazioni (Collar *et al.*, 2014). Altre limitazioni sono legate ai costi elevati dell'allevamento e alle scarse conoscenze ecologiche ed etologiche delle diverse specie (quali ad esempio alimentazione, umidità e illuminazione ottimale etc.) (Lasley *et al.*, 1994). In particolare negli allevamenti in cattività:

1. risulta difficile ottenere animali autosufficienti in grado di sopravvivere e riprodursi anche nel loro habitat naturale quando vengono reintrodotti in natura (Snyder *et al.*, 1996);
2. lo spazio solitamente non è sufficiente ad ospitare un numero adeguato di individui per preservarne la variabilità genetica. Questo problema anche se è facilmente individuabile è uno dei più difficili da risolvere, ed è notevolmente amplificato nelle specie di taglia grande;
3. il benessere e la salute delle specie selvatiche non possono essere assicurate in cattività, soprattutto per la mancanza di informazioni sulle loro abitudini di vita;

4. determinati moduli comportamentali, che spesso risultano fondamentali per il successo dell'accoppiamento, non possono essere espressi in cattività;
5. una dieta varia ed equilibrata, fondata su un adeguato rapporto costo-beneficio, non è sempre disponibile;
6. non è sempre possibile trattare adeguatamente gli insuccessi riproduttivi, non potendo identificarne in maniera chiara le cause;
7. non sempre la genetica delle piccole popolazioni può essere gestita con le adeguate competenze. Il mantenimento della variabilità genetica è un fattore fondamentale in un programma di allevamento in cattività. L'instabilità demografica e gli incroci nocivi dovuti alla ridotta variabilità genetica sono i principali fattori che spesso compromettono la sopravvivenza degli animali in cattività.

Nonostante queste limitazioni tuttavia, la maggior parte degli autori concordano sull'importanza dell'allevamento in cattività nell'ambito delle strategie messe in atto per la salvaguardia delle specie in via d'estinzione (Bowkett, 2008). Studi effettuati da Martin *et al.* (2014) hanno dimostrato che le specie di uccelli e mammiferi allevate in cattività risultano meno minacciate rispetto ai loro simili non custoditi all'interno degli zoo.

Per quanto riguarda gli uccelli programmi di allevamento in cattività sono già in corso o comunque raccomandati per un totale di 257 spp. (2,6% delle specie esistenti) (Collar *et al.*, 2014).

Collar *et al.* (2014) hanno individuato 6 tipologie di interventi in cattività per la conservazione delle specie di uccelli minacciate che vengono riassunti in tabella 10. Per ogni tipologia viene riportata la definizione e il numero di specie aviarie e di specie di rapaci per le quali è raccomandata tale tipologia di intervento.

Tipologia di intervento	Definizione	Specie aviarie	Specie di rapaci
Necessario	Quando l'allevamento in cattività è lo strumento primario per la conservazione di una determinata specie. Vengono classificate in questa tipologia di intervento tutte le specie che in natura sono estinte o prossime all'estinzione.	13 spp. (5% del totale)	<i>Falco punctatus</i> <i>Gyps coprotheres</i> <i>Pitheophaga jefferyi</i>
Integrante	Quando l'allevamento in cattività fornisce un sostegno fondamentale alla conservazione della specie attraverso l'integrazione e la reintroduzione in natura di esemplari, allevati in cattività, di specie a rischio	32 spp. (13% del totale)	
Precauzionale	Quando vengono allevati in cattività esemplari di specie considerate vulnerabili e quindi che in futuro potrebbero rischiare l'estinzione	65 spp. (25% del totale)	<i>Haliaeetus vociferoides</i> <i>Gyps bengalensis</i> <i>Gyps indicus</i> <i>Gyps tenuirostris</i>
Controllato	Quando vengono creati programmi di allevamento in cattività con finalità didattiche o scientifiche ma che potrebbero tornare utili anche a scopo conservativo	127 spp. (49% del totale)	<i>Haliaeetus pelagicus</i> <i>Neophron percnopterus</i> <i>Sarcogyps calvus</i> <i>Aegypius monachus</i> <i>Buteo ridgwayi</i> <i>Harpia harpyja</i> <i>Aquila adalberti</i> <i>Otus capnodes</i> <i>Bubo philippensis</i> <i>Ketupa blakistoni</i> <i>Strix occidentalis</i> <i>Ninox natalis</i>
Motivazionale	Quando vengono sviluppati programmi di allevamento in cattività per sensibilizzare gli addetti del settore e non a sostenere la conservazione <i>in situ</i> , ma che non contribuiscono al mantenimento delle specie a rischio	3 spp. (1% del totale)	
Commerciale	Quando vengono creati dei programmi di allevamento in cattività con lo scopo di commercializzare gli esemplari allevati in modo da rallentare la cattura di animali selvatici a scopo commerciale	17 spp. (7% del totale)	<i>Falco cherrug</i>

Tabella 10: tipologie di interventi di allevamento in cattività individuate da Collar *et al.* (2014). La tabella è stata modificata in base a quella riportata nel lavoro “*Conservation breeding and avian diversity: chances and challenges*” Collar *et al.* (2014)

Come si evince dalla tabella per quanto riguarda i rapaci l'allevamento in cattività è raccomandato per 20 specie di cui 13 appartenenti alla famiglia degli "Accipitridae" (Collar *et al.*, 2014).

I primi programmi di allevamento in cattività dei rapaci risalgono al 1970 quando il rapido declino di molte popolazioni di rapaci nel Nord America ha portato allo sviluppo di numerosi programmi di conservazione *ex situ* dei rapaci in Canada e negli Stati Uniti coordinati dalla "Cornell University", dal "The Raptor Research Foundation", dal "US Fish and Wildlife Service" e dal "Canadian Wildlife Service" (Samour, 2004). Uno dei programmi di allevamento in cattività dei rapaci maggiormente riuscito, anche in termini di mantenimento della variabilità genetica di questa specie, è il "Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) Programme" sviluppato negli anni settanta dopo che questa specie nel ventennio precedente aveva subito un rapido declino a causa dell'utilizzo incontrollato dei pesticidi organo clorurati (Rahbek, 1993). Le tecniche per la raccolta del seme e per l'inseminazione artificiale sviluppate dai falconieri nell'ambito dei primi allevamenti in cattività dei rapaci sono tuttora utilizzate (Samour, 2004).

2 MATERIALI E METODI

2.1 Tecniche di allevamento in cattività

2.1.1 Astore

Gli astori oggetto di questo lavoro vengono allevati presso il centro di riproduzione assistita “European Falcons” di Assisi (Pg) secondo la normativa nazionale e comunitaria. Il centro è associato alla federazione Ornitologica Italiana (FOI), per cui gli astori sono marcati con anelli FOI e sono provvisti di certificazione CITES comunitaria ai sensi del Reg. CE 1808/01.

Gli astori sono stati allevati all’interno di voliere (2m x 2m x 3m), rigorosamente divisi tra maschi e femmine. Lo scheletro delle voliere è stato realizzato in paletti di legno, metallo, o cemento, in parte chiuse con pannelli in legno, metallo o plastica, in parte con rete a maglie metalliche di dimensioni (1x1 cm), ricoperte con una rete verde scura molto fitta in modo da impedire la comunicazione tra maschi e femmine. Gli animali si trovano liberi all’interno delle voliere (Figura 24).



Figura 24: esemplare di astore libero all’interno della voliera al quale è stato somministrato il cibo. Sulla zampa destra dell’animale è ben visibile l’anello utilizzato per il riconoscimento dell’animale

Sul fondo di queste strutture viene distribuito uno strato di ghiaia drenante (di circa 5 cm, sostituito periodicamente) per evitare ristagni d'acqua insieme ad un bagnetto nel quale gli animali si bagnano spesso le zampe e a cui viene cambiata l'acqua giornalmente.

Come posatoi vengono utilizzate pertiche orizzontali, poste a circa 1,5 metri di altezza da terra, rivestite con erbetta sintetica (o Astroturf) o altro materiale idoneo per evitare patologie alle zampe (ascessi plantari) (Figura 25).



Figura 25: esemplare di astore su un posatoio dove è ben visibile l'erbetta sintetica utilizzata per evitare patologie alle zampe

Nelle voliere delle femmine è stato posto un cesto di vimini per la costruzione del nido (Figura 26).



Figura 26: esemplare di astore femmina all'interno del cesto di vimini dove ha costruito il nido per la cova delle uova

Nel locale di allevamento è presente una piccola piattaforma per il cibo, come illustrato in figura 24, alla quale l'operatore ha accesso dall'esterno e sulla quale giornalmente viene posizionato il pasto dell'animale. La dieta consiste di quaglie, pulcini di un giorno e piccioni nel rapporto settimanale 5-1-1 con aggiunta di vitamine e minerali. Ciascuna voliera è stata provvista di acqua *ad libitum*.

Gli animali vengono accuditi tutti i giorni, preferibilmente la mattina alla stessa ora e dallo stesso l'operatore.

Durante la sperimentazione sono stati presi in considerazione 3 astori maschi (denominati semplicemente A,B,C) e 3 astori femmine (denominate D,E,F), tutti in età riproduttiva, riconoscibili mediante una fascetta applicata ad una zampa, come illustrato nelle figure 24-25.

L'età di tali esemplari era compresa in un range tra i 4 e i 6 anni per i maschi e tra i 6 e gli 8 anni per le femmine. Il peso variava da 840g a 1050g per i maschi e da 1050g a 1480g per le femmine (Tabella 11).

Esemplare	Età	Peso
Maschio A	6 anni	950 g
Maschio B	5 anni	840 g
Maschio C	4 anni	1050 g
Femmina D	8 anni	1320 g
Femmina E	6 anni	1430 g
Femmina F	5 anni	1480 g

Tabella 11: età e peso dei sei astori oggetto del nostro studio

2.1.2 Fagiano

I fagiani oggetto di questo studio vengono allevati presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa. Dopo diversi anni di esperienza durante i quali sono state provate diverse condizioni di allevamento, la migliore, ossia quella che permette di ottenere degli eiaculati qualitativamente migliori è risultata quella che prevede l'allevamento in voliere di 18 m² in ognuna delle quali vengono collocati 2-3 maschi suddivisi tra loro con una rete specifica per uccelli in modo da minimizzare lo stress per gli animali. La dieta consiste in mangime commerciale (11.51 MJ/Kg di M.E., 19% di C.P.)

con l'aggiunta dell'1% di olio di pesce e arricchita vit E 200mg/kg e Selenio metionina 0,3 mg/kg.(Marzoni *et al.*, 2012).



Figura 27: voliere dove vengono allevati i fagiani presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa

2.2 Metodi di raccolta degli spermatozoi

2.2.1 Metodo cooperativo

Come descritto nel paragrafo 1.1.2 il metodo cooperativo è stato utilizzato per la prima volta dai falconieri per raccogliere gli spermatozoi nei rapaci improntati sessualmente e si basa sull'eiaculazione volontaria da parte dei maschi quando opportunamente stimolati.

Nel presente lavoro questo metodo è stato utilizzato per raccogliere i campioni di eiaculati di astore nell'arco di tre stagioni riproduttive consecutive (marzo-maggio 2012, 2013, 2014). Lo stesso operatore ha raccolto gli spermatozoi dai tre esemplari A, B, C (Figura 28). I tentativi di raccolta sono iniziati il primo marzo e sono terminati il 31 maggio di ogni anno, e sono stati effettuati con cadenza bisettimanale per un totale di 216 tentativi di raccolta nei tre esemplari nelle tre stagioni di campionamento.

Il liquido seminale di ciascun astore è stato raccolto in capillari di vetro e i campioni sono stati utilizzati per l'inseminazione artificiale presso il centro di Assisi subito dopo la raccolta. Per l'analisi quantitativa/qualitativa e per le prove di crioconservazione presso il laboratorio di Zoologia dell'Università della Tuscia. A tale scopo i campioni di sperma sono stati trasportati da Assisi al laboratorio Dibaf ad una temperatura di 4 ° C entro due ore dalla raccolta.



Figura 28: maschio di astore che copula sulla mano guantata dell'operatore presso il Centro "European Falcons" di Assisi

2.2.2. Massaggio dorso addominale

Come descritto nel paragrafo 1.1.2 il massaggio dorso addominale è la tecnica più utilizzata per raccogliere i campioni di eiaculato (Castillo *et al.*, 2009) e può essere impiegata sia con specie selvatiche che non. Questa tecnica richiede l'intervento di due operatori uno che pratica il massaggio e l'altro che si occupa della raccolta del seme. Il maschio viene tenuto adagiato sul petto dal primo operatore che inizialmente gli effettua un massaggio nella regione dorso caudale e al momento che l'animale solleva la coda anche nella regione circostante la cloaca. A seguito del massaggio praticando una lieve pressione lungo i lati e nella parte inferiore della cloaca si ottiene l'emissione dello sperma (Marzoni, 2008).

In questo lavoro tale tecnica è stata utilizzata per raccogliere i campioni di eiaculato di fagiano. I tentativi di raccolta degli spermatozoi sono stati effettuati due volte a settimana in 10 esemplari diversi. Il liquido seminale di ciascun animale è stato raccolto in falcon da 25 ml e gli eiaculati sono stati processati entro un'ora dalla raccolta.



Figura 29: Raccolta dei campioni di eiaculato di fagiano tramite il metodo del massaggio dorso-addominale presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa

2.3 Analisi quantitativa e qualitativa dello sperma

Per la valutazione quantitativa degli spermatozoi sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- a) volume;
- b) concentrazione;
- c) motilità “soggettiva” con Camera di Makler;
- d) mobilità con il metodo Accudenz[®] ;
- e) percentuale degli spermatozoi vivi e delle anomalie spermatiche;
- f) risultati del saggio di interazione sperma-uovo;
- g) dati di fertilità nell'inseminazione artificiale.

a) Il volume dei diversi eiaculati è stato quantificato subito dopo la raccolta con l'ausilio di una pipetta graduata.

b) La concentrazione di spermatozoi è stata valutata utilizzando la camera di Makler (Figura 30). La camera di Makler è un dispositivo che permette, attraverso analisi al microscopio, un accurato conteggio degli spermatozoi presenti nel liquido seminale fresco. E' composta da una base metallica con un vetrino porta oggetto

dove viene posto il campione e un vetrino copri oggetto su cui è disegnata una griglia quadrettata con 100 quadretti (0,1 x 0,1 mm).

Per ogni campione, 2 μ l di eiaculato sono stati posti in questa camera ed osservati al microscopio ottico (20x) e la concentrazione per μ l è stata calcolata contando gli spermatozoi presenti in 3 righe differenti per 10 caselle (Figura 31).



Figura 30: Camera di Makler

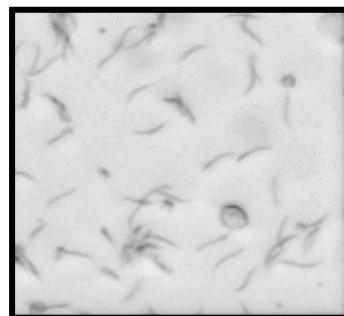


Figura 31: immagine al microscopio ottico (obiettivo 20x) degli spermatozoi di astore all'interno della camera di Makler

c) Per la valutazione soggettiva della motilità, 2 μ l di ciascun campione di sperma sono stati osservati al microscopio ottico (20x) all'interno della camera di Makler, valutando così il numero di spermatozoi motili su un totale di 100 spermatozoi presi in considerazione.

d) La mobilità degli spermatozoi viene definita come la capacità degli stessi di muoversi contro una resistenza (Froman, 2010). Quindi mentre tutti gli spermatozoi mobili sono anche motili, non tutti quelli motili sono mobili. Questa distinzione è di fondamentale importanza in quanto i gameti con un'elevata mobilità hanno molte più probabilità di fecondare l'uovo rispetto a quelli meno mobili.

La mobilità dei nostri campioni è stata analizzata con il metodo ACCUDENZ® (Froman e Feltmann, 2000). In questa metodologia vengono ricreate, anche se artificialmente, le condizioni che gli spermatozoi ritrovano all'interno delle vie genitali femminili, dove, per potersi muovere devono superare la resistenza mucociliare (Solomon, 1983; Bakst *et al.*, 1994) tipica di queste strutture.

Per applicare tale metodo sono state utilizzate le seguenti soluzioni:

1. *Motility Buffer o Soluzione A* (50 mM TES pH 7.4, contenente 111 mM NaCl, 25 mM Glucosio e 4 mM di CaCl₂ portato a 100 ml di volume con acqua distillata, Osm 320 mmol/kg);
2. *Soluzione B* (5mM TES, pH 7.4, 3 mM KCl);
3. *Stock Solution al 30 di Accudenz*® (30 grammi di polvere Accudenz® disciolta in soluzione B e portata ad un volume di 100 ml);
4. *Dilute Motility Buffer* (Soluzione A portata ad una osmolarità di 290 mmol/kg);
5. *Soluzione al 6% di Accudenz*® (diluizione della stock solution al 30 con *dilute motility buffer* a raggiungere la concentrazione del 6%)

Tali soluzioni sono state riscaldate in un bagnetto a 41 ° C e la temperatura degli stessi è stata verificata con un termometro digitale. Una volta arrivati a temperatura, la stock solution di Accudenz al 30% è stata diluita nella soluzione B per passare da una concentrazione del 30% ad una al 6%. Nella fase successiva 610 µl di Accudenz 6% sono stati posti in una cuvetta, pre-riscaldata precedentemente nel bagnetto caldo. 10 µl di campione (sperma) sono stati aggiunti a 50 µl della soluzione A e trasferiti nella cuvetta contenente già 610 µl di Accudenz 6%, in modo da ottenere un volume finale all'interno della cuvetta di 670 µl. La cuvetta è stata quindi incubata per 5 minuti in un bagnetto a 41 °C; dopodiché l'assorbanza di questa soluzione è stata letta allo spettrofotometro a 550 nm.

- e) La vitalità degli spermatozoi è stata valutata mediante colorazione eosina-nigrosina (Bakst, 2010). Questa procedura si basa sul fatto che gli spermatozoi vitali hanno le membrane cellulari intatte e quindi non penetrabili dal colorante eosina. Al contrario gli spermatozoi morti possiedono membrane permeabili che permettono la penetrazione dell'eosina conferendo alle cellule una colorazione tipicamente rosa, facilmente rilevabile tramite osservazione al microscopio ottico. La nigrosina fornisce uno sfondo blu al preparato, migliorando il contrasto con gli spermatozoi vivi (incolori) e con il rosa di quelli risultanti morti.

Per realizzare questa procedura, 2 µl di ogni campione di sperma raccolto sono stati diluiti 1:1 con il colorante, il tutto mescolato accuratamente ad intervalli di 30 s per 2 minuti. Quindi, una goccia di sperma diluito è stata posta su un vetrino e con

l'ausilio di un altro vetrino la goccia è stata strisciata. Il vetrino con lo striscio di spermatozoi è stato messo ad asciugare in stufa a 37,5°C, dopodiché, prima di ricoprirlo con il coprioggetto, vi è stata posta una goccia di mezzo montante. La percentuale di spermatozoi vitali è stata valutata al microscopio ottico con obiettivo 40x. In contemporanea è stata eseguita anche una conta degli spermatozoi normali e anomali presenti tra quelli vitali. Le conte sono state eseguite su un totale di 300 spermatozoi a campioni e ripetute per due volte. Una descrizione dettagliata delle anomalie è stata successivamente eseguita al SEM e al TEM.

- f) saggio di interazione in vitro sperma-uovo: ho messo a punto questo saggio durante la mia esperienza presso presso l'”Institute of Animal Breeding” della “University of Environmental and Life Science” of Wroclaw (Polonia). In questo test gli spermatozoi sono incubati con lo strato perivitellino interno (IPL) prelevato dall'uovo di pollo (Robertson *et al.*, 2010). Lo strato perivitellino interno è una matrice proteica fibrosa che circonda l'uovo durante l'ovulazione e negli uccelli è l'equivalente della zona pellucida nei mammiferi (Figura 32).

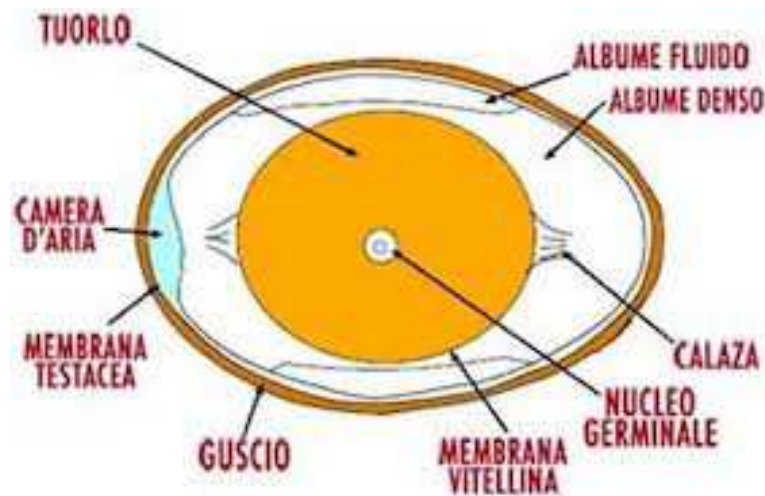


Figura 32: schema uovo di gallina

Nei mammiferi l'interazione degli spermatozoi con la zona pellucida è un evento specie-specifico, anche se delle reazioni incrociate sono state osservate in specie strettamente affini (Litscher e Wassarman, 1996). Negli uccelli invece, questa interazione non è così altamente specie-specifica e delle reazioni incrociate dello strato perivitellino dell'uovo di pollo sono state dimostrate con gli spermatozoi di specie

appartenenti alle famiglie dei Phasianidae, Anatidi, Columbidi, Accipitridi, Spheniscidae (Stewart *et al.*, 2004). Il numero dei fori degli spermatozoi per unità di superficie del IPL vengono poi osservati al microscopio ottico. Questo test fornisce una misura dell'attività degli spermatozoi e può essere utilizzato per classificare i maschi in base alla qualità dei loro spermatozoi.

Per poter eseguire questo saggio come prima cosa è stato prelevato lo strato perivitellino da uova di gallina. Il tuorlo è stato posizionato in un piccolo piatto ed è stato lavato più volte con l'NaCl al 0,9% per rimuovere l'albumine in eccesso, dopodiché il perivitellino è stato prelevato con delle pinzette sottili. Lo strato perivitellino è stato posto in una capsula Petri e lavato più volte con NaCl 0,9% per rimuovere tutto il tuorlo.

Nella fase successiva la membrana perivitellina è stata posta in 1 ml di medium (Dulbecco/s medium, Sigma Aldrich). Gli spermatozoi sono stati diluiti 1:2 con preefezing Lake preparato così come descritto da Lake *et al.* (1981) (D-fruttosio (44mM), acetato di potassio (51mM), acetato di magnesio (3.2 mM), glutammato di sodio (114 mM), polyvinilpyrrolidone (10000 mw, 0, 3%) in acqua (pH 7,0; 340 mOsm / kg), e posti nella piastra insieme a alla membrana perivitellina (0,5 cm x 0,5 cm) e lasciati incubare per 5 min. Dopodiché le membrane sono state poste in NaCl al 0,9% per essere ripulite, poste su vetrino per l'osservazione al microscopio ottico e per la conta degli spermatozoi che sono penetrati. Il tutto è stato eseguito su piastra riscaldata a 41°C.

g) dati di fertilità nell'inseminazione artificiale: per l'inseminazione artificiale nel presente lavoro di tesi sono state applicate le seguenti metodiche:

1. Metodo cooperativo: tale metodica di inseminazione artificiale viene utilizzata con esemplari femmine “imprintate” sessualmente che, opportunamente stimulate, si lasciano inseminare volontariamente senza che l'operatore debba ricorrere all'estroflessione manuale dell'ovidotto. Tale operazione infatti comporterebbe uno stress eccessivo alla femmina fino a bloccarne l'ovulazione.

Nel presente lavoro il metodo cooperativo è stato utilizzato per praticare l'inseminazione artificiale nelle tre femmine di astore oggetto di questo studio (femmine D,E,F). L'inseminazione è stata effettuata con una siringa alla quale era

stato collegato, tramite un tubicino, un capillare contenente gli spermatozoi. Il parametro preso in considerazione per decidere gli accoppiamenti è stato l'età e quindi la femmina D è stata inseminata con lo sperma del maschio A, la E con il liquido seminale del maschio B e la F con gli spermatozoi del maschio C. La prima deposizione delle uova è avvenuta dopo circa 72 ore dall'inseminazione e la successiva inseminazione è stata eseguita entro 2-6 ore dopo l'ovodeposizione. A ciascuna femmina sono state fatte covare le proprie uova (Figura 33). I pulcini sono nati dopo 34 giorni di cova (Figura 34). Dopo 15 giorni di incubazione, le uova sono state sottoposte alla prova della luce per accertare l'avvenuta fecondazione e lo sviluppo dell'embrione.



Figura 33: femmina di astore che cova le uova



Figura 34: schiusa delle uova di astore

I nuovi nati sono stati denominati D1...,E1...,F1..., in relazione all'individuo dal quale provenivano. L'alimentazione, è stata variata in base all'età degli individui, ed è stato seguito il modello alimentare riportato in Tabella 12.

Età	Alimentazione
5-10 giorni	Pastone di piccione e quaglia senza piume e tritati finissimi, amalgamati con il sangue delle prede stesse
10- 30 giorni	Piccione e quaglia non più tritati finissimi
30 - 35 giorni	Prede intere eviscerate
Oltre i 35 giorni	Prede intere e con le piume

Tabella 12: alimentazione dei pulli di astore

2. Inseminazione intravaginale: questa metodica può essere utilizzata anche in femmine “non-imprintate” e prevede l’intervento di due operatori che agiscono sincronizzati: uno che effettua l’estroflessione della cloaca e l’altro l’inseminazione vera e propria. Il primo operatore attraverso una leggera pressione dell’addome e ribaltamento della coda determina la messa in evidenza dell’orifizio vaginale, che si presenta sul lato sinistro della cloaca estroflessa. Il secondo operatore invece si occupa di introdurre una cannula contenente la dose inseminante all’interno delle vie genitali femminili e di depositare il materiale seminale nella vagina. Il rilascio dello sperma deve essere fatto in contemporanea ad una riduzione della pressione esercitata sull’addome in quanto favorisce la retrazione dell’ovidotto e l’aspirazione della dose inseminante nell’organo (Marzoni, 2008). Nel presente lavoro tale metodica è stata utilizzata per effettuare l’inseminazione artificiale nel fagiano. In particolare, durante la stagione riproduttiva, sono state eseguite 4 prove di inseminazione artificiale su cinque esemplari femmine di fagiano. Per ogni intervento sono stati impiegati 3 pellet di campioni di spermatozoi crioconservati in giornate differenti, combinati in modo da apportare concentrazioni diverse (45×10^6 sperm x ml; 65×10^6 sperm x ml; 110×10^6 sperm x ml) di gameti scongelati vitali e con una morfologia normale. Le uova sono state raccolte il giorno dopo la deposizione e la capacità fecondante degli spermatozoi è stata valutata attraverso la stima delle uova deposte dal 3° al 21° giorno dopo la prima inseminazione. Al 7° giorno di incubazione le uova sono state sottoposte a speratura e quelle risultate non fertili sono state rotte per un esame macroscopico del disco germinale.

2.4 Analisi morfologiche ed ultrastrutturali degli spermatozoi di astore e fagiano

Per lo studio della morfologia ed ultrastruttura degli spermatozoi, i vari campioni sono stati preparati per la microscopia elettronica a scansione (SEM) ed a trasmissione (TEM) utilizzando metodiche di preparazione convenzionale, come riportato di seguito.

Gli spermi sono stati fissati per due ore nella soluzione di Karnovsky (1965) costituita da una miscela di paraformaldeide al 4% e glutaraldeide al 5% in tampone sodio cacodilato 0,1M a pH 7,2 a 4°C. Successivamente è stato effettuato un lavaggio nello stesso tampone per una notte a 4°C. La postfissazione è stata fatta utilizzando tetrossido di osmio all’1% e rosso di rutenio allo 0,075% in tampone sodio cacodilato 0,1M a pH 7,2 per un’ora a

temperatura ambiente, poi i campioni sono stati nuovamente lavati per un'ora nello stesso tampone. I campioni sono stati poi immersi per un'ora a 4°C in una soluzione di acetato di uranile all'1% in acqua distillata per effettuare un block staining, dopodiché sono stati effettuati tre lavaggi in acqua distillata, ciascuno di 15 minuti sempre a 4°C. I campioni sono stati poi disidratati utilizzando concentrazioni crescenti di acetone (da 30 a 100) a 4°C. Tutti i passaggi della preparazione sono stati fatti in eppendorf e le soluzioni sono state aggiunte al campione centrifugando, togliendo il sopranatante, aggiungendo la soluzione prevista dal protocollo e risospendendo il campione nella nuova soluzione.

Per la microscopia elettronica a scansione (SEM), durante la disidratazione gli spermatozoi sono stati fatti aderire a dei copri oggetto polilisinati e sono stati essiccati mediante il metodo del punto critico dell'anidride carbonica liquida in un apparecchio Balzer Union CPD 020 in modo che la loro morfologia potesse essere preservata al meglio. Una volta effettuato l'essiccamento i copri oggetto con i campioni adesi sono stati posti su un porta campione metallico (stub) con uno scotch biadesivo e ricoperti con oro mediante l'uso del metallizzatore Balzer Union MD 010 ed osservati al microscopio elettronico a scansione Jeol JSM 5200.

Per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM), subito dopo la disidratazione, i campioni sono stati infiltrati con miscela di acetone e resina a concentrazioni via via crescenti per poi essere immersi in resina pura per tutta la notte. Questa fase di infiltrazione è stata fatta in un rotore così che la rotazione potesse facilitare l'infiltrazione della resina. La resina utilizzata è stata una miscela di Epon-Araldite la quale ha una media viscosità ed è indicata per tali campioni e ha la peculiarità di essere liquida in fase monomerica a temperatura ambiente per polimerizzare poi a 60°C. L'inclusione è stata effettuata mettendo i campioni in formine con resina pura e lasciati in stufa a 60°C per due giorni.

Dai blocchetti di materiale incluso sono state effettuate le sezioni ultrasottili (60–80nm) degli spermatozoi, con un ultramicrotomo Reichert Yung le quali sono state raccolte su retini di rame, contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo ed osservate al microscopio elettronico a trasmissione JEOL 1200 EX II. Le immagini sono state acquisite mediante una CCD Camera Veleta della ditta Olympus.

Le osservazioni dei vari campioni sono state condotte al SEM e al TEM per caratterizzare la morfologia ed ultrastruttura dello spermatozoo normale, e per evidenziare le tipologie di anomalie presenti nello sperma fresco.

2.5 Metodi di crioconservazione degli spermatozoi

Come spiegato nel paragrafo 1.1.5 quando si intraprende un processo di crioconservazione due *step* fondamentali sono la scelta del crioprotettore (sostanza che preserva la cellula dalle conseguenze della formazione dei cristalli di ghiaccio) e del diluente (sostanza utilizzata per il congelamento a basse temperature), e le modalità di congelamento e scongelamento. Come precedentemente illustrato i crioprotettori maggiormente utilizzati per la crioconservazione degli spermatozoi degli uccelli sono il glicerolo, il dimetilacetammide (DMA) e il dimetilsolfossido (DMSO), mentre i diluenti più comuni sono il Lake, il Talp e l'EK diluent.

Per quanto riguarda le modalità di congelamento si può procedere con il “congelamento rapido” che prevede l’immersione dei campioni di spermatozoi sotto forma di pellets direttamente in azoto liquido o con il “congelamento lento” nel quale i campioni di spermatozoi vengono crioconservati all’interno di cryovials. Per lo scongelamento quando i campioni di eiaculato vengono criocongelati velocemente devono essere scongelati altrettanto velocemente; quando viene utilizzata invece una metodica che prevede un congelamento lento anche lo scongelamento deve avvenire lentamente.

Per la crioconservazione degli spermatozoi di astore e fagiano sono stati utilizzati diversi protocolli, elaborati in base alle metodiche riportate da Tselutin (1999) per la crioconservazione degli spermatozoi di pollo e alle indicazioni metodologiche riportate nei lavori di Blanco *et al.* (2000) e Madeddu *et. al.* (2008) per diverse specie di rapaci. Con le informazioni raccolte in bibliografia sono stati elaborati tre diversi protocolli di crioconservazione che hanno previsto l’utilizzo di DMA e glicerolo, come crioprotettori e del prefreezing lake come diluente (preparato come descritto nel paragrafo 1.1.5). Per quanto riguarda le modalità di congelamento quando è stato utilizzato il DMA come crioprotettore i campioni di spermatozoi diluiti sono stati criocongelati sotto forma di pellets direttamente in azoto liquido. Quando invece il protocollo ha previsto l’utilizzo del glicerolo come crioprotettore i campioni di eiaculato sono stati criocongelati all’interno di cryovials. I protocolli elaborati dalla combinazione di suddette componenti sono schematizzati in tabella 13.

Gli esperimenti per la messa a punto dei metodi di crioconservazione degli spermatozoi di fagiano sono stati svolti presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa, quelli per la crioconservazione dei gameti maschili di astore sono stati condotti presso i laboratori del Dipartimento per l’Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e

Forestali (DIBAF) ed il Centro Grandi Attrezzature-sezione di Microscopia Elettronica (Università degli Studi della Tuscia), in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa.

	CRIOPROT.	DILUENTE	SPECIE	MODALITA' DI CONGELAMENTO
I PROTOCOLLO	DMA	Prefreezing lake	Astore	Veloce
II PROTOCOLLO	DMA 6%	Prefreezing lake	Astore, fagiano	Veloce
III PROTOCOLLO	Glicerolo	Prefreezing lake	Astore	Lento

Tabella 13: differenti protocolli di crioconservazione degli spermatozoi di astore e fagiano utilizzati

Nel fagiano i campioni di spermatozoi raccolti sono stati uniti in un pool e poi crioconservati, mentre nell'astore gli eiaculati sono stati conservati singolarmente per ciascun esemplare oggetto del nostro studio (A,B,C) in modo da verificare eventuali differenze nella capacità di risposta degli spermatozoi dei diversi animali al processo di congelamento e scongelamento.

Quando il protocollo prevedeva l'utilizzo del DMA come crioprotettore le fasi precedenti al congelamento sono state le seguenti:

1. diluizione del campione di eiaculato con il prefreezing lake e raffreddamento a 5° C in un incubatore;
2. prima equilibratura del campione a 4° C per 10 minuti;
3. aggiunta del DMA in rapporto 1:1 con il campione da crioconservare, nel primo protocollo e al 6% rispetto al volume iniziale del campione nel secondo protocollo;
4. seconda equilibratura in un bagno di ghiaccio per 4 minuti agitando delicatamente i campioni ogni 30 s;
5. congelamento in *pellets* (cioè sottoforma di piccole palline, formatesi per congelamento immediato di una goccia di campione in azoto liquido) (Figure 35-36);
6. i *pellets* sono stati conservati all'interno cryovials in azoto liquido a -196 ° C.

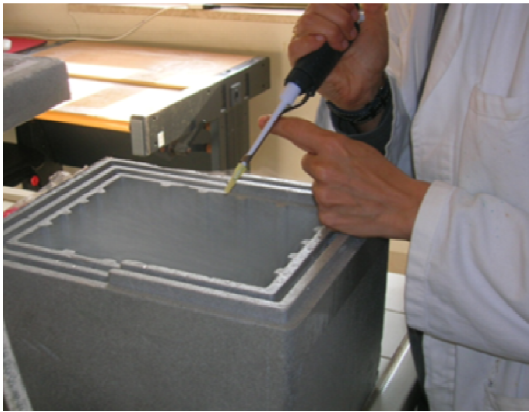


Figura 35: congelamento in azoto liquido



Figura 36: pellets in azoto liquido

Quando il crioprotettore utilizzato è stato il glicerolo, le fasi precedenti il congelamento sono state le seguenti:

1. diluizione del campione 1:1 in una prima aliquota di pre-freezing lake e raffreddamento a 4°C per circa 2 ore;
2. aggiunta di una seconda aliquota di pre-freezing lake contenente l'11% di glicerolo al campione;
3. equilibratura in ghiaccio per 20 minuti, prima di procedere al congelamento. Negli esperimenti con il glicerolo delle piccole aliquote di campione sono state inserite all'interno di cryovials e sono state congelate in azoto liquido a -196°C.

Nelle tabelle 15 e 16 vengono riportati in dettaglio tutti gli esperimenti di crioconservazione degli spermatozoi effettuati sulle due specie oggetto del nostro studio.

Campione	Valutazione quali-quantitativa eiaculati freschi effettuata su ogni campione	Protocolli utilizzati	Valutazione pre-congelamento
1	Concentrazione Vitalità Percentuale di spermatozoi vitali e con morfologia normale Mobilità con Accudenz	Campione di eiaculato+ DMA 6% + lake	Vitalità Percentuale di spermatozoi vitali e con morfologia normale Mobilità con Accudenz
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Tabella 14: esperimenti di crioconservazione degli spermatozoi di fagiano

Maschio	Mese	Campioni crioconservati ¹	Analisi eiaculati freschi	Protocolli utilizzati	Valutazione pre-congelamento
A	Marzo	5	2 µl concentrazione 2 µl vitalità 2 µl motilità con camera di Makler 10 µl motilità oggettiva con Accudenz	Campione di eiaculato+ DMA + lake Campione di eiaculato+ DMA 6% + lake Campione di eiaculato+ Glicerolo + lake	2 µl vitalità 2 µl motilità con camera di Makler
	Aprile	6			
	Maggio	3			
B	Marzo	6			
	Aprile	6			
	Maggio	4			
C	Marzo	6			
	Aprile	6			
	Maggio	4			

Tabella 15: esperimenti di crioconservazione degli spermatozoi di astore effettuati per i tre esemplari A,B,C

¹ I campioni di eiaculati di astore raccolti sono stati classificati utilizzando la lettera di riconoscimento dell'animale seguita da un numero progressivo (es. A1, B1,C1 etc). I campioni di eiaculati crioconservati sono stati etichettati aggiungendo all'identificativo del campione il numero 1 quando è stato utilizzato il I° protocollo, il numero 2 nei casi in cui è stato applicato il II° protocollo, il numero 3 nei campioni di eiaculato crioconservati con il III° protocollo (es. A1_1, A1_2, A1_3 etc). Tale nomenclatura verrà successivamente utilizzata per illustrare i risultati ottenuti.

2.6 Metodi di scongelamento e valutazione post-scongelamento degli spermatozoi di astore e fagiano

Quando è stata utilizzata la procedura con il DMA lo scongelamento è avvenuto mettendo i pellet in un piccolo piatto di alluminio su piastra riscaldata a 50 ° C e il campione è stato raccolto con l'ausilio di una micropipetta. Nel protocollo che ha previsto l'utilizzo del glicerolo come crioprotettore, invece, le cryovials estratte dal contenitore dell'azoto liquido a -196° sono state tenute per 2 minuti in ghiaccio e poi immerse in un bagnetto d'acqua a 39°C per 20 secondi.

La qualità dei tre protocolli di crioconservazione degli spermatozoi utilizzati è stata valutata analizzando i seguenti parametri:

- a) motilità “soggettiva” con Camera di Makler;
- b) vitalità degli spermatozoi con colorazione eosina-nigrosina;
- c) mobilità con il metodo Accudenz;
- d) saggio di interazione spermatozoi scongelati – strato perivitellino;
- e) analisi al SEM e al TEM.

Le metodiche utilizzate per l'analisi di questi parametri sono state descritte nel paragrafo 2.3. I risultati ottenuti nei campioni di eiaculato scongelati sono stati poi messi a confronto con quelli rilevati sugli stessi campioni subito prima del processo di crioconservazione.

3 RISULTATI

3.1 Raccolta degli spermatozoi

3.1.1 Astore

I campioni di sperma sono stati raccolti in tre stagioni riproduttive consecutive (2012-2013-2014) dai tre esemplari di astore (A,B,C) attraverso il metodo cooperativo.

Per ogni animale sono stati effettuati diversi tentativi di raccolta degli spermatozoi per ottenere campioni utilizzabili ai fini della sperimentazione. In particolare, nel corso dei tre anni sono stati fatti in totale 216 tentativi di raccolta dello sperma ottenendo 178 (82,39%) eiaculati non contaminati da feci e urine, e quindi utilizzabili per gli esperimenti programmati. Nelle tabelle seguenti (tabelle 16,17,18) vengono mostrati, in dettaglio per ciascun mese, i tentativi di raccolta effettuati durante le tre stagioni riproduttive oggetto del mio studio e il numero di eiaculati ottenuti.

Come si può vedere, il mese in cui gli animali hanno risposto maggiormente ai richiami dell'operatore è stato aprile, durante il quale dei 72 tentativi effettuati 64 (pari all'89%) sono andati a buon fine ed hanno fornito eiaculati non contaminati. Il mese con la minor percentuale di riuscita invece è stato maggio, quindi a fine stagione riproduttiva. Esaminando i dati per i diversi animali, quello che ha fornito il maggior numero di eiaculati è stato il maschio C (il più giovane dell'allevamento), mentre il maschio A (il più vecchio) è stato quello che ha fornito il minor numero di campioni. La resa maggiore in assoluto pari al 95,8% è stata rilevata nel maschio C durante il mese di aprile.

Maschio	Totale tentativi raccolta marzo	Totale eiaculati ottenuti marzo	Percentuale di successo marzo
A	24	17	70,8%
B	24	19	79,1%
C	24	21	87,5%

Tabella 16: campionamenti relativi al mese di marzo

Maschio	Totale tentativi raccolta aprile	Totale eiaculati ottenuti aprile	Percentuale di successo aprile
A	24	20	83,3%
B	24	21	87,5%
C	24	23	95,8%

Tabella 17: campionamenti relativi al mese di aprile

Maschio	Totale tentativi raccolta maggio	Totale eiaculati ottenuti maggio	Percentuale di successo maggio
A	24	18	75%
B	24	19	79,1%
C	24	20	83,3%

Tabella 18: campionamenti relativi al mese di maggio

3.1.2 Fagiano

I campioni di sperma sono stati raccolti durante la stagione riproduttiva (marzo-giugno) da 12 esemplari di fagiano con il metodo del massaggio dorso-addominale.

In totale sono stati effettuati 132 tentativi di raccolta dello sperma ottenendo 127 (96,21%) eiaculati utilizzabili per gli esperimenti programmati. In tabella 19 viene mostrato, il dettaglio per ciascuno mese, dei tentativi di raccolta effettuati e il numero di eiaculati ottenuti.

Mese	Totale tentativi raccolta	Totale eiaculati ottenuti	Percentuale di successo
Maggio	84	79	94,05%
Giugno	48	48	100%

Tabella 19: dettaglio dei tentativi di raccolta degli eiaculati effettuati per il fagiano

3.2 Analisi quantitativa e qualitativa dello sperma

3.2.1. Astore

Come descritto nel paragrafo 2.3 dei “Materiali e metodi”, i parametri presi in considerazione per la caratterizzazione dello sperma fresco di astore sono stati:

- a) volume;
- b) concentrazione;
- c) motilità “soggettiva” con Camera di Makler;
- d) mobilità con il metodo Accudenz;
- e) percentuale degli spermatozoi vivi e delle anomalie spermatiche;
- f) saggio di interazione sperma-uovo;
- g) dati di fertilità nell’inseminazione artificiale.

- a) Il volume dell’ejaculato raccolto, non contaminato da feci e urine, è risultato compreso in un *range* che va da un minimo di $27,76 \pm 7,79 \mu\text{l}$ ad un massimo di $89,57 \pm 9,19 \mu\text{l}$ (Tabella 20). I volumi più elevati sono stati ottenuti nell’animale C, il più giovane dell’allevamento, mentre il mese in cui sono stati registrati i valori più elevati in termini di volume è stato aprile ($p < 0,001$).

Volume in μl media $\pm$ SD			
Esemplare	Marzo	Aprile	Maggio
A	27,76 $\pm$ 7,79	58,79 $\pm$ 5,16	23,86 $\pm$ 4,35
B	33,83 $\pm$ 8,86	78,6 $\pm$ 4,71	28,89 $\pm$ 6,02
C	45,33 $\pm$ 5,58	89,57 $\pm$ 9,19	32,41 $\pm$ 12,02

Tabella 20: volumi di ejaculato raccolti durante le tre stagioni riproduttive nei maschi A,B,C.

- b) La concentrazione dei diversi ejaculati è risultata compresa in un *range* che va da un minimo di $184,28 \times 10^3 \pm 33$ ad un massimo di $1.137,28 \times 10^6 \pm 255,36$ spermatozoi per millilitro (Tabella 21). Analogamente a quanto osservato per il “volume”, anche per la concentrazione i valori più bassi sono stati ottenuti nell’esemplare più vecchio (maschio A), mentre i più alti in quello più giovane

(maschio C). Il mese in cui sono stati ottenuti i valori più alti di concentrazione è stato aprile.

Concentrazione in sperm x ml media $\pm$ SD			
Esemplare	Marzo	Aprile	Maggio
A	184,28 x 10 ³ $\pm$ 33	408,42 x 10 ³ $\pm$ 46,44	232,17 x 10 ³ $\pm$ 21
B	302,10 x 10 ³ $\pm$ 10,07	593,1x 10 ³ $\pm$ 28,88	250,52 x 10 ³ $\pm$ 42,41
C	477 x 10 ³ $\pm$ 26,23	1137,28 x10 ⁶ $\pm$ 255,36	384,75 x 10 ³ $\pm$ 81,80

Tabella 21: concentrazioni rilevate nei campioni di eiaculati durante le tre stagioni riproduttive nei maschi A,B,C

- c) La motilità degli spermatozoi, come descritto nel capitolo 2, è stata valutata inizialmente attraverso l'osservazione al microscopio ottico, impiegando la “camera di Makler”. Con questa analisi è stata osservata una motilità elevata durante tutta la stagione riproduttiva. Infatti, una percentuale compresa tra 57,77% e 84,41% di cellule si è rivelata motile (Tabella 22). I valori più bassi sono stati registrati all'inizio e alla fine della stagione riproduttiva nel maschio più anziano (maschio A), mentre la più alta nell'animale più giovane (maschio C). Differenze significative ($p < 0.001$) sono state trovate a marzo tra i campioni A e B contro l'animale C.

Percentuale di spermatozoi motili			
Esemplare	Marzo	Aprile	Maggio
A	57,77 $\pm$ 7,87	79,94 $\pm$ 2,99	79,17 $\pm$ 4,24
B	67,39 $\pm$ 7,29	82,85 $\pm$ 4,98	79,78 $\pm$ 4,92
C	82,5 $\pm$ 5,38	84,41 $\pm$ 2,82	83,56 $\pm$ 3,48

Tabella 22: percentuali degli spermatozoi motili (esprese come media $\pm$ SD) osservate durante le tre stagioni riproduttive nei maschi A,B,C

- d) La mobilità degli spermatozoi, come illustrato nel paragrafo 2.3, viene definita come la capacità degli stessi di muoversi contro una resistenza alla temperatura corporea.

Utilizzando la procedura Accudenz vengono ricreate in vitro le condizioni che gli spermatozoi ritrovano all'interno delle vie riproduttive femminili. Quindi con questa metodica è possibile verificare la mobilità degli spermatozoi, monitorando

l'aumento della densità ottica, rilevata tramite uno spettrofotometro, proporzionale al grado di mobilità degli spermatozoi presenti nel campione.

Assorbanze osservate con il metodo Accudenz			
Esemplare	Marzo	Aprile	Maggio
A	0,08±0,01	0,21±0,02	0,09±0,02
B	0,14±0,02	0,27±0,03	0,16±0,01
C	0,23±0,01	0,84±0,01	0,20±0,01

Tabella 23: Assorbanze rilevate su campioni di eiaculato (due campioni per esemplare per ciascun mese di campionamento) tramite il metodo Accudenz nei tre maschi A,B,C.

Come si evince dai dati sopra riportati (tabella 23), non tutti gli spermatozoi risultati motili alla Camera di Makler hanno poi mostrato mobilità all'analisi con il test di Accudenz. Dall'analisi di tali dati emerge che gli spermatozoi del maschio C sono quelli con la maggiore mobilità, mentre il mese in cui i gameti maschili dei tre esemplari hanno mostrato un'elevata capacità di movimento è aprile.

- e) La vitalità degli spermatozoi nei campioni di sperma raccolti è stata determinata attraverso il metodo della colorazione eosina-nigrosina, così come descritto nei "Materiali e Metodi". Questa tecnica si basa sulla differente colorazione che assumono gli spermatozoi morti (colorati di rosa, come appaiono al microscopio ottico) rispetto a quelli vivi (non colorati, in quanto la loro membrana integra non permette la penetrazione del colorante) (Figura 37).

Da questo tipo di analisi è risultato che la percentuale di spermatozoi vitali (Tabella 24) è compresa tra 74,33% e 90,23% nei tre maschi A,B,C.

Percentuale di spermatozoi vitali			
Esemplare	Marzo	Aprile	Maggio
A	74,33±5,15	83,10±4,86	80,94±5,53
B	84,31±5,40	86,95±4,15	86,02±5,04
C	78,3±5,45	90,23±2	88,55±4,40

Tabella 24: percentuali degli spermatozoi vitali (espresse come media ± SD) osservate durante le tre stagioni riproduttive nei maschi A,B,C

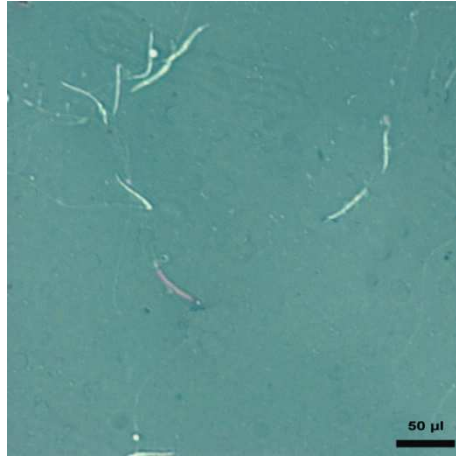


Figura 30: Immagine al microscopio ottico (40x) che illustra la differente colorazione che assumono gli spermatozoi vivi/morti.

All'osservazione al microscopio ottico gli spermatozoi di astore appaiono come delle lunghe cellule filiformi (Figura 38 A-B). Tra gli spermatozoi risultati vitali alla colorazione eosina-nigrosina sono state osservate anche alcune cellule con delle anomalie morfologiche, in un *range* tra 9,87% e 16,72% (Tabella 25), che sono state suddivise in:

- 1) Anomalie a carico della testa
- 2) Anomalie a carico della coda

Per quanto riguarda le anomalie della testa, quelle maggiormente osservate sono la mancanza dell'acrosoma e il ripiegamento della testa con diversi gradi di curvatura (Figura 38 C-E). A livello della coda l'unica anomalia osservabile è invece l'“attorcigliamento” di questa regione dello spermatozoo (Figura 38 E).

Percentuali degli spermatozoi vitali con anomalie morfologiche			
Esemplare	Marzo	Aprile	Maggio
A	16,72±4,67	13,04±3,86	15,47±5,36
B	13,71±3,16	14,87±3,86	16,7±5,54
C	14±3,43	9,87±6,25	11,97±5,32

Tabella 25: percentuali degli spermatozoi vitali con anomalie morfologiche (esprese come media ± SD) osservate durante le tre stagioni riproduttive nei maschi A,B,C

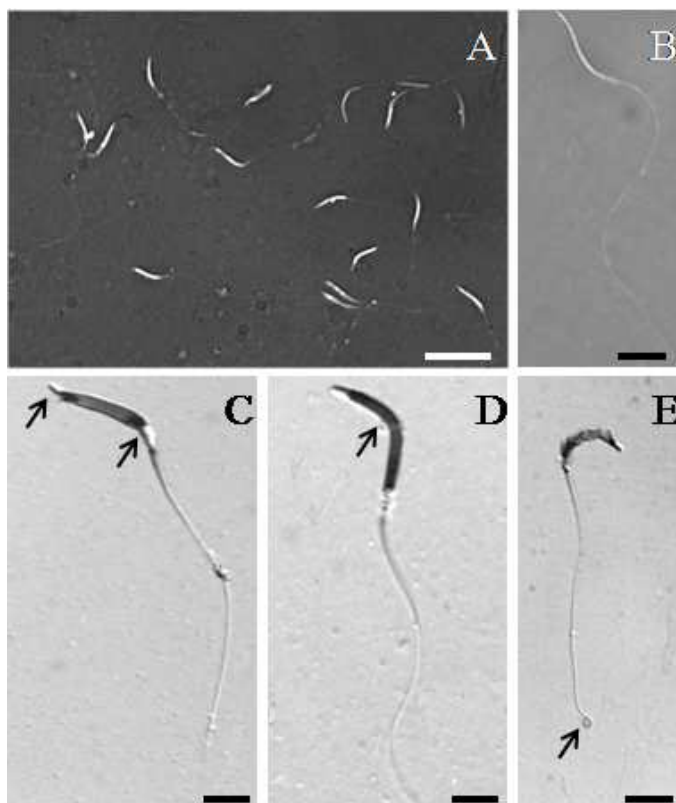


Figura 31: Immagini dello spermatozoo di astore al microscopio ottico. A: immagine di un gruppo di spermatozoi d'astore (barra=50 μm). B: spermatozoo di astore (barra=20 μm). C: spermatozoo di astore che presenta anomalie a livello dell'acrosoma e del pezzo intermedio della coda (*freccie*) (barra=20 μm). D: spermatozoo di astore che presenta la testa ripiegata (*freccia*) (barra=20 μm). E: spermatozoo che presenta il pezzo terminale della coda attorcigliato (*freccia*) (barra=20 μm).

- f) Saggio di interazione in vitro sperma-uovo: come descritto nel paragrafo 2.3, questo saggio si basa sulla capacità degli spermatozoi di penetrare la membrana perivitellina dell'uovo e ci fornisce indicazioni sulla loro capacità fecondante. L'interazione tra gli spermatozoi di astore e lo strato perivitellino è stata valutata contando i piccoli fori neri presenti nello strato perivitellino (Figura 39).

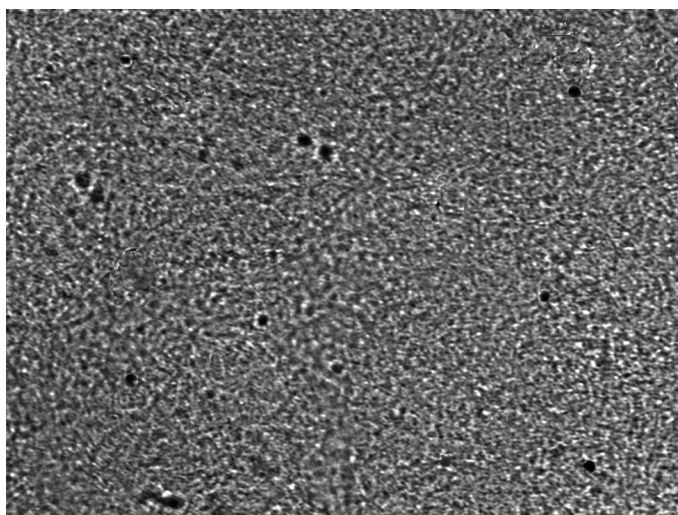


Figura 32: immagine al microscopio ottico (40x) dove sono evidenziati (freccie) i fori praticati dagli spermatozoi sulla membrana perivitellina

Questo tipo di test è stato effettuato soltanto nell'ultima stagione di studio (2014) per avere un'ulteriore conferma della buona qualità del seme. I risultati ottenuti con questo saggio sono in linea con quanto già ottenuto con gli altri test. In generale il numero di fori presenti in 1 mm² di membrana perivitellina negli eiaculati freschi dei tre animali è compreso tra 11 e 17 (Tabella 26). Gli spermatozoi che hanno mostrato maggiore capacità di penetrare lo strato perivitellino sono quelli del maschio C, il più giovane, mentre per il maschio A, il più anziano, sono stati rilevati i valori più bassi.

Risultati ottenuti saggio interazione sperma-uovo			
Esemplare	Marzo	Aprile	Maggio
A	11±4,14	14±3,74	12±2,94
B	13±4,24	15±2,36	13±2,94
C	15±3,66	17±2,63	16±3,65

Tabella 26: numero di fori presenti in 1 mm² di membrana perivitellina osservati durante la stagione riproduttiva nei maschi A,B,C

g) Inseminazione artificiale: le tre femmine di astore (D,E,F) sono state inseminate, tramite il metodo cooperativo, durante la stagione riproduttiva 2013.

In totale sono stati effettuati 24 tentativi di inseminazione come riportato nella tabella 27. Di questi; l'80% sono andati a buon fine, ottenendo la deposizione di 19 uova delle quali 18 si sono schiuse.

Femmina	Numero di inseminazioni totali	Uova fertili	Nuovi nati	Femmine nate	Maschi nati
Femmina D	9	7	6	4	2
Femmina E	8	6	6	1	5
Femmina F	7	6	6	3	3

Tabella 27: dati ciascuna femmina inerenti gli esperimenti di inseminazione artificiale

Tra i 18 pulcini nati, le femmine hanno mostrato un peso medio di $36,58 \pm 2,82$ grammi, nei maschi si è riscontrato un peso medio di $36,51 \pm 2,70$ grammi.

Per l'alimentazione è stato seguito lo schema riportato in Tabella 12. Da una verifica effettuata dopo i primi 10 giorni di vita è stato possibile osservare una sopravvivenza dell'80% dei nuovi nati, con un accrescimento medio di $372,28 \pm 42,82$ grammi per le femmine e di $390,5 \pm 49,62$ grammi per i maschi. La mortalità dopo 10 giorni si è verificata in 3 individui nati con un peso inferiore alla norma sin dalla nascita (una femmina e due maschi) e i dati relativi sono riportati nelle Tabelle 28 e 29.

Durante il primo mese i piccoli si sono irrobustiti e hanno raggiunto un peso di $1255 \pm 131,93$ grammi le femmine e di $791,62 \pm 37,89$ grammi i maschi.

Il peso medio riscontrato nei nuovi nati dopo il primo mese di vita è simile a quello riscontrato negli adulti presi in esame. Infatti è proprio durante i primi 30 giorni di vita che gli astori si irrobustiscono.

In Tabella 28 vengono riassunti i dati osservati per gli esemplari femmine nate mentre in Tabella 29 vengono riportati i dati relativi per gli esemplari maschi nati.

Esemplare	Peso alla nascita	Sopravvivenza dopo 10 giorni	Peso dopo 10 giorni	Peso dopo 30 giorni
Femmina D1	37 gr	SI	346 gr	1236 gr
Femmina D2	30 gr	NO	-----	-----
Femmina D3	36,50 gr	SI	300 gr	1120 gr
Femmina D4	38,50 gr	SI	395 gr	1386 gr
Femmina E1	37,50 gr	SI	386 gr	1378 gr
Femmina F1	38,00 gr	SI	365 gr	1097 gr
Femmina F2	39 gr	SI	438 gr	1400 gr
Femmina F3	36,20 gr	SI	376 gr	1168 gr

Tabella 28: Dati relativi alle femmine nate a seguito dell'inseminazione artificiale delle uova

Esemplare	Peso alla nascita	Sopravvivenza dopo 10 giorni	Peso dopo 10 giorni	Peso dopo 30 giorni
Maschio D1	35 gr	SI	310 gr	725 gr
Maschio D2	36, 50 gr	SI	356 gr	764 gr
Maschio E1	38 gr	SI	415 gr	815 gr
Maschio E2	33 gr	NO	-----	-----
Maschio E3	40 gr	SI	438 gr	836 gr
Maschio E4	32 gr	NO	-----	-----
Maschio E5	37,40 gr	SI	401 gr	813 gr
Maschio F1	35,50 gr	SI	320 gr	760 gr
Maschio F2	37 gr	SI	415 gr	800 gr
Maschio F3	39,20 gr	SI	426 gr	820 gr

Tabella 29: Dati relativi ai maschi nati a seguito dell'inseminazione artificiale delle uova

3.2.2 Fagiano

I parametri presi in considerazione per la caratterizzazione dello sperma fresco di fagiano sono stati:

- volume;
- concentrazione;
- mobilità con il metodo Accudenz;
- percentuale degli spermatozoi vivi e delle anomalie spermatiche;

- a) Il volume totale di eiaculato raccolto è risultato compreso in un *range* che va da un minimo di 89,1 µl ad un massimo di 141,3 µl (Tabella 39). Il mese in cui sono stati registrati i valori più elevati in termini di volume è stato maggio.
- b) La concentrazione dei diversi eiaculati è risultata compresa in un *range* che va da un minimo di $8,15 \times 10^9$ ad un massimo di $10,60 \times 10^9$ spermatozoi per millilitro e si è mantenuta costante per l'intera stagione riproduttiva.
- c) La vitalità degli spermatozoi è stata valutata tramite la colorazione eosina-nigrosina. La percentuale di spermatozoi vitali (Tabella 39) è compresa tra 79,5% e 91,5% e tra questi una percentuale che va dal 16,8% al 45,4% ha mostrato delle anomalie morfologiche. Le percentuali più alte di spermatozoi anormali si sono riscontrate ad inizio stagione riproduttiva.
- d) La mobilità è stata analizzata tramite il metodo Accudenz e l'assorbanza dei diversi campioni, che sta ad indicare la percentuale di spermatozoi mobili presenti all'interno della soluzione densa di Accudenz è risultata compresa in un range che va da 0,193 a 0,299 e si è mantenuta costante per l'intera stagione riproduttiva (Tabella 39).

3.3 Analisi morfologica-ultrastrutturale degli spermatozoi di astore e fagiano

Gli spermatozoi delle due specie oggetto del mio studio, l'astore e il fagiano, analizzati al microscopio elettronico a scansione e a trasmissione hanno mostrato una morfologia ed una ultrastruttura molto simili. Per questa ragione, nei paragrafi seguenti verrà fatta un'unica descrizione dettagliata per i gameti maschili delle due specie.

Morfologia dello spermatozoo al SEM

Da un'analisi morfologica al SEM (Figure 40-41) gli spermatozoi di astore e di fagiano appaiono filiformi e di una lunghezza pari rispettivamente a 74 μm e 77 μm .

In entrambe le specie i gameti maschili sono formati da una testa ben distinguibile lunga circa 7 μm nell'astore e 11 μm nel fagiano, e una coda, lunga circa 67 μm nella prima specie e 56 μm nella seconda. Le due regioni sono collegate tra loro da un collo difficilmente riconoscibile ad un'analisi superficiale esterna (Figure 40-41).

La testa dello spermatozoo

Al SEM ed al TEM è evidenziabile a livello della testa dello spermatozoo la presenza, di un acrosoma, che ha una lunghezza rispettivamente pari a circa 1,4 μm (per l'astore) e 2,2 μm (per il fagiano) (Figure 42 A-B; 43 A-C).

All'osservazione al TEM la vescicola acrosomiale, per le due specie, appare come una struttura conica, sovrastante il nucleo (Figure 42 B; 43 B-C), all'interno della quale è visibile materiale omogeneo e moderatamente elettrondenso (Figure 42 B-E; 43 B-F). Nello spazio subacrosomiale, riconoscibile per la sua scarsa elettrodensità (Figure 42 B; 43 C), è contenuto il *perforatorium* (Figure 42 B, D-E; 43 C, E-G). Quest'ultimo è una struttura allungata che distalmente si inserisce in un canale endonucleare della regione anteriore del nucleo (Figure 42 B; 43 C). Nella regione di passaggio tra l'acrosoma e il nucleo, in corrispondenza del punto in cui il nucleo si solleva a formare il cosiddetto rostro nucleare (Figure 42 B, 43 C), il *perforatorium* presenta un ispessimento (Figure 42 B; 43 C). Il nucleo, di forma cilindrica, (Figure 42 B; 43 C) è caratterizzato da forte elettrondensità, data dalla cromatina altamente condensata (Figure 42 B, E-F; 43 B-C, F-H). Data l'estrema specializzazione della cellula spermatica, la forte riduzione del contenuto citoplasmatico comporta una stretta adesione tra la membrana nucleare e la membrana plasmatica (Figure 42 B, F; 43 B-C,H).

La regione di transizione tra la testa e la coda è rappresentata dal collo; caratterizzato da una fossa di impianto, la cosiddetta “piastra basale”, alla base del nucleo, che nell’astore appare come una struttura concava simmetrica (Figura 44 B); mentre nel fagiano ha una forma concava ma asimmetrica (Figura 45 B-C).

La coda dello spermatozoo

Attraverso l’analisi al TEM, è stato possibile distinguere le tre seguenti regioni della coda:

1. Pezzo intermedio
2. Pezzo principale
3. Pezzo terminale

Il pezzo intermedio

Il pezzo intermedio è il primo segmento della coda che si sviluppa dal collo fino all’*annulus*, struttura questa che segna il passaggio al pezzo principale della coda sia nell’astore che nel fagiano (Figure 44 A-B; 45 A,D).

In questa regione sono localizzati i centrioli, prossimale e distale, disposti tra loro perpendicolarmente (Figure 44 B-D; 45 B-C). In entrambe le specie, il centriolo prossimale è costituito da nove triplette di microtubuli circondati da un anello di materiale elettrendenso, come evidenziato nel fagiano in figura 45 inserto B. Il centriolo distale, funge da corpo basale dal quale si sviluppa il flagello e nell’astore si estende per un breve tratto del pezzo intermedio (Figura 44 B) ed è caratterizzato dalla presenza di materiale granulare all’interno di esso (Figura 44 B), mentre nel fagiano si può osservare lungo l’intera lunghezza di questa regione della coda (Figura 45 B-C) ed è contraddistinto da regioni di materiale elettrendenso nella sua cavità centrale (Figura 45 B).

Nel pezzo intermedio della coda l’assonema presenta nove fibre dense chiaramente distinguibili in sezione trasversale al TEM per la loro elettrendensità (Figure 44 E; 45 D inserto).

Il tratto prossimale dell’assonema e la regione centriolare risultano circondati da un manicotto di mitocondri (Figure 44 B-E; 45 B-D).

In particolare, nell’astore in sezione longitudinale possono essere osservate 5-6 sezioni mitocondriali (Figure 44 B, C-E) e 4 in sezione trasversale per un totale di 20-24

mitocondri posizionati lungo il collo e il pezzo intermedio. Nel fagiano (Figure 45 B-C; 45 D inserto), tale manicotto è composto da 24 mitocondri disposti 6 in sezione longitudinale e 4 in sezione trasversale.

Il pezzo principale

Tale regione è caratterizzata, in entrambe le specie, dalla presenza di una guaina fibrosa che circonda l'assonema (Figure 46 A-B; 47 B). In sezione trasversale Al TEM l'assonema presenta la tipica struttura "9+2" con 9 doppietti di microtubuli esterni disposti ad intervalli regolari e una coppia di microtubuli centrali (Figure 46 inserti A-B-C; 47 inserti A-B). Nel dettaglio, la subunità A di ciascun doppietto mostra un profilo circolare ed è formata da materiale elettrondenso; la subunità B invece è attaccata alla subunità A ed è formata da un cilindro elettrontrasparente. I doppietti esterni sono collegati alla coppia centrale di microtubuli attraverso una serie di raggi radiali, chiaramente visibili in sezione trasversale (Figure 46 inserto A; 47 inserto A).

Nel pezzo principale della coda l'assonema non presenta più le nove fibre dense osservate nel pezzo intermedio.

Il pezzo terminale della coda

In entrambe le specie il pezzo terminale della coda risulta estremamente sottile (Figure 46 C; 47 B) ed è formato principalmente dall'assonema e dal plasmalemma (Figure 46 inserto C; 47 inserto B). In quest'ultimo segmento della coda si perde la guaina fibrosa presente nel pezzo principale.

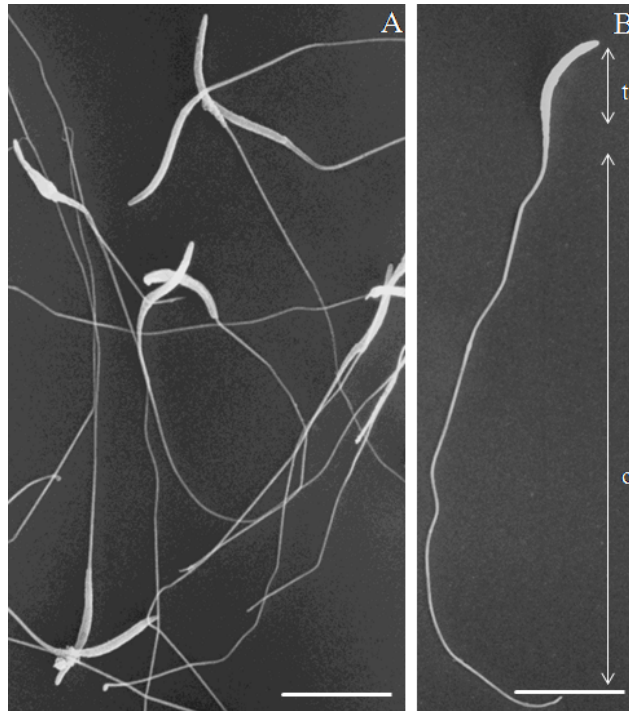


Figura 33: morfologia dello spermatozoo di astore al SEM.
A: immagine di un gruppo di spermatozoi d'astore (barra=10 μ m). **B:** spermatozoo di astore al SEM in cui si evidenziano la testa (*t*) e la coda (*c*) (barra=10 μ m).

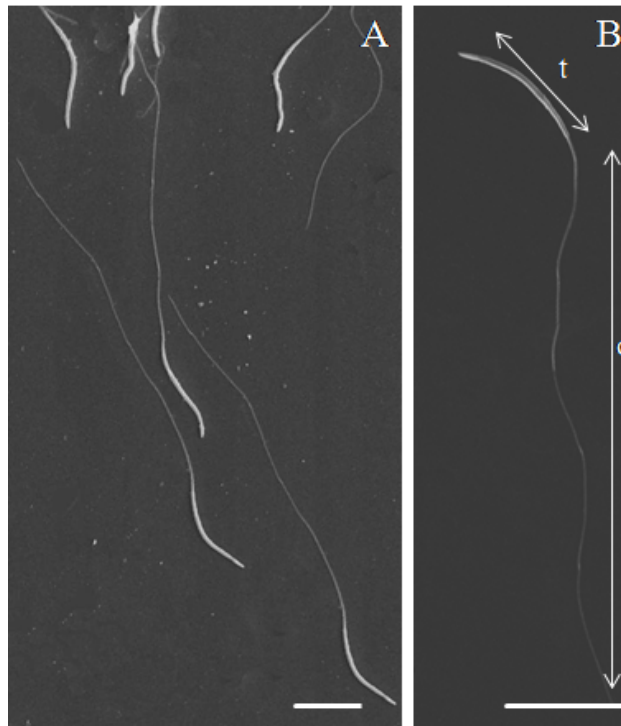


Figura 34: morfologia dello spermatozoo di fagiano al SEM.
A: immagine al SEM di un gruppo di spermatozoi di fagiano (barra=10 μ m). **B:** spermatozoo di fagiano al SEM in cui si evidenziano la testa (*t*) e la coda (*c*) (barra=10 μ m).

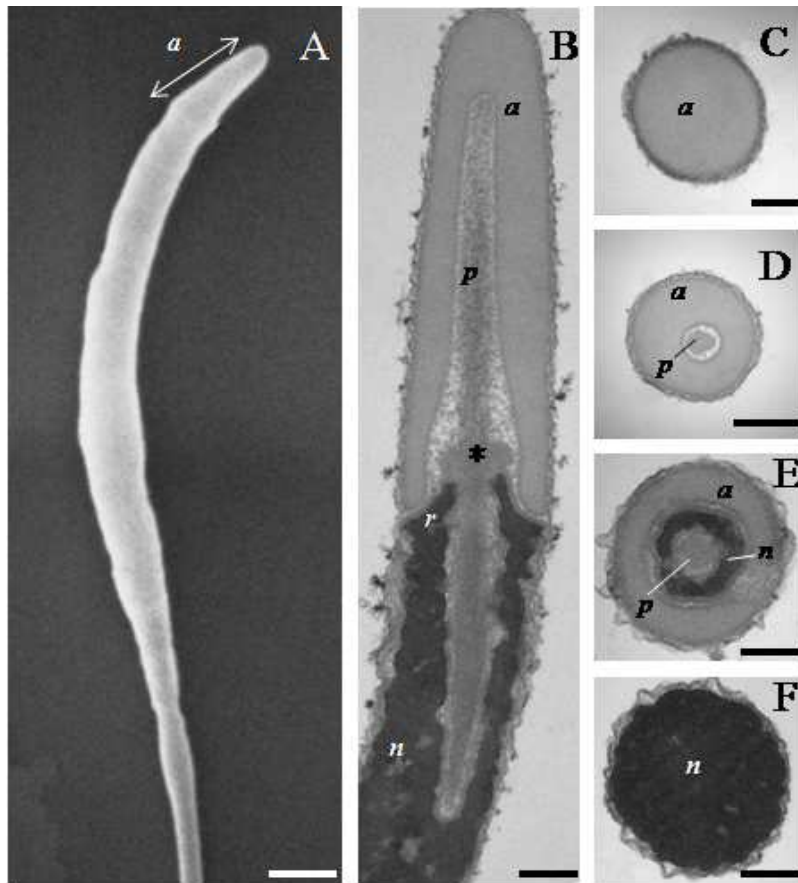


Figura 35: immagini al SEM e al TEM della testa dello spermatozoo di astore. **A:** immagine al SEM della regione acrosomiale (barra= 1 μ m). **B-F:** immagini al TEM della testa dello spermatozoo di astore. **B:** particolare in sezione longitudinale dove è possibile osservare l'acrosoma (*a*), il *perforatorium* (*p*), l'ispessimento (*) del *perforatorium* nel punto in cui il nucleo si innalza a formare il rostro nucleare (*r*) e il nucleo (*n*) (barra=250 nm). **C:** particolare in sezione trasversale della regione acrosomiale (*a*) (barra=100 nm). **D:** particolare in sezione trasversale della regione acrosomiale dove è possibile osservare l'acrosoma (*a*) e il *perforatorium* (*p*) (barra=200 nm). **E:** particolare in sezione trasversale della regione acrosomiale dove è possibile osservare l'acrosoma (*a*), il *perforatorium* (*p*) e il nucleo (*n*) (barra=250 nm). **F:** particolare in sezione trasversale del nucleo dello spermatozoo (barra=250 nm).

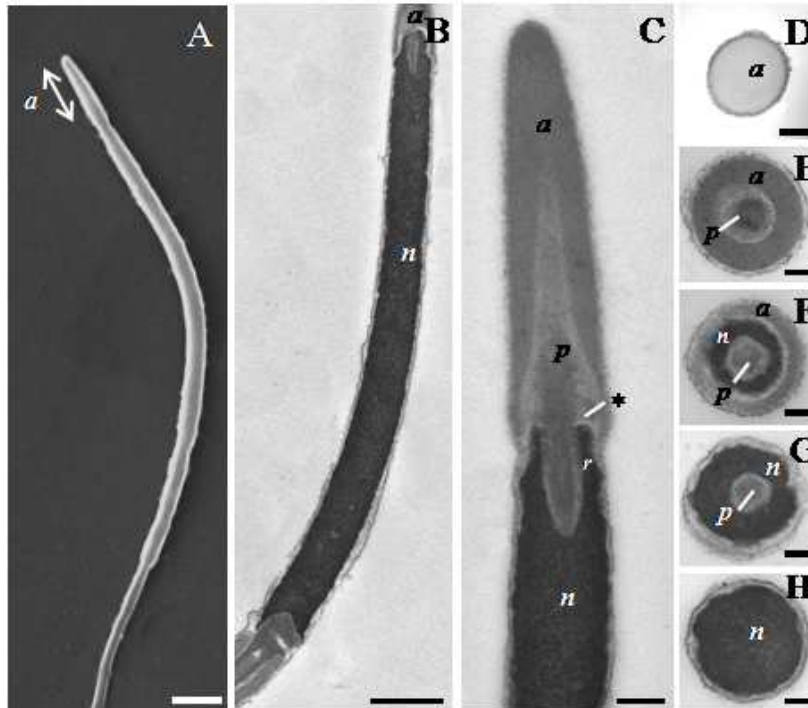


Figura 36: immagini al SEM e al TEM della testa dello spermatozoo di fagiano. A: immagine al SEM della regione acrosomiale (barra= 5 μ m). B-H: immagini al TEM della testa dello spermatozoo di fagiano. B: particolare in sezione longitudinale dove è possibile osservare l'acrosoma (*a*) e il nucleo (*n*) (barra= 500 nm). C: particolare in sezione longitudinale dove è possibile osservare l'acrosoma (*a*), il *perforatorium* (*p*), l'ispessimento (*) del *perforatorium* nel punto in cui il nucleo si innalza a formare il rostro nucleare (*r*) e il nucleo (*n*) (barra= 250 nm). D: sezione trasversale della regione acrosomiale (*a*) (barra=100 nm). E: particolare in sezione trasversale della regione acrosomiale dove è possibile osservare l'acrosoma (*a*) e il *perforatorium* (*p*) (barra=100 nm). F: particolare in sezione trasversale della regione acrosomiale dove è possibile osservare l'acrosoma (*a*), il *perforatorium* (*p*) e il nucleo (*n*) (barra= 100 nm). G: particolare in sezione trasversale della testa dove è possibile osservare il *perforatorium* (*p*) e il nucleo (*n*) (barra= 100 nm). H: particolare in sezione trasversale del nucleo dello spermatozoo (barra=100 nm).

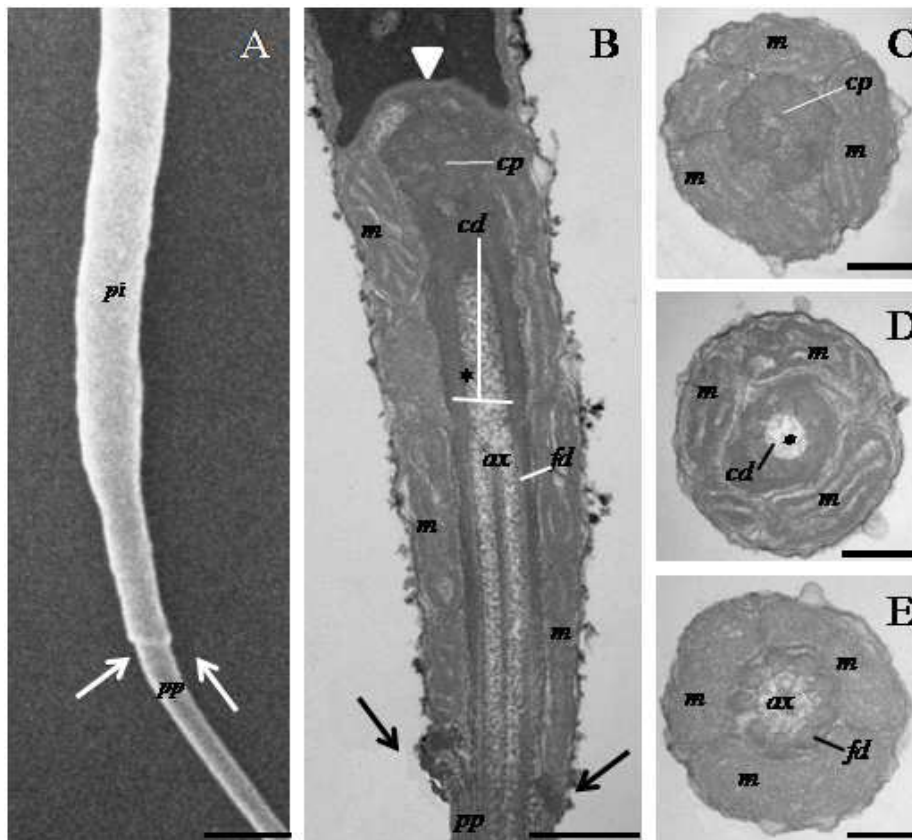


Figura 37: immagini al SEM e al TEM del pezzo intermedio della coda dello spermatozoo di astore. A: immagine al SEM dove è possibile osservare il pezzo intermedio (*pi*), l'*annulus* (freccia) e il pezzo principale (*pp*) (barra= 1 μ m). B-E: immagini al TEM del pezzo intermedio della coda. B: sezione longitudinale in cui sono visibili la fossa d'impianto del nucleo (*testa di freccia*), il centriolo prossimale (*cp*), il centriolo distale (*cd*) che si estende per una breve porzione del pezzo intermedio (*barra*) con al suo interno del materiale granulare (*), i mitocondri (*m*), l'assonema (*ax*), le fibre dense (*fd*) e l'*annulus* (freccie) (barra=500 nm). C: particolare in sezione trasversale del pezzo intermedio della coda dove sono visibili i mitocondri (*m*) e il centriolo prossimale (*cp*) (barra= 250 nm). D: particolare in sezione trasversale del pezzo intermedio della coda dove sono visibili i mitocondri (*m*) e il centriolo distale (*cd*) con al suo interno del materiale granulare (*) (barra= 250 nm). E: particolare in sezione trasversale della regione assomale dove si possono osservare l'assonema (*ax*), i mitocondri (*m*) e le nove fibre dense (*fd*) (barra=250 nm).

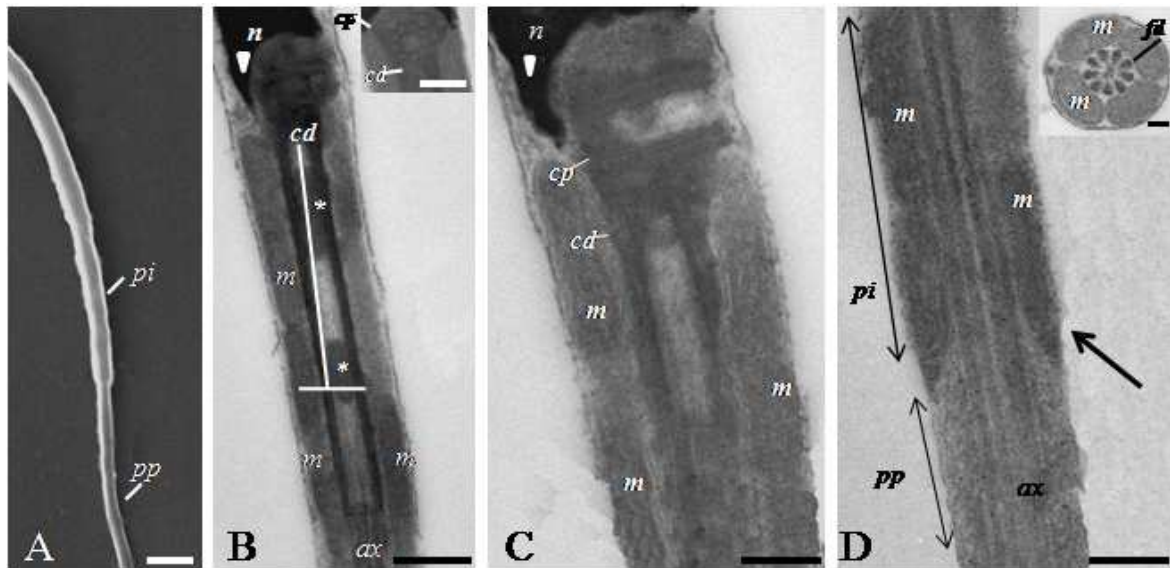


Figura 38: immagini al SEM e al TEM del pezzo intermedio della coda dello spermatozoo di fagiano. A: immagine al SEM della coda dove è possibile osservare il pezzo intermedio (*pi*), e il pezzo principale (*pp*) (barra= 500 nm). B-D: immagini al TEM del pezzo intermedio della coda dello spermatozoo. B: sezione longitudinale in cui sono visibili la fossa d'impianto (*testa di freccia*) del nucleo (*n*), il centriolo distale (*cd*) che si estende per quasi l'intera lunghezza del pezzo intermedio (*barra*) con al suo interno delle regioni di materiale elettrondenso (*), i mitocondri (*m*), e l'assonema (*ax*), (*barra*=500 nm). B inserto: particolare in sezione trasversale della regione centriolare composta dal centriolo prossimale (*cp*) e dal centriolo distale (*cd*) dove sono ben visibili le nove triplette di microtubuli che costituiscono il centriolo prossimale (*barra*= 100 nm). C: sezione longitudinale a ingrandimento maggiore del pezzo intermedio in cui sono visibili la fossa d'impianto (*testa di freccia*) del nucleo (*n*), il centriolo prossimale (*cp*), il centriolo distale (*cd*) e i mitocondri (*m*) (*barra*=250 nm). D: sezione longitudinale dove sono osservabili il pezzo intermedio (*pi*), il pezzo principale (*pp*), l'*annulus* (freccia), i mitocondri (*m*) e l'assonema (*ax*) (*barra*= 250 nm). D inserto: particolare in sezione trasversale dove sono visibili i mitocondri (*m*) e le nove fibre dense (*fd*) (*barra*=100 nm).

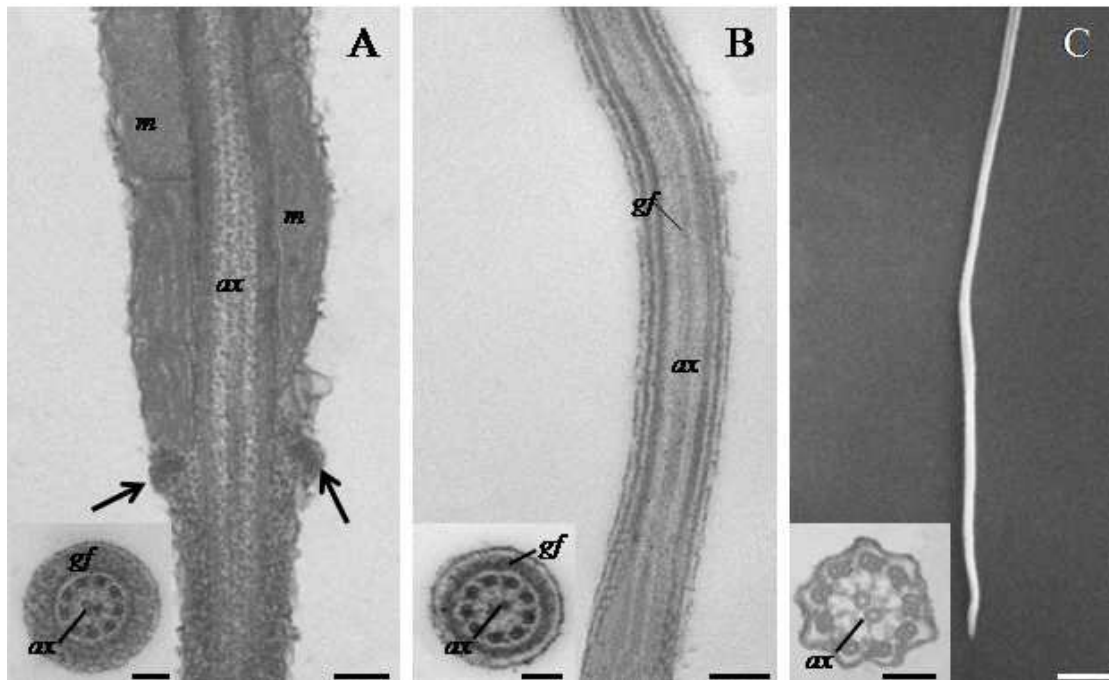


Figura 39: immagini al SEM e al TEM del pezzo principale e terminale della coda dello spermatozoo di astore. A: sezione longitudinale del punto di passaggio tra il pezzo intermedio e il pezzo principale, evidenziabile per la presenza dell'*annulus* (freccie). In questa sezione si osservano anche i mitocondri (*m*) e l'assonema (*ax*) (barra= 250 nm). A inserto: sezione trasversale al TEM del pezzo principale della coda dove sono osservabili la guaina fibrosa (*gf*) e l'assonema (*ax*) (barra= 100 nm). B: sezione longitudinale del pezzo principale della coda dove sono osservabili la guaina fibrosa (*gf*) e l'assonema (*ax*) (barra= 250 nm). B inserto: sezione trasversale al TEM del pezzo principale dove sono osservabili la guaina fibrosa e l'assonema con la sua tipica struttura "9+2" con 9 doppietti di microtubuli esterni disposti ad intervalli regolari e una coppia di microtubuli centrali (barra= 100 nm). C: immagine al SEM del pezzo terminale della coda dello spermatozoo (barra= 1 μ m). C inserto: sezione trasversale al TEM del pezzo terminale della coda costituito esclusivamente dall'assonema e dalla membrana plasmatica (barra= 100 nm).

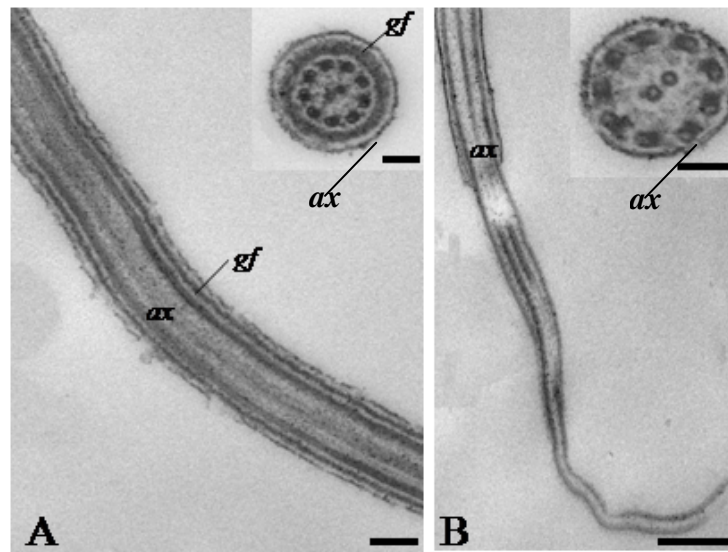


Figura 40: immagini al TEM del pezzo principale e del pezzo terminale della coda dello spermatozoo di fagiano. A: sezione longitudinale del pezzo principale della coda dove sono osservabili la guaina fibrosa (*gf*) e l'assonema (*ax*) (barra= 250 nm). A inserto: sezione trasversale del pezzo principale dove sono osservabili la guaina fibrosa e l'assonema con la sua tipica struttura "9+2" con 9 doppietti di microtubuli esterni disposti ad intervalli regolari e una coppia di microtubuli centrali (barra= 100 nm). B sezione longitudinale del pezzo terminale della coda dello spermatozoo (barra= 500 nm). B inserto: sezione trasversale del pezzo terminale della coda costituito esclusivamente dall'assonema e dalla membrana plasmatica (barra= 100 nm).

3.4 Analisi qualitativa delle anomalie ultrastrutturali evidenziate negli eiaculati freschi di astore e fagiano

Accanto a spermatozoi morfologicamente “normali”, negli eiaculati freschi, sono stati osservati anche spermatozoi con diverse anomalie, sia nell’astore che nel fagiano. Tali anomalie sono state catalogate secondo la classificazione proposta da Du Plessis *et al.* (2011) e riportata nel paragrafo 1.1.4 dell’introduzione.

Anomalie a carico della testa

Le anomalie osservate a livello della testa possono essere suddivise in 2 differenti sottocategorie:

- a) Anomalie dell’acrosoma;
 - b) Anomalie del nucleo.
-
- a) Anomalie dell’acrosoma: l’analisi al SEM ha messo in evidenza anomalie a carico del cappuccio acrosomiale che può essere:
 - a. Mancante: in questi casi è possibile osservare il *perforatorium* (Figura 48 E);
 - b. Deforme: in alcuni spermatozoi l’acrosoma presenta dei rigonfiamenti sulla sua sommità (Figura 48 F).
 - b) Anomalie del nucleo: l’analisi ultrastrutturale al TEM ha permesso di evidenziare le seguenti anomalie a carico del nucleo.
 - a. Ripiegamenti della testa: la testa può presentare ripiegamenti con differenti gradi di curvatura, lieve (Figura 48 A), di maggiore entità con un ripiegamento quasi completo della testa (Figura 48 B), oppure con deviazione ad angolo quando la flessione è localizzata nella zona di passaggio tra la testa e il pezzo intermedio della coda (Figure 48 C-D).
 - b. Anomalie a carico della membrana plasmatica e della cromatina: in alcuni spermatozoi, il nucleo ha mostrato delle rotture a livello della membrana nucleare ed indentazioni nella cromatina (Figura 48 G); in questa alterazione sono spesso osservati anche danni a carico della membrana plasmatica che è spesso assente;

- c. Doppio nucleo: in alcuni gameti maschili sono stati osservati due nuclei (Figura 48 H). Questa alterazione ci ha portato ad ipotizzare la presenza all'interno del liquido seminale fresco di spermatozoi con due teste.

Anomalie a carico della coda

Le anomalie della coda possono essere suddivise in base alla loro localizzazione in:

- a) Anomalie del pezzo intermedio;
 - b) Anomalie del pezzo principale e del pezzo terminale della coda
- a) Anomalie del pezzo intermedio: sono state osservate anomalie in cui il pezzo intermedio mostra rotture o manca della membrana plasmatica. Tale mancanza permette di mettere in evidenza l'organizzazione elicoidale dei mitocondri anche ad un esame morfologico esterno (Figure 49 A-C).
- b) Anomalie del pezzo principale e del pezzo terminale della coda: l'analisi al SEM e al TEM di tale regione della coda ha messo in evidenza le seguenti anomalie:
- a. Ripiegamento della coda: Quest'ultima può presentarsi attorcigliata su se stessa (Figura 50 A), oppure ripiegarsi all'indietro e, nel punto della curvatura, andare a formare un loop (Figura 50 B). Nel ripiegamento la coda può circondare anche la testa (Figure 50 C-G); in alcuni casi si avvolge semplicemente attorno a questa rimanendone però distinta (Figura 50 C), in altri, invece, le due strutture sono rivestite dalla stessa membrana plasmatica come è evidenziato nelle immagini di sezioni trasversali a vari livelli (Figure 50 D-G).
 - b. Anomalie a carico dell'assonema: l'analisi al TEM ha permesso di mettere in evidenza in alcuni gameti la presenza di un doppio assonema (Figura 50 H) che in alcuni casi mostra una organizzazione diversa rispetto al tipico "9+2" osservato negli spermatozoi normali (Figura 50 I). La presenza di due assonemi ci ha portato ad ipotizzare la presenza di spermatozoi con una doppia coda nel liquido seminale fresco.

Gocce citoplasmatiche

Come descritto nell'introduzione nel paragrafo 1.1.4 dei residui citoplasmatici possono essere ancora presenti negli spermatozoi che hanno portato a termine il loro ciclo di sviluppo.

Le gocce citoplasmatiche sono costituite da una matrice citoplasmatica omogenea e sono rivestite dalla membrana plasmatica. Nelle due specie da noi studiate tale anomalie sono state rilevate principalmente a livello della testa e sono chiaramente visibili sia al SEM che al TEM (Figura 51).

Tali rigonfiamenti possono essere piccoli e posizionati lateralmente al nucleo nella regione mediana della testa (Figure 51 A-B), oppure più grandi e interessare sia il nucleo sia la regione prossimale del pezzo intermedio (Figure 51 C-F). In alcuni spermatozoi che presentano gocce di notevole entità è possibile osservare solo la parte anteriore della testa (Figure 51 G-H) in altri invece la testa è completamente inglobata nella goccia (Figure 51 I-L).

Anomalie multiple

Due o più delle alterazioni sopradescritte possono essere presenti in contemporanea sullo stesso spermatozoo, e come descritto nel paragrafo 1.1.4 tali anomalie vengono classificate come anomalie multiple. Tali anomalie multiple comprendono danni a livello della testa che può presentare dei rigonfiamenti citoplasmatici (Figura 52 A), danni acrosomiali (Figura 52 B) e forme diverse rispetto a quella concava (Figura 52 C) e danni a livello del pezzo intermedio che, come sopra descritto, sono rappresentati dalla mancanza di plasmalemma.

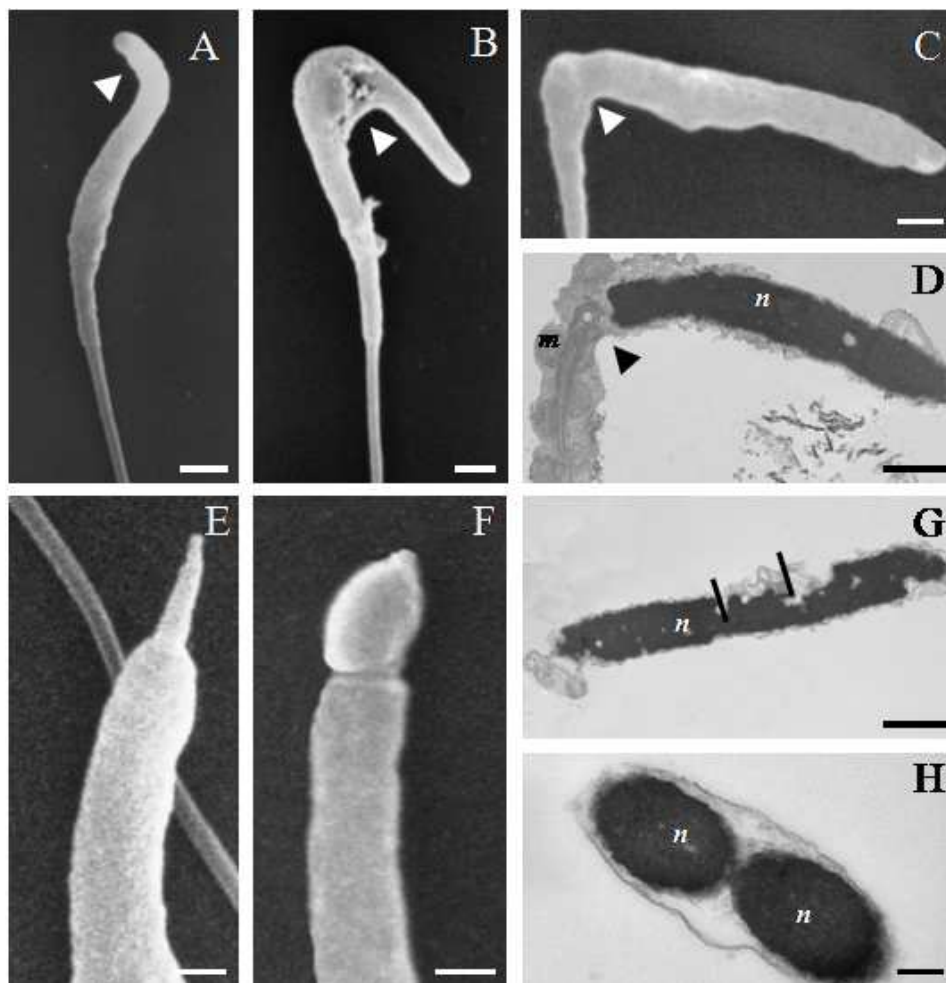


Figura 41: Immagini al SEM e al TEM delle anomalie riscontrate a livello della testa negli spermatozoi freschi di astore e fagiano. A-C: immagini al SEM dove sono visibili ripiegamenti della testa dello spermatozoo con diversi gradi di curvatura (barra=1 μ m). D: immagine trasversale al TEM in cui si ha un ripiegamento ad angolo della testa con interessamento del pezzo intermedio in cui è ben visibile il nucleo (*n*) (barra=250 nm). E-F: immagini al SEM di spermatozoi che presentano anomalie a carico dell'acrosoma (barra=500 nm). G: immagine in sezione longitudinale al TEM in cui sono evidenziabili anomalie a carico del nucleo il quale presenta rotture in alcuni punti della membrana nucleare ed indentazioni nella cromatina (*barre*) (barra=250 nm). H: immagine in sezione trasversale di uno spermatozoo che presenta due nuclei (*n*) (barra=250 nm).

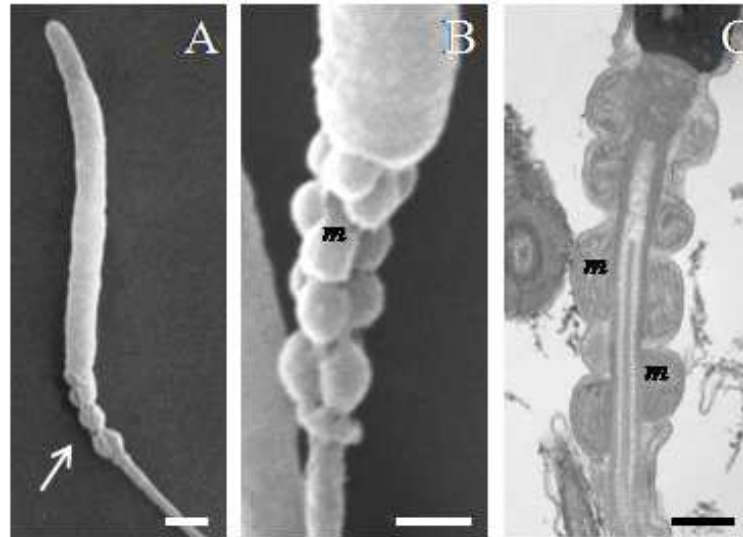


Figura 42: Immagini al SEM e al TEM delle anomalie riscontrate a livello del pezzo intermedio della coda negli spermatozoi freschi di astore e fagiano. A-B: immagini al SEM del pezzo intermedio della coda in cui manca il plasmalemma e dove sono ben visibili i singoli mitocondri (*freccia; m*) (barra A=1 μm ; barra B=0,5 μm). C: immagine in sezione longitudinale al TEM del pezzo intermedio della coda in cui manca il plasmalemma e dove sono ben visibili i singoli mitocondri (*m*) (barra=500 nm)

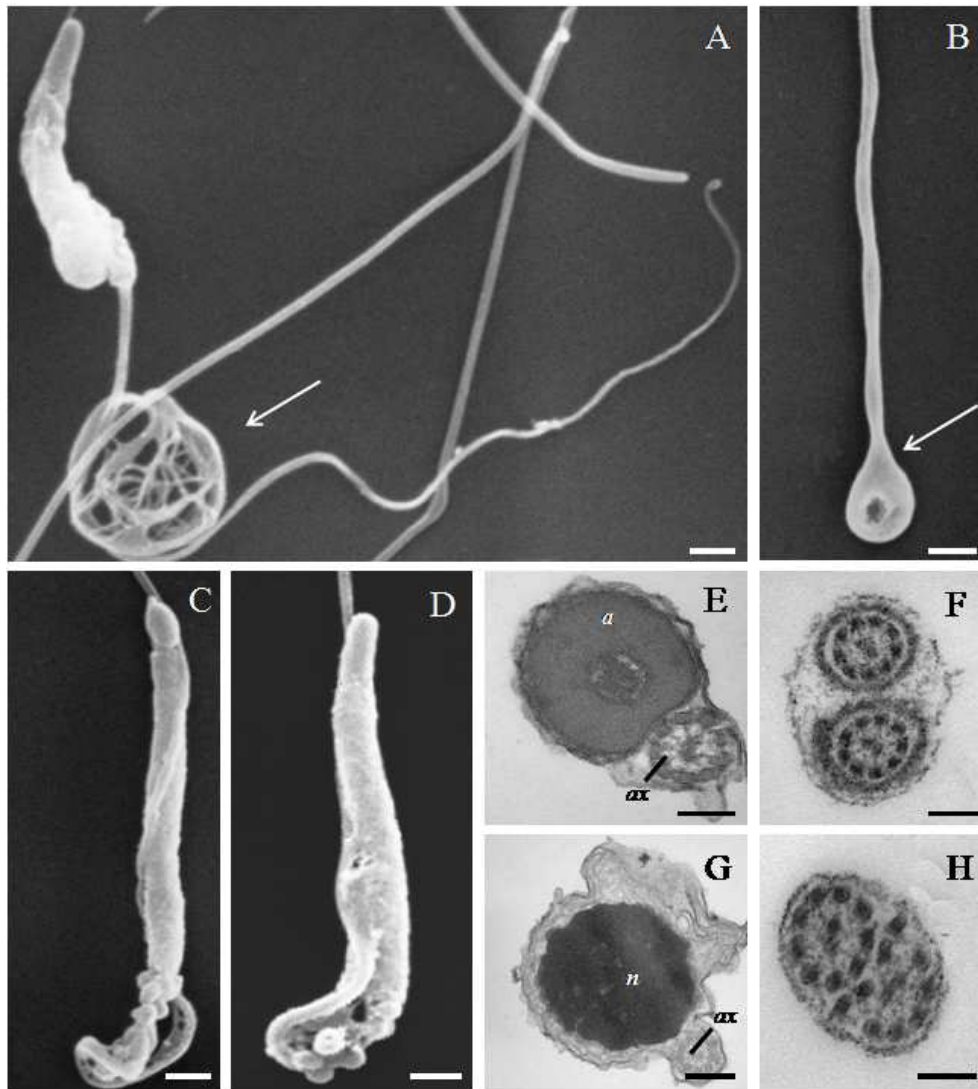


Figura 43: Immagini al SEM e al TEM delle anomalie riscontrate a livello del pezzo terminale della coda negli spermatozoi freschi di astore e fagiano. A: immagine al SEM in cui è visibile l'attorcigliamento della coda dello spermatozoo (barra=1 μ m). B: immagine al SEM in cui la coda è ripiegata all'indietro e va a formare un loop sul punto di curvatura (freccia) (barra=1 μ m). C: immagine al SEM in cui la coda si avvolge semplicemente attorno alla testa rimanendone però distinta (barra=1 μ m). D: immagine al SEM in cui la coda si avvolge intorno alla testa e le due strutture sono avvolte dalla stessa membrana (barra=1 μ m). E: immagine in sezione trasversale al TEM in cui la coda è avvolta intorno alla testa e le due strutture sono circondate dalla stessa membrana. In questa immagine sono visibili l'acrosoma (*a*) e l'assonema (*ax*) (barra=125 nm). F: immagine in sezione trasversale di uno spermatozoo che presenta un doppio assonema (barra= 100 nm). G: immagine in sezione trasversale al TEM in cui la coda è avvolta intorno alla testa e le due strutture sono circondate dalla stessa membrana. In questa immagine sono visibili il nucleo (*n*) e l'assonema (*ax*) (barra=125 nm). H: immagine in sezione trasversale al TEM di uno spermatozoo dove l'assonema ha perso la sua tipica struttura (barra= 100 nm).

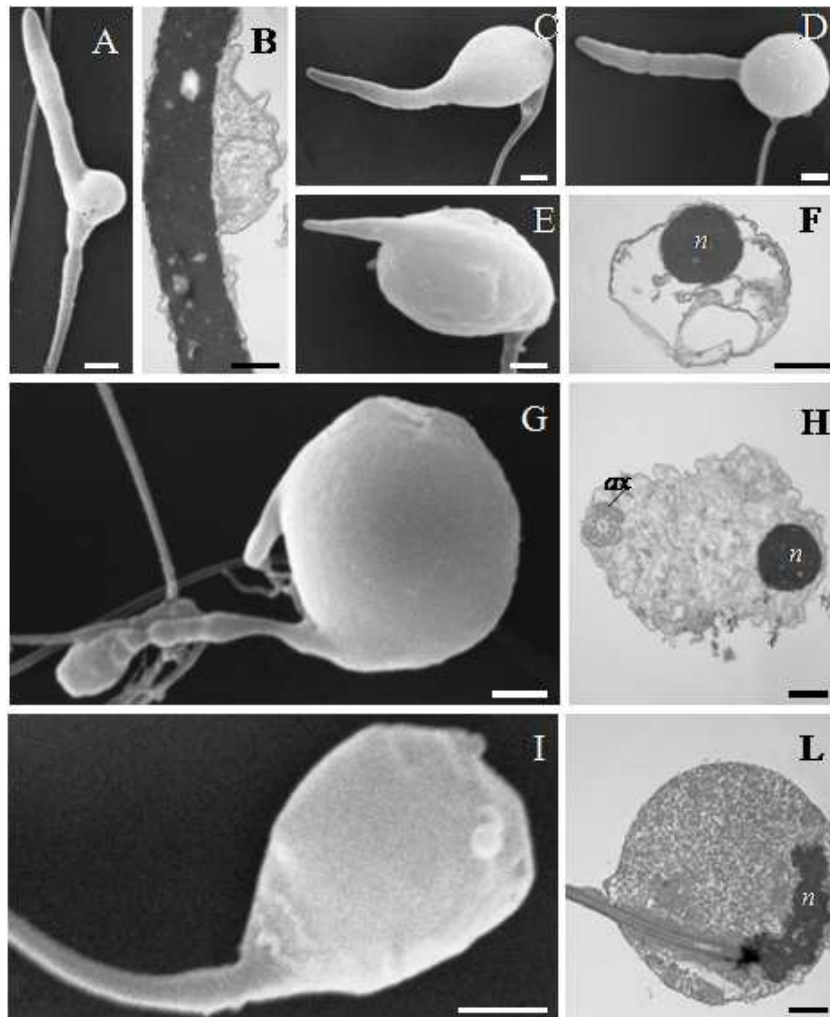


Figura 44: Immagini al SEM e al TEM delle gocce citoplasmatiche osservate negli spermatozoi freschi di astore e fagiano. A: Immagine al SEM di un piccolo abbozzo citoplasmatico posizionato lateralmente al nucleo nella regione mediana della testa (barra=1 μ m). B: immagine al TEM in sezione longitudinale di un piccolo abbozzo citoplasmatico (*) posizionato lateralmente al nucleo nella regione mediana della testa (barra=500 nm). C-D-E: immagini al SEM di rigonfiamenti citoplasmatici che circondano il nucleo e interessano anche la regione prossimale del pezzo intermedio della coda (barra=1 μ m). F: immagine in sezione trasversale al TEM di un rigonfiamento citoplasmatico che circonda il nucleo e interessa anche la regione prossimale del pezzo intermedio della coda (barra=500 nm). G: immagine al SEM in cui il rigonfiamento citoplasmatico oltre a coinvolgere quasi interamente la testa interessa anche la coda dello spermatozoo (barra=1 μ m). H: Sezione trasversale al TEM in cui il rigonfiamento citoplasmatico interessa sia la testa che la coda, in questa immagine sono ben visibili sia il nucleo (*n*) che l'assonema (*ax*) completamente avvolti dal citoplasma (barra=500 nm). I: immagine al SEM in cui la testa è completamente inglobata dal rigonfiamento citoplasmatico (barra=1 μ m). L: sezione trasversale al TEM in cui la testa è completamente inglobata dal rigonfiamento citoplasmatico e nella quale è ben visibile il nucleo (*n*) dello spermatozoo (barra= 500 nm).

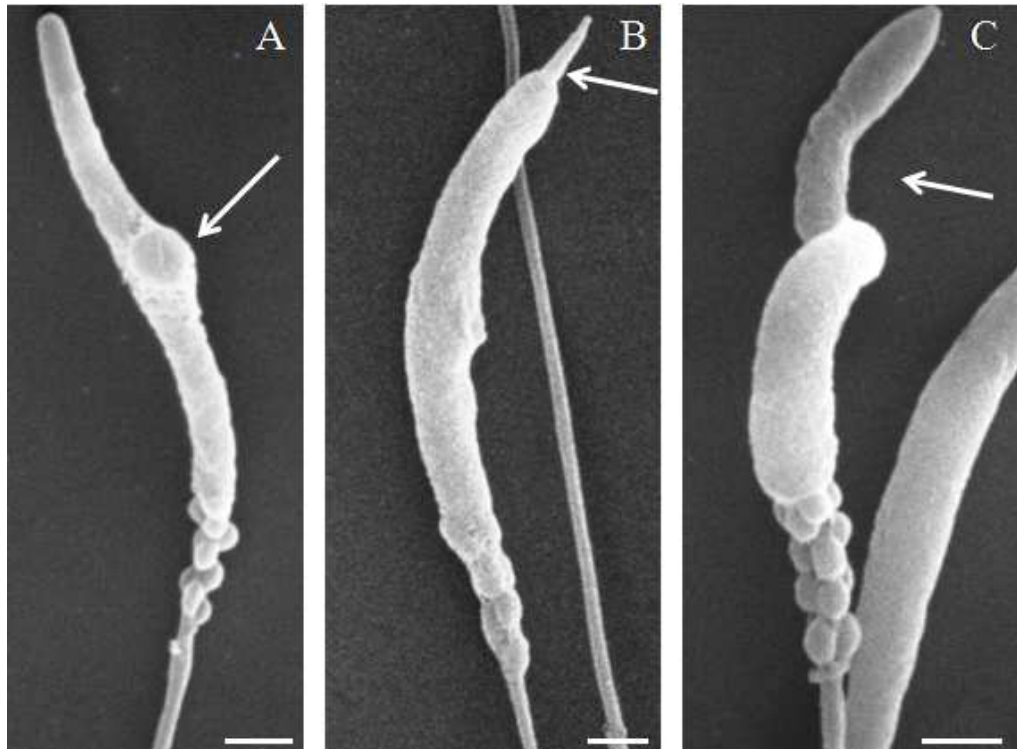


Figura 45: Immagini al SEM di spermatozoi freschi di astore e fagiano in cui sono state osservate anomalie multiple. A: immagine del pezzo intermedio della coda in cui la mancanza del plasmalemma è associata ad anomalie della testa (barra=1 μ m). B-C: immagini del pezzo intermedio della coda in cui la mancanza del plasmalemma è associata ad anomalie dell'acrosoma (barra=1 μ m).

3.5 Scongellamento e valutazione pre e post-scongellamento degli spermatozoi

3.5.1 Astore

L'efficacia dei protocolli di crioconservazione utilizzati per l'astore è stata valutata analizzando i risultati ottenuti sia dopo la sola aggiunta del crioprotettore e del diluente, sia dopo l'intero processo di crioconservazione.

Nelle tabelle 30-38 vengono riportati in dettaglio i risultati ottenuti per ogni campione di eiaculato sottoposto a crioconservazione nelle seguenti fasi del processo:

- 1) nei campioni di eiaculato fresco;
- 2) nei campioni di eiaculato dopo l'aggiunta del crioprotettore e del diluente;
- 3) nei campioni di eiaculato dopo l'intero processo di crioconservazione

Quando i campioni di eiaculato sono stati crioconservati con il protocollo I e III all'analisi alla Camera di Makler gli spermatozoi già dopo l'aggiunta del diluente e del crioprotettore hanno mostrato una motilità relativamente bassa, mentre sono risultati completamente immobili dopo l'intero processo di crioconservazione. La colorazione eosina-nigrosina ha fornito la spiegazione a quanto osservato alla Camera di Makler, infatti nei campioni congelati/scongelati con questi protocolli la maggior parte degli spermatozoi sono risultati morti già dopo la prima fase del processo di crioconservazione (aggiunta del diluente e del crioprotettore).

Analizzando in dettaglio al SEM quanto accade dopo l'aggiunta delle criosoluzioni, utilizzando il DMA puro come crioprotettore (protocollo I), gli spermatozoi si presentano rivestiti da denso materiale fibroso che li avvolge completamente, intrappolandoli. Dopo il congelamento e scongelamento questa matrice è ancora visibile ed abbondante e non è stato possibile fare valutazioni sulla citomorfologia degli spermatozoi per capire se e in che misura le anomalie potessero essere eventualmente aumentate dopo il trattamento (Figure 53 A-B).

Nei campioni ai quali è stata aggiunta la criosoluzione contenente glicerolo (protocollo III) non è stato riscontrato il materiale fibroso descritto in precedenza, mentre sono stati evidenziati spermatozoi con danni molto gravi, la cui complessità aumenta rispetto al fresco ed è già molto elevata dopo la sola aggiunta della criosoluzione. Nei campioni esaminati, nella quasi totalità delle cellule danneggiate è la membrana plasmatica ad essere principalmente compromessa, che può sia presentare rotture (Figura 53 D-F) sia essere assente. Alcuni spermatozoi mancano della testa ed è presente solo il pezzo intermedio e il

pezzo principale della coda e la membrana plasmatica è anche in questo caso assente (Figura 53 D). In alcuni casi il pezzo principale della coda presenta delle rotture e lo spermatozoo risulta più corto (Figura 53 E-F).

Nei campioni di eiaculato crioconservati con il II protocollo, invece, si sono riscontrati risultati completamente differenti infatti dall'analisi della vitalità tramite colorazione eosina-nigrosina è risultato che dopo l'aggiunta del diluente e del crioprotettore la percentuale di spermatozoi vitali è compresa tra 25,5% e 83% nei tre maschi A,B,C, mentre dopo l'intero processo di crioconservazione risulta racchiusa in un range che va dal 14,5% al 59%. Per quanto riguarda la percentuale degli spermatozoi normali dopo il processo di crioconservazione si è osservato un notevole decremento. Infatti nei campioni di eiaculati freschi è risultata compresa tra 77% e 94%, in quelli scongelati invece tra 17,5% e 29,5%.

La percentuale di spermatozoi motili, valutata al microscopio ottico con la Camera di Makler, dopo la prima fase del processo di crioconservazione è risultata compresa tra il 16,5% e il 42,63%; dopo l'intero processo di criocongelamento invece tra il 2,55% e il 12,5%. Le percentuali più basse sono state rilevate nel maschio A (il più anziano) sui campioni congelati ad inizio stagione riproduttiva (marzo), mentre quelle più alte nel maschio C (il più giovane) congelati a metà stagione riproduttiva (aprile).

Per ottenere una conferma di questi risultati positivi ottenuti per i parametri sopra descritti negli stessi campioni abbiamo effettuato anche i seguenti test:

- a) test di Accudenz per valutare la mobilità degli spermatozoi
- b) saggio di interazione sperma – strato perivitellino

Anche i risultati di questi test vengono riportati nel dettaglio nelle tabelle 30-38 dalle quali si evince che dopo l'intero processo di crioconservazione gli spermatozoi dei tre esemplari analizzati con il metodo Accudenz hanno mostrato tutti una OD molto bassa che sta ad indicare una bassa mobilità degli spermatozoi, ed una scarsa capacità di penetrare lo strato perivitellino. Questi valori sono dovuti alla bassa percentuale di spermatozoi vitali dopo l'intero processo di crioconservazione, e alla loro scarsa capacità di movimento come evidenziato alla camera di Makler.

Quindi analizzando tutti questi risultati possiamo affermare che il II° protocollo, che prevede l'utilizzo del prefreezing lake come diluente e il DMA 6% come crioprotettore, è quello che fornisce risultati migliori nella crioconservazione degli spermatozoi di astore.

Esaminando nel dettaglio i risultati ottenuti con tale protocollo, emerge che gli spermatozoi del maschio C sono quelli che, durante l'intera stagione riproduttiva, hanno la maggiore capacità di resistenza al processo di congelamento e scongelamento, mentre aprile è il mese in cui i campioni dei tre esemplari oggetto del nostro studio hanno mostrato la migliore resistenza alla crioconservazione.

3.5.2 Fagiano

Come descritto nel paragrafo 2.5 i campioni di eiaculato di fagiano sono stati crioconservati utilizzando il pre-freezing lake come diluente e il DMA 6% come crioprotettore. In totale, durante la stagione riproduttiva, sono state effettuate 10 prove di crioconservazione dei gameti maschili di fagiano. In tutti i campioni di spermatozoi scongelati sono stati esaminati i seguenti parametri:

- a) vitalità degli spermatozoi con colorazione eosina nigrosina
- b) percentuale di spermatozoi con morfologia normale
- c) mobilità con il metodo Accudenz
- d) analisi qualitativa delle anomalie ultrastrutturali presenti nei campioni di spermatozoi
- e) valutazione della fertilità degli spermatozoi crioconservati attraverso l'inseminazione artificiale

I risultati ottenuti nei primi tre test (a-b-c) sono stati messi a confronto con quelli ottenuti per gli stessi parametri negli eiaculati freschi e come si evince nella tabella 39, dove vengono riportati nel dettaglio i risultati per ciascun campione, il processo di crioconservazione ha causato una notevole perdita di qualità degli spermatozoi.

Infatti la percentuale di spermatozoi vitali è compresa in un *range* che va dal 10,9% al 48%, mentre negli eiaculati freschi variava dal 79,5% al 93,8% ed anche la percentuale di spermatozoi vitali con morfologia normale ha subito un notevole decremento dopo il processo di crioconservazione ed è compresa in un range che va dal 7,2% al 26,5%, mentre nel fresco variava dal 54,6% al 83,2%. Anche le OD osservate nei campioni crioconservati sono notevolmente più basse rispetto a quelle osservate nei campioni di eiaculato freschi e

ciò sta ad indicare una perdita di mobilità degli spermatozoi dopo il processo di crioconservazione.

A livello ultrastrutturale gli spermatozoi di fagiano scongelati hanno mostrato numerose anomalie. Similmente a quanto effettuato negli eiaculati freschi tali alterazioni sono state classificate in base alla loro localizzazione in:

- a) anomalie della testa;
- b) anomalie della coda

- a) anomalie della testa: l'anomalia di questa regione del gamete maschile di fagiano maggiormente riscontrata è stata il rigonfiamento della zona basale della testa che spesso è associata con la rottura della membrana plasmatica (Figura 54 A-B). Quest'ultima anomalia è stata osservata anche nella regione acrosomiale (Figura 54 C) e a livello nucleare (Figura 54 D).
- b) anomalie della coda: a livello della coda le anomalie riscontrate maggiormente sono localizzate a livello del pezzo intermedio che ha mostrato: danni irreversibili del manicotto dei mitocondri, che nei casi più gravi risulta completamente danneggiato (Figura 54 E) e mitocondri rigonfi (Figura 54 F-G). Anche nel pezzo intermedio e in quello principale della coda, come precedentemente osservato nella testa, la membrana plasmatica presenta spesso delle rotture (Figura 54 H-I).

L'inseminazione artificiale, è stata praticata in 5 femmine di fagiano diverse, con le metodiche riportate nel paragrafo 2.3. I pellets di spermatozoi crioconservati utilizzati sono stati combinati in modo da apportare concentrazioni di spermatozoi vivi normali diverse. Come si evince dai dati riportati in tabella 40 i risultati migliori in termini di fertilità si sono ottenuti quando per l'inseminazione artificiale sono stati utilizzati pellets a concentrazioni maggiori (110×10^6 e 65×10^6 sperm x ml). In termini di uova schiuse, invece, contrariamente a quanto ci si sarebbe potuto aspettare, visti anche i risultati sulla fertilità, i risultati migliori si sono avuti quando sono stati utilizzati i pellets di spermatozoi crioconservati a concentrazione minore (45×10^6 sperm x ml).

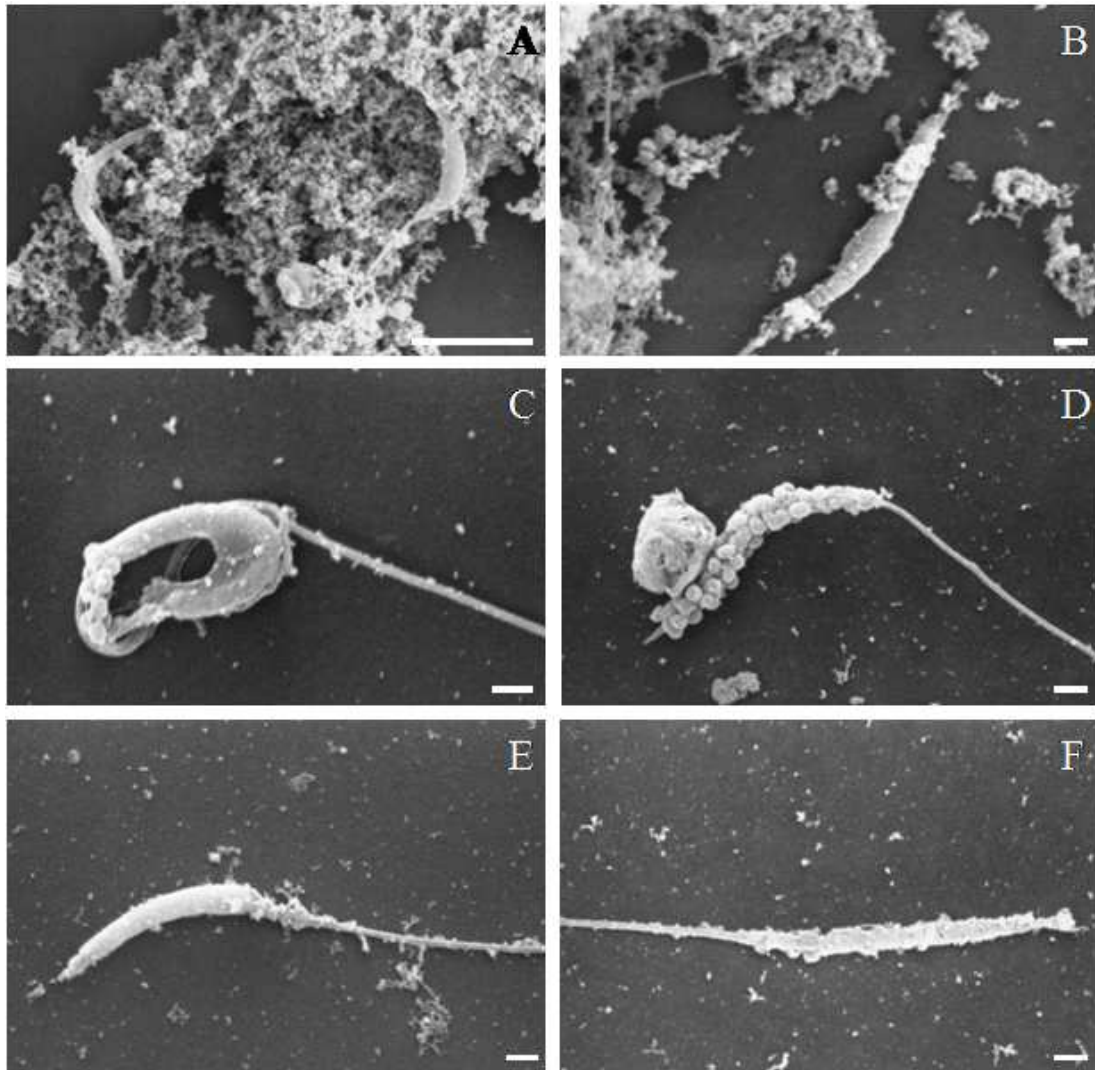


Figura 46: Immagini al SEM di spermatozoi di astore crioconservati con DMA in rapporto 1:1 rispetto al volume iniziale e con glicerolo. A-B: spermatozoi crioconservati con DMA completamente avvolti dalla matrice fibrosa (barra A=5 μm ; barra B=1 μm). C-D: spermatozoi crioconservati con glicerolo in cui sono osservabili anomalie complesse non riscontrate negli eiaculati freschi (barra=1 μm). E-F: spermatozoi crioconservati con glicerolo che presentano numerose rotture a livello della membrana plasmatica e della coda (barra=1 μm).

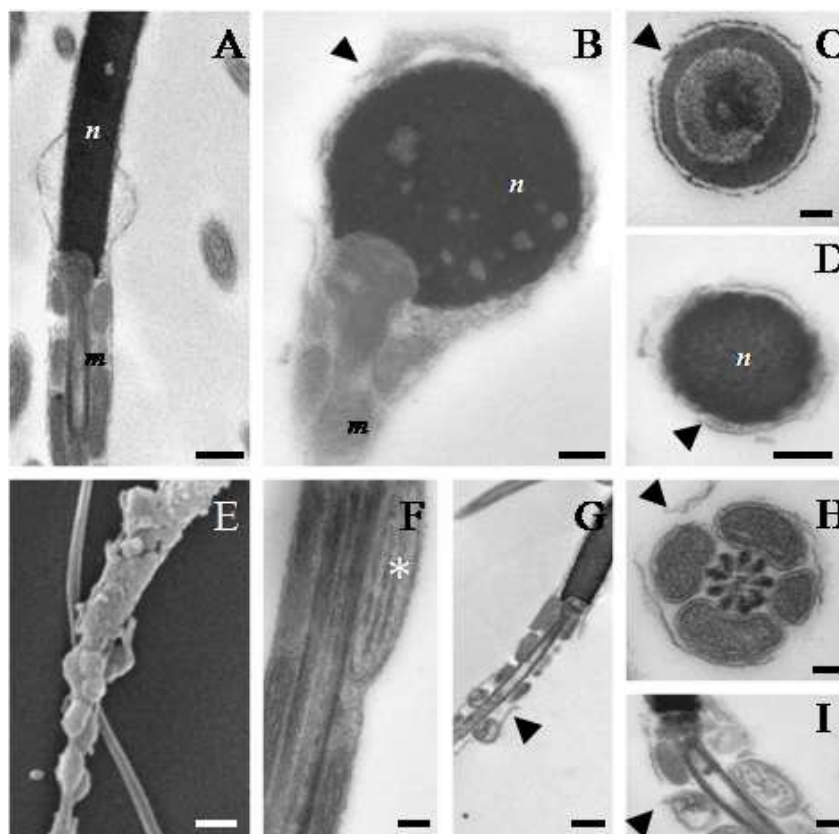


Figura 47: Immagini al SEM e al TEM di spermatozoi di fagiano crioconservati con DMA al 6% rispetto al volume iniziale. A-B: immagini longitudinali al TEM dello spermatozoo crioconservato che presenta dei rigonfiamenti alla base della testa e delle rotture della membrana plasmatica (*testa di freccia*) (barra A= 500 nm; barra B= 250 nm). C: sezione trasversale al TEM della regione acrosomiale dello spermatozoo che presenta rotture della membrana plasmatica (*testa di freccia*) (barra= 100 nm). D: sezione trasversale al TEM del nucleo dello spermatozoo che presenta rotture della membrana plasmatica (*testa di freccia*) (barra= 250 nm). E: immagine al SEM dove lo spermatozoo presenta danni irreversibili a livello del pezzo intermedio (barra= 1 μ m). F: sezione longitudinale al TEM del pezzo intermedio della coda in cui è possibile osservare dei mitocondri rigonfi (*asterisco*) (barra= 125 nm). G: sezione longitudinale al TEM della coda dello spermatozoo in cui è possibile osservare delle rotture della membrana plasmatica a livello del pezzo intermedio (*testa di freccia*) (barra= 1 μ m). H: sezione trasversale al TEM dello spermatozoo in cui è possibile osservare delle rotture della membrana plasmatica a livello del pezzo intermedio (*testa di freccia*) (barra= 100 nm). H: sezione longitudinale al TEM dello spermatozoo in cui è possibile osservare delle rotture della membrana plasmatica a livello del pezzo intermedio della coda (*testa di freccia*) (barra= 250 nm).

	CAMPIONI DI EIACULATI FRESCHI						RISULTATI DOPO AGGIUNTA DILUENTE E CRIOPROTETTORE		RISULTATI DOPO CRIOCONSERVAZIONE				
Campione	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz Assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	Sperm. vitali	Sperm. motili	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz Assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina
A1_1)	109 x 10 ³	77%	84%	65%	0,0293	13	1,5%	2%	0	0	0	0	0
A1_2)							27,5%	27,5%	15%	21,5%	4,5%	0,003	1
A1_3)							1%	1%	0	0	0	0	0
A2_1)	155 x 10 ³	64%	85%	63%	0,0296	8	1%	1%	0	0	0	0	0
A2_2)							27%	27%	14,5%	22%	4%	0,004	5
A2_3)							1,5%	0,5%	0	0	0	0	0
A3_1)	213 x 10 ³	87%	80	69%	0,0298	7	4%	4%	0	0	0	0	0
A3_2)							29%	28%	17%	20,5%	3,5%	0,003	3
A3_3)							1%	2%	0	0	0	0	0
A4_1)	253 x 10 ³	74%	79%	60	0,0299	16	2%	1,8%	0	0	0	0	0
A4_2)							28,5%	26,5%	15,5%	20	3,9%	0,005	2
A4_3)							1,5%	1%	0	0	0	0	0
A5_1)	163 x 10 ³	71%	77%	40	0,0300	15	1,5%	1,2%	0	0	0	0	0
A5_2)							25,5%	25%	14,5%	18,5%	3,7%	0,004	1
A5_3)							2%	1%	0		0	0	0

Tabella 30: risultati esperimenti di crioconservazione nel maschio A di astore nel mese di marzo

	CAMPIONI DI EIACULATI FRESCHI						RISULTATI DOPO AGGIUNTA DILUENTE E CRIOPROTETTORE			RISULTATI DOPO CRIOCONSERVAZIONE				
Campione	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	Sperm. vitali	Sperm. motili	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	
A6_1)	429 x 103	78%	87%	77%	0,1013	20	4,50	2,5%	0	0	0	0	0	
A6_2)							68,50	36%	48,5%	22,5%	7,96%	0,0227	6	
A6_3)							2%	1,5%	0	0	0	0	0	
A7_1)	482 x 10 ³	93%	82%	73%	0,1039	12	2,50	1,2%	0	0	0	0	0	
A7_2)							61,50	35%	51,5%	22%	7,77%	0,0192	4	
A7_3)							1%	1%	0	0	0	0	0	
A8_1)	301 x 10 ³	86%	84%	75%	0,1065	16	3%	2,5%	0	0	0	0	0	
A8_2)							65%	36,5%	49%	24%	8,06%	0,0229	2	
A8_3)							2%	2%	0	0	0	0	0	
A9_1)	315 x 10 ³	83%	80	84%	0,1079	14	5,50	2,5%	0	0	0	0	0	
A9_2)							60	42%	44,5%	24,5%	7,29%	0,0252	3	
A9_3)							2,50	2%	0	0	0	0	0	
A10_1)	374 x 10 ³	80	83%	83%	0,1083	13	6%	1,5%	0	0	0	0	0	
A10_2)							61%	42,5%	45,5%	23,5%	7,58%	0,0210	2	
A10_3)							3%	1%	0	0	0	0	0	
A11_1)	393 x 10 ³	85%	85%	81%	0,1054	9	4%	2%	0	0	0	0	0	
A11_2)							62%	43%	30,5%	21%	8,5%	0,0215	5	
A11_3)							1,50	2,5%	0	0	0	0	0	

Tabella 31:risultati esperimenti di crioconservazione nel maschio A di astore nel mese di aprile

	CAMPIONI DI EIACULATI FRESCHI						RISULTATI DOPO AGGIUNTA DILUENTE E CRIOPROTETTORE		RISULTATI DOPO CRIOCONSERVAZIONE				
Campione	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	Sperm. vitali	Sperm. motili	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina
A 12_1)	266 x 10 ³	87%	84%	84%	0,0393	13	2,5%	2%	0	0	0	0	0
A 12_2)							65,5%	16,5%	47%	17,5%	2,55%	0,0024	1
A 12_3)							2%	2,5%	0	0	0	0	0
A 13_1)	221 x 10 ³	76%	81,5%	77%	0,0406	17	1%	1,5%	0	0	0	0	0
A 13_2)							60,5%	17%	40	19%	2,98%	0,0033	2
A 13_3)							2,5%	1%	0	0	0	0	0
A 14_1)	250 x 10 ³	80	80	72%	0,0410	12	2%	2,5%	0	0	0	0	0
A 14_2)							64,3%	18%	45,5%	20	2,91%	0,0021	2
A 14_3)							1%	1,5%	0	0	0	0	0

Tabella 32: risultati esperimenti di crioconservazione nel maschio A di astore nel mese di maggio

	CAMPIONI DI EIACULATI FRESCHI						RISULTATI DOPO AGGIUNTA DILUENTE E CRIOPROTETTORE		RISULTATI DOPO CRIOCONSERVAZIONE				
Campione	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	Sperm. vitali	Sperm. motili	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina
B 1_1)	295 x 10 ³	80 %	85,5%	75%	0,1393	15	2%	1%	0	0	0	0	0
B 1_2)							55,5 %	37,5 %	40,55 %	22,50	7,5 %	0,0248	3
B 1_3)							1%	2%	0	0	0	0	0
B 2_1)	316 x 10 ³	93 %	84%	73%	0,1419	12	3%	2,5%	0	0	0	0	0
B 2_2)							59%	36,5 %	53,50 %	19,50 %	7,3 %	0,0265	5
B 2_3)							1,5%	1,5%	0	0	0	0	0
B 3_1)	314 x 10 ³	85,5 %	86,5%	61%	0,1435	17	1,5%	2 %	0	0	0	0	0
B 3_2)							58%	30,5%	52,50 %	23%	6,1%	0,0267	5
B 3_3)							2%	2,5%	0	0	0	0	0
B 4_1)	310 x 10 ³	86 %	83%	71%	0,1446	18	2,5%	2,5%	0	0	0	0	0
B 4_2)							58,5 %	36 %	41,50 %	21%	7,1%	0,0276	4
B 4_3)							1%	1,5%	0	0	0	0	0
B 5_1)	298 x 10 ³	83 %	86%	55%	0,1456	13	2,5%	1%	0	0	0	0	0
B 5_2)							56 %	27 %	41%	24%	5,5 %	0,0242	3
B 5_3)							1,5%	2%	0	0	0	0	0
B 6_1)	303 x 10 ³	84,5 %	85%	63%	0,1450	9	1%	1,5%	0	0	0	0	0
B 6_2)							57,5 %	32%	53%	20,5%	6,3%	0,0284	2
B 6_3)							2,5%	2%	0	0	0	0	0

Tabella 33: risultati esperimenti di crioconservazione nel maschio B di astore nel mese di marzo

	CAMPIONI DI EIACULATI FRESCHI						RISULTATI DOPO AGGIUNTA DILUENTE E CRIOPROTETTORE			RISULTATI DOPO CRIOCONSERVAZIONE				
Campione	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	Sperm. vitali	Sperm. motili	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	
B 7_1)	648 x 10 ³	88%	85%	86%	0,2159	16	1%	5%	0	0	0	0	0	
B 7_2)							65,5%	43,8%	46%	24,5%	13,06%	0,0455	7	
B 7_3)							1,5%	2,5%	0	0	0	0	0	
B 8_1)	512 x 10 ³	84%	87%	76%	0,2204	17	3,5%	1,5%	0	0	0	0	0	
B 8_2)							63%	38,7%	40%	26%	12,01%	0,0470	5	
B 8_3)							2,5%	2,5%	0	0	0	0	0	
B 9_1)	576 x 10 ³	86%	86%	82%	0,2220	18	2,5%	2,5%	0	0	0	0	0	
B 9_2)							72%	41,8%	42%	24%	12,9%	0,0430	4	
B 9_3)							1,5%	1,5%	0	0	0	0	0	
B 10_1)	602 x 10 ³	90	88%	81%	0,2187	14	2%	3%	0	0	0	0	0	
B 10_2)							60%	41,3%	41%	27,5%	12,8%	0,0495	5	
B 10_3)							1,5%	2%	0	0	0	0	0	
B 11_1)	557 x 10 ³	91%	87,5%	83%	0,2216	13	1,5%	3,5%	0	0	0	0	0	
B 11_2)							67%	42,3%	40%	23%	10,7%	0,0520	7	
B 11_3)							1%	2%	0	0	0	0	0	
B 12_1)	591 x 10 ³	89,5%	84,5%	80	0,2300	12	2%	2,5%	0	0	0	0	0	
B 12_2)							71,5%	40,8%	44%	25%	12,6%	0,0485	3	
B 12_3)							2,5%	3,5%	0	0	0	0	0	

Tabella 34: risultati esperimenti di crioconservazione nel maschio B di astore nel mese di aprile

	CAMPIONI DI EIACULATI FRESCHI						RISULTATI DOPO AGGIUNTA DILUENTE E CRIOPROTETTORE			RISULTATI DOPO CRIOCONSERVAZIONE				
Campione	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	Sperm. vitali	Sperm. motili	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	
B 13_1)	234 x 10 ³	91%	83,5%	82%	0,1619	9	5%	3%	0	0	0	0	0	
B 13_2)							64,5%	32,8%	42%	18,5%	6,5%	0,0153	2	
B 13_3)							2,5%	2%	0	0	0	0	0	
B 14_1)	300 x 10 ³	80%	86%	77%	0,1622	10	2,5%	1%	0	0	0	0	0	
B 14_2)							68%	30,8%	49%	20%	6,1%	0,0150	3	
B 14_3)							2%	1,5%	0	0	0	0	0	
B 15_1)	274 x 10 ³	90%	87,5%	79%	0,1595	14	4,5%	2%	0	0	0	0	0	
B 15_2)							62%	31,6%	52%	22%	6,32%	0,0160	1	
B 15_3)							3%	2,5%	0	0	0	0	0	
B 16_1)	290 x 10 ³	78%	84%	80	0,1515	15	1%	2,5%	0	0	0	0	0	
B 16_2)							67,5%	32%	48%	21,5%	6,4%	0,0153	3	
B 16_3)							1,5%	1,5%	0	0	0	0	0	

Tabella 35: risultati esperimenti di crioconservazione nel maschio B di astore nel mese di maggio

	CAMPIONI DI EIACULATI FRESCHI						RISULTATI DOPO AGGIUNTA DILUENTE E CRIOPROT.		RISULTATI DOPO CRIOCONSERVAZIONE				
Campione	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	Sperm. vitali	Sperm. motili	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi riusciti a penetrare la membrana perivitellina
C 1_1)	455 x 10 ³	85%	86%	81%	0,3240	12	2%	2,5 %	0	0	0	0	0
C 1_2)							74,5 %	35,64 %	41 %	23,50	8,91 %	0,0736	2
C 1_3)							1,5%	2%	0	0	0	0	0
C 2_1)	432 x 10 ³	84,5%	87%	75%	0,3249	11	1,5%	1,5 %	0	0	0	0	0
C 2_2)							63,5 %	33 %	41,5 %	20	8,25 %	0,0741	3
C 2_3)							2%	1 %	0	0	0	0	0
C 3_1)	489 x 10 ³	82%	88,5%	77%	0,3296	14	1%	1 %	0	0	0	0	0
C 3_2)							62 %	33,88 %	40		8,47 %	0,0722	5
C 3_3)							1,5%	2 %	0	0	0	0	0
C 4_1)	468 x 10 ³	87,5%	83%	88%	0,3279	20	2,5%	3,5 %	0	0	0	0	0
C 4_2)							66,5 %	38,72 %	46,5	22 %	9,68 %	0,0681	4
C 4_3)							2%	2,5 %	0	0	0	0	0
C 5_1)	455 x 10 ³	88,5 %	82%	92%	0,3259	18	3%	5 %	0	0	0	0	0
C 5_2)							68 %	40,48 %	44	25 %	10,12 %	0,0801	8
C 5_3)							2,5%	4%	0	0	0	0	0
C 6_1)	461 x 10 ³	90	80,5%	78%	0,3264	19	3,5%	2 %	0	0	0	0	0
C 6_2)							70	34,32 %	45,5	21,50	8,58 %	0,0756	6
C 6_3)							3%	1,5 %	0	0	0	0	0

Tabella 36: risultati esperimenti di crioconservazione nel maschio C di astore nel mese di marzo

	CAMPIONI DI EIACULATI FRESCHI						RISULTATI DOPO AGGIUNTA DILUENTE E CRIOPROT.		RISULTATI DOPO CRIOCONSERVAZIONE				
Campione	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Spermatozoi riusciti a penetrare membrana perivitellina	Sperm. vitali	Sperm. motili	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Spermatozoi riusciti a penetrare membrana perivitellina
C 7_1)	989 x 10 ³	93 %	90	89 %	0,3604	21	5,5%	5,5%	0	0	0	0	0
C 7_2)							74,5%	43,6%	51,5%	26,5%	10,9%	0,0996	10
C 7_3)							4,5%	4%	0	0	0	0	0
C 8_1)	997 x 10 ³	90 %	93%	87 %	0,3581	20	4%	3,5%	0	0	0	0	0
C 8_2)							71,5%	42,6%	56%	28%	10,6%	0,0995	8
C 8_3)							3,5%	3,5%	0	0	0	0	0
C 9_1)	1.608 x 10 ³	94 %	94%	88 %	0,3520	14	6%	4,5%	0	0	0	0	0
C 9_2)							76%	43,1%	52%	26%	10,7%	0,0969	4
C 9_3)							4%	5,5%	0	0	0	0	0
C 10_1)	955 x 10 ³	92 %	92,5%	86 %	0,3487	16	5%	3%	0	0	0	0	0
C 10_2)							82%	42,1%	54,5%	29,5%	10,5%	0,0963	6
C 10_3)							3,5%	2%	0	0	0	0	0
C 11_1)	1282 x 10 ³	92,5 %	89%	90 %	0,3564	16	5,5%	6%	0	0	0	0	0
C 11_2)							83%	44,1%	53%	25%	11%	0,0989	7
C 11_3)							4%	4,5%	0	0	0	0	0
C 12_1)	939 x 10 ³	95 %	90%	87,5 %	0,3488	19	6,5%	3,5%	0	0	0	0	0
C 12_2)							77,5%	42,8%	57,5%	27%	12,5%	0,0966	3
C 12_3)							4,5%	3%	0	0	0	0	0
C 13_1)	1047 x 10 ³	91%	87,5%	89%	0,3508	12	3,5%	2,5%	0	0	0	0	0
C 13_2)							79%	43%	59%	24%	10,7%	0,0978	9
C 13_3)							2%	3%	0	0	0	0	0

Tabella 37: risultati esperimenti di crioconservazione nel maschio C di astore nel mese di aprile

	CAMPIONI DI EIACULATI FRESCI						RISULTATI DOPO AGGIUNTA DILUENTE E CRIOPROTETTORE		RISULTATI DOPO CRIOCONSERVAZIONE				
Campione	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina	Sperm. Vitali	Sperm. motili	Sperm. vitali	Sperm. morf. normali	Sperm. motili	Metodo Accudenz assorbanza (550 nm)	Numero di spermatozoi che sono riusciti a penetrare la membrana perivitellina
C 14_1)	166 x 10 ³	87%	82,5%	85%	0,3165	18	2,5%	2%	0	0	0	0	0
C 14_2)							65,5%	41,6%	41%	19,5%	10,4%	0,0637	3
C 14_3)							2%	1%	0	0	0	0	0
C 15_1)	321 x 10 ³	90	84%	80	0,3137	14	4%	1,5%	0	0	0	0	0
C 15_2)							68,5%	39,2%	35,5%	21%	9,8%	0,0707	2
C 15_3)							1,5%	2%	0	0	0	0	0
C 16_1)	369 x 10 ³	89%	87%	83%	0,3223	12	3%	2,5%	0	0	0	0	0
C 16_2)							62%	40,6%	48%	22,5%	10,1%	0,0647	4
C 16_3)							1%	2,5%	0	0	0	0	0

Tabella 38: risultati esperimenti di crioconservazione nel maschio C di astore nel mese di maggio

	Risultati ottenuti negli eiaculati freschi					Risultati ottenuti negli eiaculati crioconservati		
Campione n°	Volume totale raccolto in µl	Concentrazione (sperm x ml)	Sperm. vitali	Metodo Accudenz Assorbanza (550nm)	Sperm. morfologia normale	Sperm. vitali	Sperm. morfologia normale	Metodo Accudenz Assorbanza (550nm)
1	129,7	8,15 x 10 ⁹	86,9%	0,298	54,6%	31,3%	17,8%	0,06
2	134,3	8,40 x 10 ⁹	89,0	0,193	62,3%	20,8%	15,1%	0,04
3	141,3	8,75 x 10 ⁹	80,8%	0,361	62,9%	37,1%	19,6%	0,07
4	124,5	10,50 x 10 ⁹	91,5%	0,263	68,7%	21,3%	10,4%	0,05
5	99,3	8,60 x 10 ⁹	79,5%	0,284	72,5%	10,9%	6,1%	0,03
6	131,5	9,25 x 10 ⁹	93,8%	0,272	83,2%	11,4%	7,2%	0,03
7	126,3	8,80 x 10 ⁹	91,5%	0,298	82,2%	19,1%	9,1%	0,04
8	123,4	9,15 x 10 ⁹	90,2%	0,273	83,1%	16,3%	9,4%	0,03
9	89,1	8,60 x 10 ⁹	85,2%	0,299	80,5%	35,1%	8,4%	0,05
10	99,0	10,60 x 10 ⁹	87,6%	0,246	81,5%	48,0	26,5%	0,06

Tabella 39: dettaglio dei risultati ottenuti negli esperimenti di crioconservazione degli spermatozoi di fagiano

Gruppo 1 Concentrazione 45 x 10⁶ sperm x ml					Gruppo 2 Concentrazione 65 x 10⁶ sperm x ml					Gruppo 3 Concentrazione 110 x 10⁶ sperm x ml				
Uova incubate	Uova fertili	Uova schiuse	fertilità %	schiusa %	Uova incubate	Uova fertili	Uova schiuse	fertilità %	schiusa %	Uova incubate	Uova fertili	Uova schiuse	fertilità %	schiusa %
18	4	3	22,2	75,0	15	5	3	33,3	60,0	18	9	2	50,0	22,2
12	5	0	41,7	0,0	12	7	5	58,3	83,3	13	7	4	53,8	57,1
17	1	1	5,9	100,0	13	3	2	23,1	66,7	16	4	2	25,0	50,0
10	1	1	10,0	100,0	13	7	4	53,8	57,1	14	7	2	50,0	28,6
20	4	3	20,0	75,0	20	2	1	10,0	50,0	20	3	1	15,0	33,3

Tabella 40: dettaglio dei risultati ottenuti nelle prove di inseminazione artificiale del fagiano

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il fine ultimo di questa tesi è stato quello di caratterizzare morfologicamente e ultrastrutturalmente e di mettere a punto dei protocolli di crioconservazione degli spermatozoi di due specie di uccelli, l'astore (*Accipiter gentilis*), specie selvatica raramente allevata in cattività, e il fagiano (*Phasianus colchicus mongolicus*), specie che viene allevata massivamente con successo già da diversi anni. In particolare, la prima parte di questo lavoro è stata dedicata alla caratterizzazione morfologica ed ultrastrutturale degli spermatozoi delle due specie al microscopio elettronico a scansione e trasmissione, mai eseguita finora. Infatti gran parte delle analisi riportate in letteratura si sono avvalse dell'aiuto della microscopia ottica. Il valore e l'importanza dell'utilizzo della microscopia elettronica nel descrivere la morfologia e l'ultrastruttura degli spermatozoi sono stati riconosciuti da diversi autori (Du Plessis *et al.*, 2011, 2014). Con questo approccio è possibile ottenere informazioni dettagliate sull'ultrastruttura dei gameti maschili, estremamente utili quando si applicano tecniche di inseminazione artificiale e di crioconservazione vista la relazione inscindibile tra "struttura dello spermatozoo-efficacia del protocollo di crioconservazione".

Considerando la tipologia strutturale degli spermatozoi degli uccelli, come illustrato nel paragrafo 1.1.3, è stata proposta (ed è attualmente utilizzata) una suddivisione tra struttura "non-passeriforme" e "passeriforme" (Asa *et al.*, 1987; Jamieson, 2007).

In base a quanto osservato nel presente studio, gli spermatozoi di astore e di fagiano possono essere classificati come appartenenti ai "non-passeriformi". Gli elementi che hanno condotto a questa conclusione sono di vario tipo. Innanzitutto con le analisi al SEM e al TEM è stato possibile riconoscere negli spermatozoi di astore e di fagiano due regioni principali: la testa (che, come descritto nel paragrafo 1.1.3, appare come una struttura cilindrica e nella quale sono chiaramente distinguibili l'acrosoma e il nucleo) e la coda (che può essere suddivisa in pezzo intermedio, pezzo principale e pezzo terminale). Questa conformazione, come illustrato da Jamieson (2007) e da Du Plessis *et al.* (2014), è tipica degli spermatozoi "non-passeriformi". Nei "passeriformi"

invece la testa ha una caratteristica forma spiralata e nella coda non è possibile distinguere le diverse regioni morfologiche osservate nei “non-passeriformi”.

Altro elemento tipico dei gameti maschili classificati in questa categoria, è la forma dell'acrosoma, che appare come una struttura conica posizionata nella regione anteriore della testa (Du Plessis *et al.*, 2014). Lo spazio subacrosomiale, ben riconoscibile al di sotto della vescicola acrosomiale, sia nello spermatozoo di astore che di fagiano risulta abbastanza ampio come nella maggior parte dei “non-passeriformi” (Du Plessis *et al.*, 2014), quali ad esempio il pollo (Lake *et al.*, 1968; Bakst *et al.*, 1975), l'oca (Ferdinand, 1992), il tacchino (Thurston *et al.*, 1987), e l'anatra (Maretta, 1975). Negli spermatozoi di emu, di altri ratiti e del tinamou invece tale spazio è molto limitato a causa della penetrazione del rostro nucleare all'interno della vescicola acrosomiale (Du Plessis *et al.*, 2014). Una situazione simile è evidente anche nelle specie appartenenti all'ordine dei Columbiformi (Jamieson, 2007). Negli spermatozoi di astore e fagiano, come nella maggior parte dei “non-passeriformi”, è presente il *perforatorium*, che entra in parte all'interno in un canale endonucleare nella regione anteriore del nucleo (Samour *et al.*, 1986, Saita *et al.*, 1983, Jamieson, 2007, Lake *et al.*, 1968; Nagano, 1962; Humpreys, 1972; Baccetti *et al.*, 1980; Thurston *et al.*, 1982). La lunghezza di questa struttura varia nelle diverse specie di uccelli (Du Plessis *et al.*, 2014). Nell'astore e nel fagiano il *perforatorium* ha una lunghezza che è circa la metà di quella della vescicola acrosomiale. Nel parrocchetto (Samour *et al.*, 1986) e nei pappagalli invece (Jamieson, 2007) è estremamente allungato e si estende per quasi l'intera lunghezza dello spazio subacrosomiale. Nel tacchino (Thurston *et al.*, 1987), nell'anatra (Maretta, 1975) e nella gru dal collo bianco (Phillips *et al.*, 1987) tale struttura è localizzata esclusivamente nella regione posteriore dell'acrosoma. Infine tra i “non-passeriformi” ci sono spermatozoi di alcune specie quali l'emu (Du Plessis *et al.*, 2014; Jamieson 2007), il rondone, la tortora zebrata, il piccione con la cresta e il picchio rosso (Jamieson 2007) dove il *perforatorium* è assente. La funzione di tale struttura negli uccelli non è stata ancora definita (Thurston *et al.*, 1987; Baccetti *et al.*, 1980). L'identificazione di filamenti di actina all'interno del *perforatorium* (Baccetti *et al.* 1980; Campanella *et al.*, 1979), ha portato ad ipotizzare che questa struttura abbia un ruolo attivo nella penetrazione dello spermatozoo all'interno dell'uovo, come avviene in altre specie, ma questa funzione negli uccelli non è stata ancora dimostrata (Du Plessis *et al.*, 2014). Secondo Thurston *et al.* (1987) e Jamieson *et al.* (2006) le

specie che presentano il *perforatorium* sono filogeneticamente primitive rispetto a quelle che non ce l'hanno.

Come nelle altre specie appartenenti ai “non-passeriformi” la zona di transizione tra la testa e la coda dello spermatozoo è rappresentata dal collo che è caratterizzato dalla presenza di una fossa d’impianto che nell’astore appare concava simmetrica mentre nel fagiano ha una forma concava asimmetrica. Quest’ultima conformazione è tipica anche di altre specie appartenenti alla famiglia dei Fasianidi quali ad esempio il gallo (*Gallus gallus*), la quaglia giapponese (*Coturnix japonica*) e la quaglia blu asiatica (*Coturnix chinensis*) (Jamieson, 2007).

La presenza dell'*annulus*, che suddivide la coda in pezzo intermedio e pezzo principale, è un'altra caratteristica degli spermatozoi “non passeriformi”, non presente nei “passeriformi” (Jamieson, 2007).

Nel pezzo intermedio degli spermatozoi di astore e fagiano, analogamente a quanto riscontrato nella maggior parte dei “non-passeriformi”, sono localizzati i centrioli prossimale e distale. Similmente a quanto osservato nel gallo (Bakst *et al.*, 1975), nell'anatra (Humphreys *et al.*, 1972; Bakst, 1980), nel tacchino (Thurston *et al.*, 1987), nel parrocchetto ondulato (Samour *et al.*, 1986), nell'astore il centriolo distale è limitato alla regione anteriore del pezzo intermedio. Nel fagiano, invece, si estende per quasi l'intera lunghezza del pezzo intermedio come nello struzzo (Baccetti *et al.*, 1991; Soley, 1993), nel nandù (Phillips *et al.*, 1989), nei tinamidi (Asa *et al.*, 1986) e nell'emu (Du Plessis *et al.*, 2014; Baccetti *et al.*, 1991). Una caratteristica degli spermatozoi del fagiano è rappresentata dalla presenza di materiale elettrondenso all'interno della cavità centrale del centriolo distale. Il fatto che lo spermatozoo di fagiano presenti questa peculiarità non rilevata in altre specie di uccellie nei Fasianidi, dimostra l'elevata specie-specificità dell'ultrastruttura del gamete maschile. Il manicotto di mitocondri che circonda il pezzo intermedio della coda mostra nell'astore circa 20-24 mitocondri e nel fagiano circa 20, ed è una caratteristica comune nella maggior parte degli spermatozoi “non-passeriformi”. Anche le nove fibre dense presenti lungo l'assonema nel pezzo intermedio della coda sia di astore sia di fagiano sono una caratteristica tipica dei gameti “non-passeriformi”. Come nel pollo (Lake *et al.*, 1968; Bakst *et al.*, 1975), nell'anatra (Maretta, 1975), nel tacchino (Thurston *et al.*, 1987), nella faraona (Thurston *et al.*, 1982) anche nell'astore e nel fagiano tali fibre sono chiaramente distinguibili, mentre nell'emu (Du Plessis *et al.*, 2014; Baccetti *et al.*,

1991), nello struzzo (Soley, 1993) e nel nandù (Phillips *et al.*, 1989) appaiono come delle strutture rudimentali (Du Plessis *et al.*, 2014).

Ultimo elemento tipico degli spermatozoi “non passeriformi”, presente sia negli spermatozoi di astore sia in quelli di fagiano è la guaina fibrosa che circonda l’assonema nel pezzo principale della coda.

Stando all’albero filogenetico elaborato da Jamieson (2007) (Figura 55) sulla base dei caratteri spermatici, lo spermatozoo del fagiano presenta molte caratteristiche ultrastrutturali riscontrate nei gameti maschili di altre specie appartenenti all’ordine dei galliformi di cui fanno parte tra gli altri il gallo, la quaglia giapponese, il tacchino e la faraona. Ciò è in linea con la classificazione tassonomica attuale (Figura 56).

Per quanto riguarda i rapaci l’unico ordine considerato da Jamieson (2007), è quello dei Falconiformes che vengono riportati dall’autore tra i “Neognatae”.

Visti i nostri risultati possiamo affermare che la morfologia e l’ultrastruttura dello spermatozoo di astore e fagiano non sono caratteri utili per un approccio filogenetico. Infatti, nonostante le numerose similitudini ultrastrutturali osservate tra i loro gameti maschili queste due specie sono filogeneticamente lontane tra loro come si può osservare dall’albero filogenetico riportato in figura 56 basato su studi recenti (Suh *et al.*, 2011).

Un aspetto a cui nella tesi ho dato ampio spazio riguarda la presenza e la caratterizzazione di spermatozoi anomali nel liquido seminale fresco. L’analisi delle anomalie spermatiche riveste una notevole importanza soprattutto in seguito all’applicazione di tecniche di conservazione degli spermatozoi. Come illustrato nel paragrafo 1.1.4 una delle maggiori difficoltà nel descrivere le anomalie presenti negli spermatozoi degli uccelli è la mancanza di una classificazione univoca delle anomalie spermatiche.

Per descrivere gli spermatozoi anomali presenti negli eiaculati freschi di astore e fagiano è stata utilizzata la classificazione proposta da Du Plessis *et al.* (2011) in cui le anomalie sono state suddivise in base alla loro localizzazione in: 1) anomalie della testa e 2) della coda.

L’anomalia maggiormente osservata a livello della testa è il ripiegamento di questa regione dello spermatozoo. Tale tipologia è abbastanza comune tra i “non passeriformi” dove è stata osservata principalmente, attraverso la microscopia ottica, nel tacchino (Alkan *et al.*, 2002), nel codone comune (Penfold *et al.*, 2000), nell’anatra

(Ferdinand, 1992) e nel pollo (Tabatabaei *et al.*, 2009). Attraverso studi ultrastrutturali fatti nell'emu (Du Plessis *et al.*, 2011), è stato possibile evidenziare come in prossimità del punto di curvatura la cromatina sia poco compattata o assente. Tale osservazione ha portato a supporre un difetto della condensazione della cromatina durante la spermatogenesi (Du Plessis *et al.*, 2011). Quest'ipotesi è fortemente supportata da uno studio sugli spermatozoi dell'uomo in cui si afferma che "anomalie della testa dello spermatozoo possono in parte essere causate da una ridotta compattazione nucleare" (Zini *et al.*, 2009).

Le altre anomalie rilevate a livello della testa negli spermatozoi di astore e di fagiano (esempio danni acrosomiali e rottura della membrana plasmatica) anche se seri ed importanti dal punto di vista funzionale possono essere considerati casuali.

Le anomalie presenti nella regione della coda potenzialmente possono influenzare la motilità (Holstein *et al.*, 1988) e quindi la capacità fecondante degli spermatozoi (Bertschinger, 1992; Barth, 1989; Feito, 1990; Blom, 1972).

Per quanto riguarda gli spermatozoi di astore e fagiano l'anomalia maggiormente riscontrata a livello del pezzo intermedio è la rottura o la mancanza della membrana plasmatica. Tale anomalia è stata osservata anche nell'emu (Bertschinger, 1992), nel tacchino (Alkan *et al.*, 2002), nel gallo (Tabatabaei *et al.*, 2009) e nell'anatra (Ferdinand, 1992). Diversi ricercatori (Alkan *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 1986) hanno ipotizzato che le anomalie localizzate nel pezzo intermedio della coda siano dovute alla sensibilità di questa regione, che si deteriora più velocemente rispetto alle altre a causa dei piegamenti ai quali è continuamente sottoposta durante il movimento dello spermatozoo.

Il pezzo principale e il pezzo terminale della coda hanno mostrato ripiegamenti di diversa entità. Questa anomalia ricorda la "*dag tail*" descritta nei mammiferi (Menkveld *et al.*, 1991; Blom, 1966; Zuleta *et al.*, 1978), osservata anche nell'emu (Du Plessis *et al.*, 2011), nell'anatra (Umapathy, 2005), e nel gallo (Tabatabaei *et al.*, 2009).

Attraverso l'analisi al TEM sono stati rilevati anche alcuni gameti con un doppio assonema quindi con una doppia coda, anomalia osservata anche nell'uomo (Menkveld *et al.*, 1991), nel toro (Kopp *et al.*, 2007), nell'anatra (Ferdinand, 1992), e nell'emu (Du Plessis *et al.*, 2011). Si ipotizza che la presenza di spermatozoi con una doppia coda nel

liquido seminale fresco sia causata da errori durante la spermatogenesi (Du Plessis *et al.*, 2012).

La presenza di gameti con gocce citoplasmatiche denota una non completa espulsione del citoplasma che normalmente avviene nell'ultima fase di maturazione. Le conseguenze di tali residui citoplasmatici negli spermatozoi maturi possono essere molteplici e spesso portano al ripiegamento della coda.

Dall'analisi quantitativa delle categorie spermatiche presenti negli eiaculati freschi di entrambe le specie (cfr par. 3.2.1, 3.2.2) è emersa un'elevata percentuale di spermatozoi normali. La bassa frequenza di spermatozoi anomali riscontrata è probabilmente fisiologica ed è paragonabile ai risultati ottenuti nel codone comune (17,9%) (Penfold *et al.*, 2000) e nell'emu (17%) (Du Plessis *et al.*, 2011) ed altre specie animali. Questo risultato, per quanto riguarda l'astore, ci ha permesso di validare il metodo di raccolta messo in atto presso il centro di allevamento "*European falcons*", dimostrando che con l'utilizzo del metodo cooperativo è possibile raccogliere campioni di sperma utili per l'inseminazione artificiale e per i processi di crioconservazione.

L'astore non è un uccello "facile" da allevare a causa del suo temperamento particolarmente aggressivo, soprattutto durante il periodo di corteggiamento. Quindi il fatto di lavorare con esemplari imprintati sessualmente ci ha permesso di operare con animali notevolmente più tranquilli rispetto a quelli non imprintati. Tuttavia, ottenere un esemplare di astore imprintato sessualmente richiede molto tempo e lavoro per cui durante la sperimentazione è stato possibile utilizzare solo pochi animali. Questo problema è stato parzialmente attenuato dai molteplici tentativi di campionamenti effettuati e dai numerosi campioni di eiaculati raccolti. Nell'arco delle tre stagioni riproduttive con i tre animali presi in considerazione sono stati effettuati 216 tentativi di raccolta totali e di questi 178 sono andati a buon fine. Da questi ultimi sono stati ottenuti campioni di spermatozoi non contaminati da feci e urine.

Oltre all'analisi delle anomalie morfologiche, i parametri utilizzati per valutare la qualità dei campioni di eiaculati raccolti sono stati: volume, concentrazione, motilità, mobilità, e vitalità. Inoltre nei campioni di eiaculato fresco di astore sono stati analizzati anche i risultati ottenuti nel saggio di interazione sperma-uovo e i dati di fertilità nell'inseminazione artificiale.

Dal confronto dei risultati ottenuti per ogni esemplare l'individuo C è quello che ha mostrato i valori migliori per tutti i parametri analizzati. Questo probabilmente è dovuto al fatto che questo animale è il più giovane dell'allevamento. Infatti è stato rilevato che l'età ha un effetto negativo sul successo riproduttivo degli uccelli, probabilmente a causa di una diminuzione di testosterone nel plasma (Ottinger *et al.*, 1983), ormone di fondamentale importanza per la spermatogenesi, e quindi strettamente correlato alla produzione di spermatozoi (Kirby *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda il volume e la concentrazione dei campioni di eiaculato raccolti, dai tre maschi durante l'intero periodo di sperimentazione, i valori più alti sono stati evidenziati a metà stagione riproduttiva. Questo fenomeno, paragonabile con quanto osservato in *Anas platyrhynchos* (Stunden *et al.*, 1998), in *Anas acuta* (Penfold *et al.*, 2001) ed in alcune specie di rapaci (Blanco *et al.*, 2010), probabilmente è dovuto al fatto che in questo periodo la produzione di testosterone raggiunge i massimi livelli.

Il volume degli eiaculati nell'astore sono risultati nettamente inferiori rispetto a quelli raccolti in altre specie di Accipitridi quali *Gyps bengalensis* (Umapathy *et al.*, 2005) e *Gyps fulvus* (Madeddu *et al.*, 2008). Tali variazioni potrebbero essere dovute alla notevole specie specificità di questo parametro (Blanco, 2002).

La concentrazione di spermatozoi negli eiaculati di astore è risultata inferiore rispetto a quella rilevata in *Gyps bengalensis* (Umapathy *et al.*; 2005) e *Gyps fulvus* (Madeddu *et al.*; 2008). Questo fatto probabilmente è dovuto alla mancanza di contatto visivo ed uditivo dei maschi con le femmine. Infatti in uno studio sugli storni (*Sturnus vulgaris*) (Pinxten *et al.*, 2003) è stato dimostrato che la presenza di conspecifici femminili influenza positivamente la concentrazione di testosterone nel plasma e quindi la produzione di spermatozoi maturi.

Per quanto riguarda la capacità di movimento degli spermatozoi, quelli del maschio B, alla camera di Makler, hanno mostrato una minore percentuale di spermatozoi motili rispetto a quelli del maschio C. All'analisi con il metodo Accudenz invece, tali spermatozoi presentano una maggiore e più duratura capacità di movimento.

La vitalità è risultata alta per tutta la stagione riproduttiva nei tre esemplari di astore oggetto di questo studio. Questo probabilmente è dovuto al metodo di raccolta, che consente l'eiaculazione spontanea da parte dei maschi, quindi i campioni non sono contaminati da feci e soprattutto da urina, un acidificante letale per gli spermatozoi. Come riportato nel paragrafo 3.2.1 l'80% dei tentativi di inseminazione artificiale è

andato a buon fine, e nel 95% le uova si sono schiuse. Questi risultati possono essere paragonati con quelli ottenute in specie domestiche, dove la percentuale di uova fecondate con inseminazione artificiale è compresa in un range tra l'85 e il 95% (Joyner, 1994). Risultati altrettanto positivi si sono ottenuti nel saggio di interazione sperma-uovo.

Per quanto riguarda il fagiano, dal momento che viene allevato con successo già da molti anni, la qualità dei campioni di eiaculato freschi è stata già descritta in altri lavori (Marzoni *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2009). Quindi, in questo studio, è stata presa in considerazione solo esclusivamente come controllo positivo per valutare la bontà dei metodi di crioconservazione degli spermatozoi applicati per questa specie (cfr. tabella 39) e non per validare il metodo di raccolta come è stato fatto per l'astore.

La seconda parte del lavoro di tesi ha riguardato la messa a punto dei protocolli di crioconservazione dei gameti maschili di astore e fagiano.

I protocolli da utilizzare sono stati scelti sulla base delle indicazioni metodologiche riportate in letteratura per altre specie appartenenti ai rapaci (Madeddu *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2000), mentre per il fagiano sui protocolli utilizzati da Tselutin (1999) per il pollo. Inoltre, considerate le numerose analogie rilevate tra l'ultrastruttura dello spermatozoo delle due specie oggetto di questo studio, per l'astore è stato utilizzato anche lo stesso protocollo usato per il fagiano. Complessivamente per l'astore sono stati impiegati tre diversi protocolli (denominati rispettivamente protocollo I, II, III), per il fagiano ne è stato adoperato solamente uno, il secondo. Nei primi due è stato utilizzato il DMA a diverse concentrazioni rispetto al volume iniziale del campione come crioprotettore e il lake come diluente e gli spermatozoi sono stati criocongelati sotto forma di pellets direttamente in azoto liquido. Nel terzo è stato adoperato come crioprotettore il glicerolo e come diluente il lake e gli spermatozoi sono stati criocongelati all'interno di cryovials. Nel primo protocollo (I), impiegato già per la crioconservazione degli spermatozoi di diverse specie di rapaci (Madeddu *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2000), il DMA è stato utilizzato in rapporto 1:1. Nel secondo (II) invece il DMA è stato impiegato al 6% rispetto al volume iniziale. Quest'ultimo protocollo era stato impiegato precedentemente con successo per la crioconservazione degli spermatozoi di pollo (Santiago-Moreno, 2011; Tselutin, 1999). Il glicerolo usato nel protocollo III invece è il crioprotettore più ampiamente utilizzato in letteratura per la crioconservazione degli spermatozoi di numerose specie anche di rapaci (Long *et al.*,

2014; Blesbois, 2011; Brock *et al.*, 1991; Madeddu *et al.*, 2008; Penfold *et al.* 2001; Parks *et al.*, 1986). Quando è stato utilizzato quest'ultimo protocollo è stato osservato che già dopo la sola aggiunta del crioprotettore le percentuali di spermatozoi motili, e quella di quelli vitali erano molto basse. Non è stato possibile confrontare questo risultato con altri, dal momento che nei lavori presenti in letteratura (Madeddu *et al.*, 2008; Blesbois *et al.*, 2007) la motilità è stata valutata solo dopo l'intero processo di crioconservazione. Al termine della procedura di congelamento e scongelamento, a differenza di quanto riscontrato nell'aquila reale (Brock *et al.*, 1991), nell'avvoltoio (Madeddu *et al.*, 2008) e nel falco pellegrino (Parks *et al.*, 1986), gli spermatozoi non sono risultati né motili né vitali. All'analisi al SEM gli spermatozoi di astore crioconservati con questo protocollo sia dopo la sola aggiunta del crioprotettore e del diluente che dopo l'intero processo di crioconservazione hanno presentato molte anomalie per la maggior parte a carico della membrana confermando quanto già descritto da alcuni autori (Lahnsteiner *et al.*, 1992; Billard, 1983; Gwo e Arnold, 1992; Yao *et al.*, 2000). Infatti secondo Morris (1981) è proprio la membrana plasmatica il primo target danneggiato dal processo di crioconservazione che induce transizioni di fase nei lipidi delle membrane, comportandone una ridistribuzione spaziale (Holt e North, 1984; Quinn, 1985; De Leeuw *et al.*, 1990). A causa di questi cambiamenti, le membrane si destabilizzano, modificando la propria permeabilità (Holt e North, 1984), motivo per il quale gli spermatozoi sono più soggetti a subire danni durante il congelamento e lo scongelamento (De Leeuw *et al.*, 1993). Anche se anomalie così complesse non erano mai state osservate in altre specie aviarie in cui è stato utilizzato il glicerolo come crioprotettore, i danni osservati a livello dell'acrosoma e del pezzo intermedio sono confrontabili con quanto riscontrato da Maeda *et al.* (1984) in uno studio comparativo sugli effetti di diversi crioprotettori sulla morfologia degli spermatozoi di pollo, tacchino e quaglia (tutte specie appartenenti ai Galliformes).

Quando come crioprotettore è stato utilizzato il DMA in rapporto 1:1 rispetto al volume iniziale (protocollo I), già dopo la sola aggiunta del crioprotettore e del diluente i valori percentuali di motilità e vitalità erano estremamente bassi, dopo l'intero processo di crioconservazione tali parametri sono risultati uguali a zero. All'analisi al SEM gli spermatozoi di astore crioconservati con questo protocollo sia dopo la sola aggiunta del crioprotettore e del diluente che dopo l'intero processo di crioconservazione, gli spermatozoi appaiono completamente inviluppati in una fitta

rete di materiale, presumibilmente il DMA stesso. Quindi, probabilmente, la causa dei valori di motilità e vitalità pari a zero riscontrati è che il DMA è stato utilizzato ad una concentrazione troppo elevata. Questo risultato può essere confrontato con quanto ottenuto in altri rapaci quali l'aquila imperiale, l'aquila fasciata, l'aquila reale e il falco pellegrino, nei quali è stato osservato che maggiori concentrazioni di DMA causano un decremento della vitalità degli spermatozoi (Blanco *et al.*, 2000).

Risultati nettamente migliori sono stati ottenuti quando è stato utilizzato il DMA al 6% rispetto al volume iniziale (protocollo II). Nell'astore dopo l'intero processo la percentuale degli spermatozoi vitali è risultata in un range tra il 15% e il 69%, mentre nel fagiano tra il 10,9% e il 48%. Tali risultati sono confrontabili con quelli ottenuti nel grifone indiano (41-57%) (Madeddu *et al.*, 2008) e nel gallo cedrone (30-55%) (Kowalczyk *et al.*, 2015). La percentuale di spermatozoi con morfologia normale è risultata compresa in un range che va dal 21,9% al 29,9% nell'astore e tra il 6,1% e il 26,5% nel fagiano. Anche in questo caso i risultati sono paragonabili con quelli riscontrati nel gallo cedrone (11,8-29,3%) (Kowalczyk *et al.*, 2015).

Per quanto riguarda la motilità degli spermatozoi di astore rilevata attraverso l'analisi alla Camera di Makler, dopo l'intero processo di crioconservazione, la percentuale di spermatozoi motili è risultata notevolmente inferiore rispetto a quella riscontrata negli eiaculati freschi. Lo stesso risultato è stato ottenuto, sia nell'astore che nel fagiano, con lo studio della mobilità degli spermatozoi con il metodo Accudenz, nel quale sono state riscontrate OD notevolmente più basse rispetto a quelle osservate nel fresco. Tale risultato è confermato nel saggio di interazione sperma-uovo. I risultati ottenuti (tramite il metodo Accudenz e il saggio di interazione sperma-uovo) sono estremamente importanti in quanto ci permettono di ipotizzare che gli spermatozoi di astore crioconservati utilizzando il DMA al 6% siano in grado di muoversi all'interno delle vie genitali femminili fino ad arrivare al sito di fecondazione e di fecondare l'uovo. Questa ipotesi è supportata dai risultati ottenuti nei test *in vivo* effettuati con gli spermatozoi crioconservati di fagiano. Infatti nei test di inseminazione artificiale si è ottenuta una percentuale di uova schiuse compresa tra il 22,2% e il 100% e i valori più alti sono stati ottenuti nelle prove dove sono stati utilizzati campioni di spermatozoi crioconservati a minor concentrazione (45×10^6 spermatozoi per millilitro). Questo conferma quanto già osservato in altri studi, ossia che la concentrazione degli spermatozoi è solo uno dei fattori che determinano la buona riuscita dell'inseminazione

artificiale, che può essere influenzata anche dal volume del campione, dalla capacità di movimento degli spermatozoi e dal metabolismo cellulare (Waldoch *et al.*, 2011). In particolare è stato dimostrato in diverse specie aviarie che la mobilità degli spermatozoi gioca un ruolo chiave per l'ottenimento di uova fertili a seguito del processo di inseminazione artificiale, in quanto gli spermatozoi devono essere in grado di muoversi all'interno delle vie genitali femminili per poter raggiungere il sito di fertilizzazione (Waldoch *et al.*, 2011, Froman *et al.*, 2006, King *et al.*, 2000, O.*et al.*, 1998). L'impiego di campioni di spermatozoi con bassa capacità di movimento non può essere compensato con l'utilizzo di campioni di eiaculati maggiormente concentrati Kirby *et al.* (2000).

Per il momento non si sono potuti eseguire tali test *in vivo* con gli spermatozoi crioconservati di astore a causa dei piccoli volumi raccolti in ciascun campionamento per ogni esemplare oggetto di questo studio.

Nel fagiano, considerato che si avevano a disposizione maggiori volumi di eiaculato, è stato possibile caratterizzare con la microscopia elettronica le anomalie spermatiche presenti nei campioni dopo il processo di crioconservazione ed è stato riscontrato come il processo di congelamento/scongelo causi la comparsa di nuove anomalie soprattutto a livello della testa e del pezzo intermedio della coda, non rilevate negli eiaculati freschi. La maggior parte dei danni sono stati osservati a carico della membrana plasmatica e dei mitocondri. La perdita di vitalità e soprattutto di motilità potrebbe quindi essere dovuta alla presenza di tali anomalie.

Perciò, sulla base dei risultati sovraesposti si può affermare che, anche se sono necessarie ulteriori modifiche, il protocollo che prevede l'utilizzo del prefreezing lake come diluente e del DMA al 6% rispetto al volume iniziale del campione come crioprotettore può essere tenuto in considerazione per una eventuale applicazione nella crioconservazione degli spermatozoi di astore e fagiano che sebbene essi appartengano a ordini diversi, hanno spermatozoi con una morfologia e un'ultrastruttura notevolmente simili: ciò conferma l'importanza della relazione "struttura dello spermatozoo-efficacia del protocollo di crioconservazione".

Infine, lo studio sui campioni di spermatozoi di astore ha dimostrato che gli spermatozoi dell'animale C - che, come si è evidenziato nel paragrafo 3.2.1 di questo lavoro, è quello che ha fornito eiaculati qualitativamente migliori - hanno sono i più idonei alla crioconservazione, ciò conferma quanto la letteratura ha già messo in

evidenza per altre specie (Blesbois, 2011; Kowalczyk *et al.*, 2012, Blesbois *et al.*, 2008; Łukaszewicz *et al.*, 2011) ossia che avere a disposizione campioni di eiaculato qualitativamente buoni è di fondamentale importanza quando si vuole intraprendere il processo di crioconservazione.

Quindi, possiamo affermare che le metodiche di crioconservazione degli spermatozoi sono altamente specie-specifiche e nella loro messa a punto, è opportuno basarsi sulla struttura stessa dello spermatozoo. Infatti, specie tassonomicamente vicine – come ad esempio Falconidi e Accipitrinidi – o addirittura appartenenti allo stesso ordine possono avere spermatozoi morfologicamente diversi. Tant'è vero che quando è stato utilizzato il glicerolo come crioprotettore nell'avvoltoio (Accipitriformes) si sono ottenuti validi risultati; invece, quando lo stesso procedimento è stato applicato all'astore (anch'esso Accipitriformes), gli spermatozoi già dopo la sola aggiunta del diluente e del crioprotettore hanno mostrato una vitalità molto bassa. Cosicché le metodologie applicate agli spermatozoi dei rapaci (quali, ad esempio, il falco pellegrino, l'aquila reale, etc.) non sono applicabili all'astore, nonostante siano vicini dal punto di vista sistematico. Pertanto, non sorprende osservare che le tecniche di crioconservazione più utili per gli spermatozoi dell'astore siano quelle applicabili anche al fagiano con il quale condivide alcuni fondamentali caratteri spermatici. Sulla scia di queste considerazioni è possibile concludere sostenendo che le caratteristiche ultrastrutturali dello spermatozoo forniscono informazioni di fondamentale importanza per la messa a punto di tecniche di crioconservazione degli spermatozoi. Per cui, astore e fagiano, pur essendo lontani tassonomicamente, ma condividendo molti caratteri spermatici, richiedono tecniche simili per la crioconservazione dei gameti maschili.

Pertanto concludendo si può sostenere che due *step* di fondamentale importanza prima di intraprendere una procedura di crioconservazione sono lo studio della morfologia e dell'ultrastruttura degli spermatozoi e della qualità dei campioni di eiaculato freschi. L'analisi di quest'ultima oltre a fornire delle indicazioni su quali campioni di spermatozoi sottoporre al processo di crioconservazione in questo studio, per quanto riguarda l'astore, ha permesso anche di validare il metodo di raccolta.

I risultati ottenuti in questo lavoro, anche se preliminari, possono essere una buona base di partenza per la messa a punto di metodologie di crioconservazione degli spermi anche in altre specie di uccelli in modo da ampliare il campo di applicazione di questa metodica.

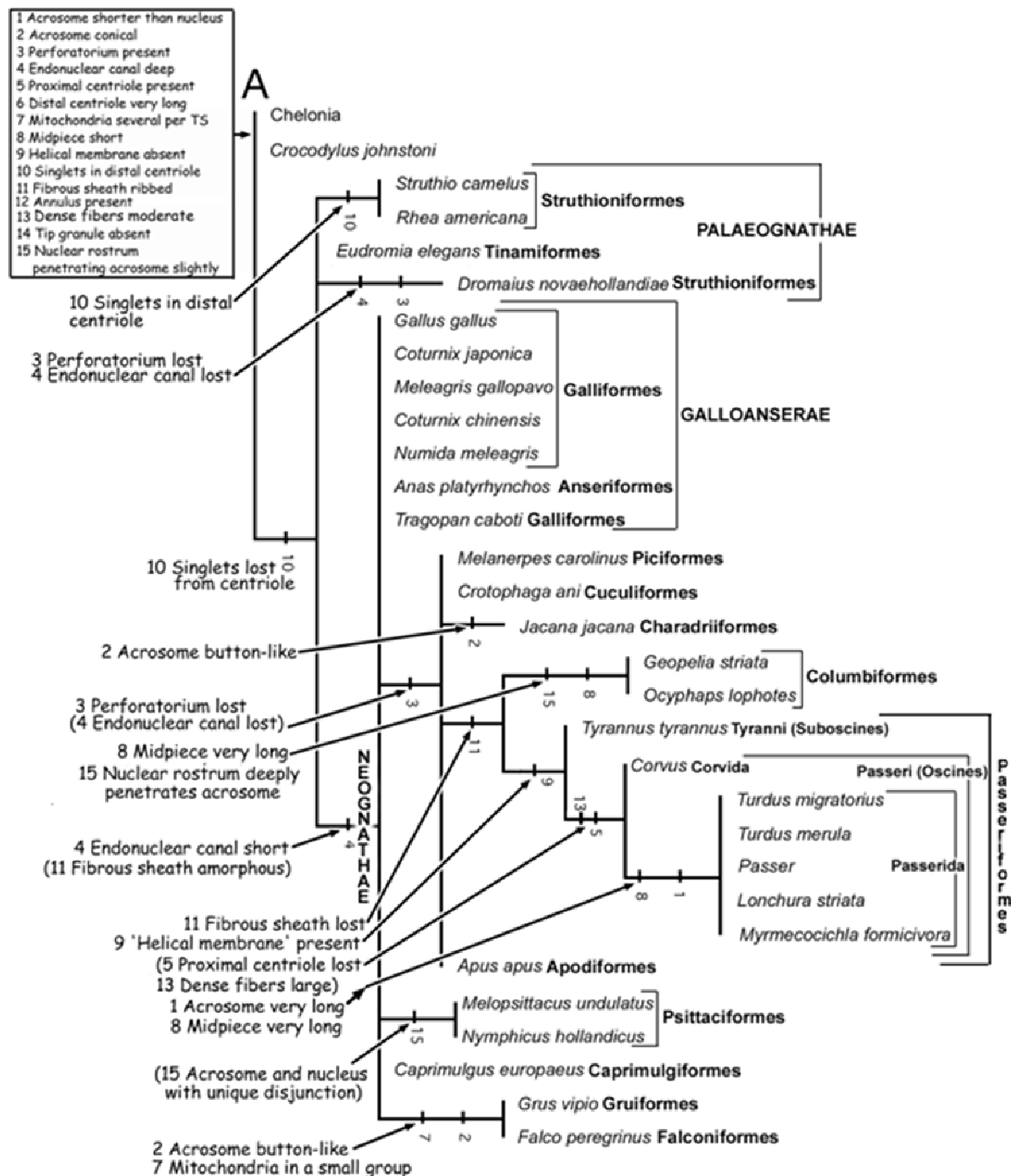


Figura 48: Albero filogenetico dei maggiori ordini di uccelli realizzato con analisi PAUP (Swofford 2001) utilizzando l'ultrastruttura degli spermatozoi degli uccelli (Jamieson, 2007).

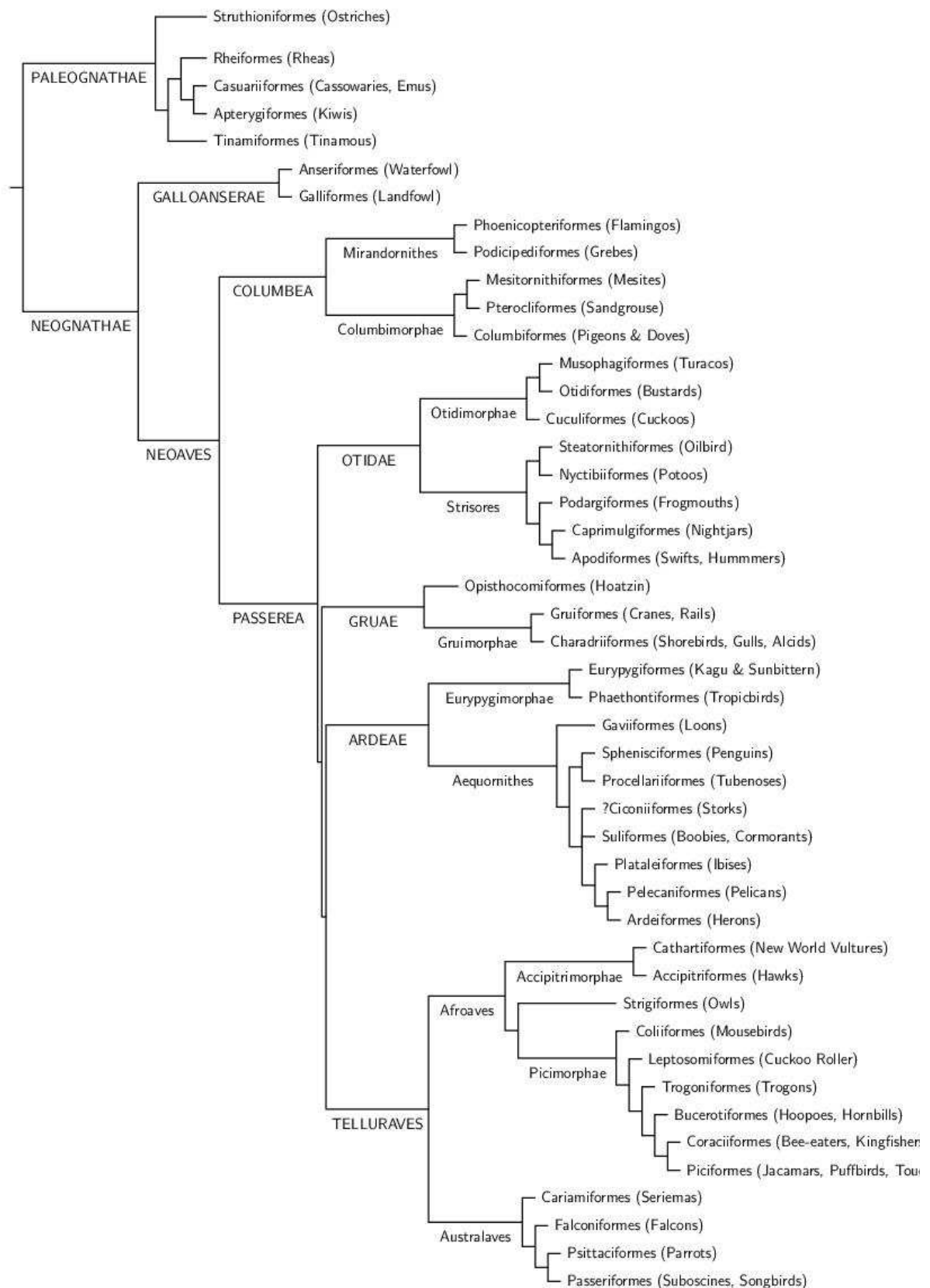


Figura 49: albero filogenetico degli uccelli basato su studi molecolari

BIBLIOGRAFIA

1. AA.VV. (1989). Atlante degli uccelli nidificanti in Liguria. Regione Liguria.
2. Aire T.A. (2007). Spermatogenesis and testicular Cycles. In *Reproduction Biology and Phylogeny of Birds*. (Jamieson BGM ed.), Queensland Univ. Queensland, Australia. Pp. 279-349
3. Alkan S., Baran A., Özdas O' B, Evecen M. (2002) Morphological defects in turkey semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*;26:1087–1092
4. Allen B. A. (1978). Nesting ecology of the goshawk in the Adirondacks. M.S. thesis, State Univ. of New York, Syracuse.
5. Altenkamp R. (2002). Bestandsentwicklung, Reproduktion und Brutbiologie einer urbanen Population des Habichts *Accipiter gentilis* (Linné 1758). Diploma thesis. University of Berlin, Berlin.
6. Arcioni E. (2010). Comunicazione personale
7. Argano R., Boero F., Bologna M.A., Dallai R., Lanzavecchia G., Luporini P., Melone G., Sbordoni V., Scalera Liaci L. (2007). *Zoologia – Evoluzione e adattamento*. Monduzzi editore. Cap. VII
8. Asa C., Phillips D.M, Stover J. (1986). Ultrastructure of spermatozoa of the crested tinamou. *Journal of Molecular Structure*;94:170–5.
9. Asa C. S., Phillips D. M. (1987). Ultrastructure of Avian Spermatozoa: A Short Review. Pp. 365-373. In H. Mohri (ed). *New Horizons in Sperm Cell Research*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo; Gordon and Breach Scientific Publishers, New York.
10. Baccetti B, Bigliardi E, Burrini AG. (1980) The morphogenesis of vertebrate *perforatorium*. *Journal of Ultrastructure Research*;71:272–287.

11. Baccetti B., Burrini A.G., Falchetti E. (1991) Spermatozoa and relationships in Palaeognath birds. *Biology of the Cell*;71:209–16.
12. Bakst M.R., Howarth B. (1975). The head and midpiece of cock spermatozoa examined with the transmission electron microscope. *Biology Reproduction*;12:632–40.
13. Bakst M.R., Sexton T.J. (1979) Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*;55:1–7.
14. Bakst MR. (1980) Ultrastructure of chicken and turkey gametes, fertilization and oviductal sperm transport: a review. 9th Int Congr Anim Reprod Artif Insem, Madrid. Volume II: 511–517.
15. Bakst M. R., Wishart G., Brillard J.P., (1994). Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poultry Science Review*, 5:117-143.
16. Bakst M. (2010) Sperm Viability In Bakst MR and Long JA editors, 2nd Edition: *Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage, and Fertility Determination*, Buffalo, Minnesota: The Midwest Poultry Federation, p. 39-41
17. Ballowitz E. (1886). Zur Lehre von der Stuktur der Spermatozoën. *Anatomische Anzeiger* 1: 363-376.
18. Ballowitz E. (1888). Untersuchungen über die Struktur der Spermatozoën, zugleich ein Beitrag zur Lehre vom feineren Bau der kontraktilen Elemente. *Archiv fuer Mikroskopische Anatomie* 32: 401-473.
19. Ballowitz E. (1913). Die Spermien der Helgoländer Lumme (*Uria lomvia* L.). *Anatomische Anzeiger* 44: 305-309.
20. Barnes R.D., Dorit R.L., Walker W. F. (2001). *Zoologia*. Zanichelli. Cap. 39.
21. Barth A.D., Oko R.J. (1989). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press

22. Beebe F.L. (1974). Goshawk. Field studies of the Falconiformes of British Columbia. British Columbia Provincial Museum Occasional Papers; Series no 17: 54-63.
23. Beier P., Drennan J.E. (1997). Forest structure and prey abundance in foraging areas of northern goshawks. *Ecological Applications*; 7(2): 564-571.
24. Bellagamba F., Cerolini S., Cavalchini L.G. (1993). Cryopreservation of poultry semen: a review. *World's Poultry Science Journal*, 49: 157-66.
25. Benussi E., Perco F. (1984). Osservazioni eco-etologiche sull'astore *Accipiter g. gentilis* nel Carso triestino. *Uccelli d'Italia*; 9: 3-25.
26. Benussi E., Zanghellini S. (P. Brighetti red) (1986) Atlante degli uccelli nidificanti sulle Alpi Italiane III. Astore (*Accipiter gentilis*). *Rivista Italiana di Ornitologia*; 56 (1-2): 6-7
27. Bertschinger H.J., Burger W.P., Soley J.T., De Lange J.H. (1992) Semen collection and evaluation of the male ostrich. *Proc Biennial Congr S Afr Vet Assoc*, Grahamstown, pp. 154–8.
28. Betzen K.M. (1985). Techniques for Electrical Semen Collection in Birds. M.S. Thesis, Oklahoma State Univ., Stillwater, Oklahoma.
29. Billard R. (1983). Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep freezing. *Cell and Tissue Research*; 228 (2): 205-218. (doi:10.1007/BF00204873).
30. BirdLife International (2013). *Accipiter gentilis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 13 September 2014.
31. BirdLife International (2014). The Birdlife checklist of the birds of the world: Version 7. Downloaded from http://www.birdlife.org/datazone/userfiles/file/Species/Taxonomy/Birdlife_Checklist_Version_70.zip

32. Birdlife International, (2014a). *Phasianus colchicus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 19 February 2015.
33. Birkhead T.R., Fletcher F. (1995). Depletion determines sperm numbers in male zebra finches. *Animal behavior*; 49: 451
34. Birkhead T. R., Immler S., Pellatt E. J., Freckleton, R.(2006). Unusual sperm morphology in the Eurasian bullfinch *Pyrrhula pyrrhula*. *Auk*, 123 (2): 383-392
35. Blanco J.M., Gee G.F., Wildt D.E., Donoghue A.M. (2000). Species Variation in Osmotic, Cryoprotectant, and Cooling Rate Tolerance in Poultry, Eagle, and Peregrine Falcon Spermatozoa. *Biology of reproduction* 63, 1164–1171
36. Blanco J.M., Gee G.F., Wildt D.E., Donoghue A.M. (2002). Producing progeny from endangered bird of prey: treatment of urine contaminated semen and a novel intramaginal insemination approach. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*; 33:1-7
37. Blanco J., Samour J., Bird D.M. (2007). Reproductive physiology. Pp. 286-292 in D.M. Bird and K.L. Bildstein (eds.), *Raptor Research and Management Techniques*. Hancock House Publishers, Surrey, British Columbia, Canada.
38. Blanco J.M., Long J.A., Gee G., Donoghue A.M., Wildt D.E. (2008). Osmotic tolerance of avian spermatozoa: influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. *Cryobiology*, 56(1):8-14
39. Blanco J.M., Wildt D.E., Hofle U., Voekler W., Donogue A.M. (2009). Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. *Theriogenology*; 71: 200-213.
40. Blanco J.M., Bird D.M., Samour J.H. (2010). Reproductive. Chapter 16. *Raptor Research and Management Techniques*. Pp. 286-292. <http://raptors.hancockwildlife.org>
41. Blanco J. M., Long J. A., Gee G., Wildt D. E., Donoghue A.M. (2011). Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-

- permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 123: 242-248
42. Blesbois E., C. Labbé (2003). Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. Pages 55–66 in *Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe*. D. Planchenault, ed. BRG, Paris, France.
43. Blesbois E., Brillard J.P. (2007) Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal*; 1: 1472-1481
44. Blesbois E., Seigneurin, F., Grasseau I., Limouzin C., Besnard J., Gourichon, Coquerelle D.G., Rault P., Tixier-Boichard M. (2007). Semen Cryopreservation for Ex Situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poultry Science*; 86 (3): 555–564.
45. Blesbois E. (2011). Freezing avian semen. *Avian Biology Research*; 4(2): 52-58
46. Blesbois E. (2012). Biological features of the Avian Male Gamete and their Application to Biotechnology of Conservation. *Journal of Poultry Science*; 49: 141-149
47. Blom E. (1966). A new sterilizing and hereditary defect (the ‘Dag’ defect) located in the bull sperm tail. *Nature*; 209: 739 – 40.
48. Blom E. (1972). The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Atti del VII Simp Int de Zoo.*, Milano, pp. 125–39.
49. Boal C.W., Andersen D.E., Kennedy P.L. (2002). Home range and habitat use of northern goshawks (*Accipiter gentilis*) in Minnesota. Forest systems of the upper Midwest: research review. Cloquet Forestry Center, University of Minnesota, U. S. Forest Service and Minnesota Forest Resources Council. Cloquet, MN.
50. Bonora M. (1994), *Uccelli di campagna*, Edizioni L’informatore agrario, Verona

51. Bowkett A.E. (2008). Recent Captive-Breeding Proposals and the Return of the Ark Concept to Global Species Conservation. *Conservation Biology*; 23 (3): 773–776. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2008.01157.x
52. Boyd L.L. e Boyd N.S. (1976). Hybrid falcon. *Hawk Chalk*, 14, 53
53. Boyd L.L. (1988). Artificial insemination of falcons. *Symposia of the Zoological Society of London*, 43: 73-80.
54. Brillard J.P., Bakst M.R. (1990). Quantification of spermatozoa in the sperm-storage tubules of turkey hens and its relation to sperm number in the perivitelline layer of eggs. *Biology of reproduction*, 43: 271-275
55. Brito L.F.C. (2007) Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*;6:249–64.
56. Briz M.D., Bonet S., Pinart B., Camps R. (1996). Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. *Animal Reproduction Science*;43: 221–39.
57. Brock M.K., Bird D.M. (1991). Prefreeze and postthaw effects of glycerol and dimethylacetamide and fertilizing ability of American Kestrel (*Falco sparverius*) spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22 (4): 453-459
58. Brown L., Amadon D. (1968). *Eagles, hawks, and falcons of the world. Part 2.* McGraw-Hill, New York.
59. Buhler U., Klaus R., Schlosser W. (1987). Brutbestand und Jungenproduktion des Habichts *Accipiter gentilis* in der Nordostschweiz 1979-1984. *Der Ornithologische Beobachter*; 84: 95-110.
60. Bull E.L., Hohmann J.L. (1994). Breeding biology of Northern Goshawks in northeastern Oregon. *Studies in Avian Biology* 16:103–105
61. Burrows W.H., Quinn J.P. (1935). A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poultry Science*,14: 253-254.

62. Byholm P., Nikula A., Kentta J., Taivalma" ki J.-P. (2007). Interactions between habitat heterogeneity and food affect reproductive output in a top predator. *The Journal of Animal Ecology* ;76 (2): 392–401. (doi: 10.1111/j.1365-2656.2007.01211.x).
63. Cain J.R. (1978). Artificial insemination: a practical method for genetic improvement in ring-necked pheasants. *Symposia of the Zoological Society of London*, 43: 81-88.
64. Campanella C, Gabbiani G, Baccetti B, Burrini AG, Pallini V. (1979) Actin and myosin in the vertebrate acrosomal region. *Journal Of Submicroscopic Cytology*; 11:53–71.
65. Card C. (2005). Cellular associations and the differential spermogram: Making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* ;64;558–67.
66. Castillo A.; Marzoni M.; Romboli I (2009). Some advices to breed common pheasants used as donors of good quality semen. *Avian Biology Research*, 2 (4); 243
67. Castillo A., Romboli I., Marzoni M. (2011). Cryopreserved pheasant semen thawed by the hotplate method and tested in vivo. *Avian Biology Research*, 4: 137
68. Chenoweth P.J. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*; 64:457– 68.
69. Cocchi R., Riga F., Toso S. (1998), *Biologia e gestione del fagiano*, Istituto nazionale per la fauna selvatica Alessandro Ghigi, Ozzano dell'Emilia.
70. Collar N.J., Butchar S.H.M. (2014). Conservation breeding and avian diversity: chances and challenges. *International Zoo Yearbook*, 33 (1): 283-293
71. Cooper TG, Björndahl L, Vreeburg J, Nieschlag E. (2002). Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *International Journal of Andrology*;25:306 –11.
72. Cramp S., Simmons K.E.L. (1980). *Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa*. Vol. 1-9. Oxford University Press, Oxford.

73. De Leeuw F.E., Hsiao-Ching C., Colenbrander B., Varkleij (1990). Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*; 27 (2): 171-183.
74. De Leeuw F.E., De Leeuw A.M., Den Daas J.H.G., Colenbrander B., Varkleij A.J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*; 30 (1): 32-44.
75. Del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J. (1994). Handbook of the birds of the world. Vol. 2: New World Vultures to Guineafowl. Spain, Barcelona: Lynx Editions.
76. Della Volpe A., Schmidt V., Krautwald-Junghanns M.E. (2011). Attempted semen collection using the massage technique in Blue-fronted Amazon Parrots (*Amazon aestiva aestiva*). *Journal of avian medicine and surgery* 25 (1): 1-7
77. Deviche P., Hurley L.L., Bobby Fokidis H. (2011). Avian Testicular Structure, Function, and Regulation. *Hormones and Reproduction of Vertebrates: Birds*. Chapter 2: 27-70
78. Dewey S., Kennedy P.L. (2001). Effects of supplemental food on parental care strategies and juvenile survival of northern goshawks. *The Auk*; 118 (2): 352–365.
79. Dewey S.R., Kennedy P.L., Stephens R.M. (2003). Are dawn vocalization surveys effective for monitoring goshawk nest-area occupancy? *Journal of Wildlife Management*; 67: 390-397.
80. Domm L.V. (1939). Modifications in sex and secondary sexual characters in birds. Pages 227–327 in E. Allen [ED.], *Sex and internal secretions*, 2nd Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD U.S.A.
81. Donoughe A.M., Wishart G.J. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* 62: 213-232.
82. Dowsett KF, Osborne HG, Pattie WA. (1984) Morphological characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*; 22: 463–72.

83. Doyle F.I., Smith J.M.N. (1994). Populations responses of northern goshawks to the 10-year cycle in numbers of snowshoe hares. *Studies in Avian Biology*; 16: 122-129.
84. Draghi Alice (2007). Distribuzione e Uso dell'Habitat del Fagiano (*Phasianus colchicus*) in Relazione alle Piantagioni Arboree a Turno Breve in Aree Protette della Pianura Padana. Tesi di laurea
85. Drennan J. E., Beier P. (2003). Forest Structure and prey abundance in winter habitat of northern goshawks. *Journal of Wildlife Management*; 67 (1): 177-185.
86. Du Plessis L., Soley T. (2011) Incidence, structure and morphological classification of abnormal sperm in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Theriogenology*; 75: 589-611
87. Du Plessis L, Soley T. (2012). Structural peculiarities associated with multiflagellate sperm in the emu, *Dromaius novaehollandiae*. *Theriogenology*, 78:1094-1101
88. Du Plessis L, Soley T. (2014). A re-evaluation of sperm ultrastructure in the emu, (*Dromaius novaehollandiae*). *Theriogenology*, 81:1073-84
89. Elkins N. (1983) Weather and Bird Behaviour. T. & A. D. Poyser, Carlton.
90. Erdman T.C., Brinker D.F., Jacobs J.P., Wilde J., Meyer T.O. (1998). Productivity, population trend, and status of Northern Goshawks, *Accipiter gentilis atricapillus*, in northeastern Wisconsin. *Canadian Field-Naturalist*; 112 (1):17-27.
91. Feito R.J. (1990) Ultrastructural study of abnormal spermiogenesis in four hystricognate rodents. *Journal of Reproduction and Fertility*;88:411– 8.
92. Ferdinand A. (1992). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie von Ganterspermatozoen. Dissertation zur erlangung des grades eines Doctor Medicinae Veterinariae. Hannover.

93. Fischer W. (1983) Die Habichte. Neue Brehm-Bücherei, Wittenberg Lutherstadt.
94. Foucrier J., Le Moigne A. (2004). Biologia dello sviluppo. EdiSES.
95. Freneau G.E., Chenoweth P.J., Ellis R., Rupp G. (2010). Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Animal Reproduction Science*;118:176–81.
96. Froman D.P., Bernier P.E. (1987) Identification of heritable spermatozoa degeneration within the ductus deferens of the chicken (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction* ;37:969–977.
97. Froman D P, Feltmann A J. (2000). Sperm mobility: Phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by concentration of motile sperm and straight line velocity. *Biology of Reproduction*; 62:303-309
98. Froman D.P., Wardell J.C., Feltmann A.J. (2006). Sperm mobility: deduction of a model explaining phenotypic variation in roosters (*Gallus domesticus*). *Biology of reproduction*; 74: 487-491
99. Froman D P. (2010). Sperm Motility and Metabolism- Sperm Mobility Determination – The Laboratory Method. In Bakst MR and Long JA editors, 2nd Edition: Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage, and Fertility Determination, Buffalo, Minnesota: The Midwest Poultry Federation, p. 49-54
100. Fujihara N., Buckland R.B. (1987). The effect of different freezing rates on fertilizing ability of frozen-thawed chicken spermatozoa. *Japanese Journal Animal Reproduction*, 33:11-14.
101. Furieri P. (1961). Caratteri ultrastrutturali di spermi flagellati di anfibi e uccelli. Studio al microscopio elettronico. *Archivio Zoologico Italiano (Napoli)* 46: 123-147.
102. Gee G.F. (1983). Avian artificial insemination and semen preservation. In: Proceedings of the International Foundation for Conservation of Birds/Jean Delacour Conference, Breeding Birds in Captivity. N. Hollywood, CA, USA, p. 375-8.

103. Gee G.F., Bakst M.R., Sexton T.J. (1985) Cryogenic preservation of semen from the greater sandhill crane. *The Journal of Wildlife Management*, 49: 480-484
104. Gee G.F., Sexton T.J. (1990). Cryopreservation of semen in the Aleutian Canada Goose (*Branta Canadensis leucopareia*). *Zoo Biology*; 9: 361
105. Gee G.F., Morrell C.A., Franson J.C., Pattee O.H. (1993) Cryopreservation of American kestrel semen with dimethylsulfoxide. *Journal of Raptor Research*, 27: 21-25
106. Gee G.F. (1994). Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. In: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. University of Maryland, College Park, USA, p. 262-279.
107. Gee G.F., Mirande C.M. (1996). Artificial insemination. In: Ellis DH, Gee G.F., Mirande C.M. editors. *Cranes: their biology, husbandry, and conservation*. Washington, DC/Baraboo, WI: National Biological Service/International Crane Foundation; p. 205
108. Gee G.F., Bertschinger H., Donoghue A. M., Blanco J., Soley J.T. (2004). Reproduction in nondomestic birds: physiology, semen collection, artificial insemination and cryopreservation. *Avian Poultry Biology Rev* 15: 47-101
109. Gensbol B. (1992). Guida ai rapaci diurni d'Europa, Nord Africa e Medio Oriente – Zanichelli, Bologna. Pp. 217-225.
110. Gloria A., Contri A., Carluccio A., Parrillo S., Cicconi M., Robbe D. (2014). The breeding management affects fresh and cryopreserved semen characteristics in *Melopsittacus undulatus*. *Animal Reproduction Science* 144: 48-53
111. Glutz von Blotzheim U., Bauer K., Bezzel E. (1971) *Handbuch der Vögel Mitteleuropas*, Vol. 4. Akad. Verlagsgesellschaft, Wiesbaden.
112. Graham J.K., Mocé E. (2005) Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*;64:492–504.

113. Grier J.W. (1973). Techniques and results of artificial insemination with Golden Eagles. Raptor research 7:1.
114. Grigg G. W., Hodge, A. J. (1949). Electron microscopic studies of spermatozoa. I. The morphology of the spermatozoon of the common domestic fowl (*Gallus domesticus*). Australian Journal of Scientific Research, Series B 2: 271-297.
115. Gwo J., Arnold C.R. (1992). Cryopreservation of Atlantic croacker spermatozoa: evaluation of morphological changes. Journal of Experimental Zoology; 264 (4): 444-453. (doi:10.1002/jez.1402640410).
116. Hammerstrom F. (1970). An eagle in the sky. Iowa University Press, Ames. p. 142
117. Hammersyedt R.H. (1995) Cryopreservation of Poultry Semen – Current Status and Economics. In; Proceedings First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry, Poultry Science Association, Savoy, Illinois, USA. pp
118. Hanks J. (2001). Conservation strategies for Africa's large mammals. Reproduction Fertility and Development; 13(7-8): 459-468. (doi: 10.1071/RD01070).
119. Harrison G.J., Wasmund D. (1983). Preliminary studies of electroejaculation to facilitate manual semen collection in psittacines. In Proceedings 1983 of the Annual Meeting Association of Avian Veterinarians Wyecławaska Dyurkanna, Naukowa, Krakow. Poland. pp. 207-213.
120. Hemberger M.Y., Hospes R., Bostedt H. (2001) Semen collection, examination and spermogram in ostriches. Reproduction in Domestic Animals;36:241-3.
121. Henley C., Feduccia A., Costello D. P. (1978). Oscine spermatozoa: A light and electron-microscopy study. The Condor 80: 41-48.

122. Hennessy S.P. (1978). Ecological relationships of accipiters in northern Utah with special emphasis on the effects of human disturbance. M.S. Thesis. Utah State University, Logan, UT.
123. Hess R.A., Hughes B.L., Thurston R.J. (1986). Frequency and structure of macrophages and abnormal sperm cells in guinea fowl semen. *Reproduction Nutrition Development* ;26:39 –51.
124. Hickman P. C. Roberts L.S., Keen S.L., Larson A., Eisenhour D.J. (2008) *Diversità animale*. McGraw-Hill. Pp. 372-375
125. Hickman P. C. Roberts L.S., Keen S.L., Eisenhour D.J., Larson A., L'Anson H. (2012) *Diversità animale*. McGraw-Hill. Pp. 372-375
126. Hoglund N. H. (1964). Der Habicht *Accipiter gentilis* Lenne in Ferroskandia. *Viltrevy*; 2: 195-269.
127. Holstein A.F., Roosen Runge E.C. (1981) *Atlas of human spermatogenesis*. Berlin; Goose Verlag
128. Holstein A.F., Roosen-Runge E.C., Schirren C. (1988) *Illustrated Pathology of Human Spermatogenesis*. Grosse Verlag.
129. Holt W.V., Pickard A.R. (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of Reproduction*; 4 (3):143–150 (doi:10.15307ROR.0.0040143)
130. Hotchkiss RS, Brunner EK, Grenley P. (1938) Semen analysis of two hundred fertile men. *The American Journal of the Medical Sciences*; 196:362–84.
131. Humphreys P. N. (1972). Brief observations on the semen and spermatozoa of certain passerine and non-passerine birds. *Journal of Reproduction and Fertility* 29: 327-336.
132. IUCN Red List 2012, URL : http://www.iucnredlist.org/documents/summarystatistics/2012_2_RL_Stats_Table1.pdf (Last accessed: Dec 3, 2012)

133. IUDZG/CBSG (The World Zoo Organisation/Conservation Breeding Specialist Group). (1993). The world zoo conservation strategy: the role of zoos and aquaria of the world in global conservation. Chicago Zoological Society, Brookfield, Illinois.
134. Jamieson B. G. M. (1999). Spermatozoal phylogeny of the Vertebrata. Pp. 303-331. In C. Gagnon (ed). The Male Gamete. From Basic Science to Clinical Applications, Cache River Press, Vienna, USA.
135. Jamieson B.M.G., Hodgson A, Spottiswood C.N. (2006). Ultrastructure of the spermatozoon of *Myrmecocichla formicivora* (Vieillot, 1881) and *Philetairus socius* (Latham, 1790) (Aves; Passeriformes), with a new interpretation of the passeridan acrosome. *Acta Zoologica*;87:297– 304.
136. Jamieson BGM. (2007). Avian spermatozoa: Structure and Phylogeny. In: Jamieson BGM (Ed.), Reproductive Biology and Phylogeny of Birds Part A. Science Publishers, pp. 349–511.
137. Jasko D.L., Lein D.H., Foote R.H. (1990) Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 197:389–394.
138. Johnsgard P.A. (1986). Pheasants of the world. Oxford University Press. 300 pp.
139. Johnson A.L. (1986) Reproduction in female. In: Avian physiology, fourth edition (Sturkie PD ed.). pp. 403-431. Springer-Verlag. NY.
140. Jørgensen N, Auger J, Giwercman A, Irvine DS, Jensen TK, Jouannet P, (1997) Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. *International Journal of Andrology*;20: 201–208.
141. Joyner KL. (1994) Theriogenology. In B. W. Ritchie, G. J. Harrison and L. R. Harrison [Eds.], *Avian Medicine: Principles and Applications*, Chapter 29. Delray Beach, FL: Wingers Publishing, 1994, p.704-804

142. Kamar G.A.R., Rizik M.A.A. (1972). Semen characteristics of two breeds of turkeys. *Journal of Reproduction and Fertility*;29:317–325.
143. Karnovsky M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*; 27: 137A-38A.
144. Kennedy P.L., Ward J.M., Rinker G.A., Gessaman J.A. (1994). Post-fledgling areas in northern goshawk home ranges. *Studies in Avian Biology*; 16: 73-82.
145. Kennedy P.L., Ward J.M. (2003). Effects of experimental food supplementation on movements of juvenile northern goshawks (*Accipiter gentilis atricapillus*). *Oecologia*; 134 (2): 284-291.
146. Kenward R.E., Marcstrom V, Karblom M (1993) Post-nestling behaviour in goshawks, *Accipiter gentilis*: II. sex differences in sociality and nest-switching. *Animal Behaviour* ;46: 371–378.
147. Kenward R.E., MarcstrUm V., Karlbom M. (1993a). Post-nestling behavior in goshawks, *Accipiter gentilis*:I. The causes of dispersal. *Animal Behaviour*; 46: 365-370.
148. Kenward R. (2006). *The Goshawk*. T. and A. D. Poyser, London, UK.
149. King L.M., Kirby J.D., Sonstegard T.S., Harry D.E. Darden J.R., Marini P.J., Walker R.M., Rhoads M.L., Donoghue A.M. (2000). Efficacy of sperm mobility assessment in commercial flocks and the relation ships of sperm mobility and insemination dose with fertility in turkeys. *Poultry science*; 49: 770-775
150. Kirby J. D., Froman D. P. (2000). Reproduction in male birds. In G. C. Whittow (Ed.), *Sturkie's Avian Physiology* (pp. 597e615). San Diego, CA: Academic Press.
151. Knowles-Brown A., Wishart G. J. (2001) Progeny from cryopreserved golden eagle spermatozoa. *Avian Poultry Biology Review*; 12:201–202.

152. Kopp C., Sukura A., Tuunainen E., Gustavsson I., Parvinen M., Anderson M. (2007). Multinuclear-multiflagellar sperm defect in a bull – a new sterilizing sperm defect. *Reproduction in Domestic Animals* ;42:208 –213.
153. Kowalczyk A., Łukaszewicz E., Rzońca Z. (2012) Successful preservation of capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) semen in liquid and frozen states *Theriogenology*, 77: 899-907
154. Kowalczyk A., Łukaszewicz E (2015) Simple and Effective Methods of Freezing Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) Semen. *PLoS ONE*; 10(1): e0116797. doi:10.1371/journal.pone.0116797
155. Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A. (1992). Fine structural changes in spermatozoa of the garyling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. *Aquaculture*; 103 (1):73-84.
156. Lake P.E., Smith W., Young D. (1968). The ultrastructure of the ejaculated fowl spermatozoan. *Quarterly journal of experimental physiology : an international journal of the Physiological Society*;53:356–66.
157. Lake P.E., Stewart J.M. (1978). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen-an improved method. *British poultry science*, 19: 187-194
158. Lake P.E., Ravie O., McAdam J. (1981). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programs. *British Poultry Science*, 22: 71-77
159. Lake P.E. (1986). The history and future of cryopreservation of avian germ plasm. *Poultry science*, 65: 1-15
160. Lasley B.L., Loskutoff N.M., Anderson G.B. (1994). The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in non domestic species. *Theriogenology*, 41: 119 – 132
161. Lee J.A. (1981). Habituation to human disturbance in nesting accipiters. *Journal of Raptor Research*; 15: 48-52.

162. Liem K.F., Bemis E.W., Walker F.W. Jr., Grande L. (2002). Anatomia comparata dei vertebrati- una vision funzionale ed evolutiva. EdiSES. Pp. 693-727.
163. Lindsay C., Staines H.J., McCormick P., McCullum C., Choulani F., Wishart G.J. (1999) Variability in the size of the nucleus in spermatozoa from the Houbara bustards, *Chlamydotis undulate undulate*. Journal of Reproduction and Fertility ;117:307–13.
164. Litscher E.V., Wassarman, P.M.(1996). Recombinant hamster sperm receptors that exhibit species-specific binding to sperm. Zygote 4, 229–236.
165. Long J.A., Kulkarni G. (2004). An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. Poultry science, 83: 1594-1601
166. Long J.A., Péurdy P.H., Zuidberg K., Hiemstra S.J., Velleman S.G., Woelders H. (2014). Cryopreservation of turkey semen: Effect of breeding line and freezing method on post-thaw sperm quality, fertilization, and hatching. Cryobiology, 68: 371-378
167. Łukaszewicz E., Chrzanowska M., Jerysz A., Chełmońska B. (2004). Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser* L.) gander semen. Animal Reproduction Science, 80: 163–173
168. Łukaszewicz E., Jerysz A., Partyka A., Siudzińska A. (2008). Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. Research in Veterinary Science;85:583– 588
169. Łukaszewicz E., Kowalczyk A., Rzonca Z. (2011). Succesful semen collection from Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) kept in an aviary system. Ornis Fennica, 88: 110-115
170. Luyet B.J., Gehenio P.M. (1940) Life and Death at Low Temperatures. Biodynamica, Normandy, MO, USA, 341 pp.
171. MacLeod J, Gold RZ. (1951). The male factor in fertility and infertility, IV: Sperm morphology in fertile and infertile marriage. Fertility and Sterility;2:394–414.

172. Madeddu M. (2008) a. Creazione di una banca del seme di specie selvatiche dell'avifauna sarda mediante l'utilizzo del gallo come modello sperimentale. Tesi di dottorato.
173. Madeddu M., Berlinguer F., Ledda M., Leoni G.G., Satta V., Succu S., Rotta A., Pasciu V., Zinellu A., Muzzeddu M., Carru C., Naitana S. (2008). Ejaculate collection efficiency and post-thaw semen quality in wild-caught Griffon vultures from the Sardinian population. *Reproductive Biology and Endocrinology* , 7:18. (doi:10.1186/1477-7827-7-18).
174. Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y (1984). Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preservino the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa. *British Poultry Science*; 25: 547-553
175. Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y. (1986) Studies of the factors causing abnormal acrosomes and crooked-necks in fowl spermatozoa during freezing and thawing. *British Poultry Science*; 27:695–702.
176. Malecki I.A., Cummins J.M., Martin G.B., Lindsay D.R. (1998) Effect of collection frequency on semen quality and the frequency of abnormal forms of spermatozoa in the emu. *P Aus S Anim*;22:406.
177. Malmgren L. (1997). Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*;48:523–30.
178. Maretta M. (1975) The ultrastructure of the spermatozoon of the drake. I. head. *Acta Veterinaria [Czech]*;25:47–52.
179. Margules C.R., Pressey R.L. (2000). Systematic conservation planning. *Nature*; 405 (6783): 243-53. (doi:10.1038/35012251).
180. Marquez B.J., Ogasawara F.X. (1975) Scanning electron microscope studies of turkey semen. *Poultry Science*;54:1139–43.
181. Martin T.E., Lurbiecki H., Joy J.B., Mooers A.O. (2014). Mammal and bird species held in zoos are less endemic and less threatened than their close relatives not held in zoos. *Animal Conservation*; 17: 89–96.

182. Martínez A.I. (2004) Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*;82:209–24.
183. Marzoni M., Di Cossato F., Mori B. (1992). Fecondazione artificiale, II parte: raccolta e valutazione dello sperma. *Professione Allevatore*, 5: 25- 30.
184. Marzoni M., Zanobini S., Romboli I., Gazzano A., Ducci M. (2000). Semen characteristics of pheasants during the first reproductive season. *British Poultry Science*, 41, 20– 21.
185. Marzoni, M., Schiavone, A. and Romboli, I. (2002). Effect of dietary supplementation with sunflower and linseed oils on fertility and semen quality in pheasant. *Avian Poultry Biology Review*, 12, 194– 196.
186. Marzoni M. (2008) Inseminazione Artificiale. In *Avicoltura e Coniglicoltura*. Le Point Vétérinaire Italie Editore
187. Marzoni M., Castillo A. Chiarini R. Bolognesi P.G., Romboli I. (2008) Cryopreservation of pheasant semen: effect of dilution ratio and cooling time on spermatozoa viability and mobility. *Contributo in Atti di convegno*
188. Marzoni M.; Castillo A.; Romboli I. (2012). Hatchability of pheasant eggs fertilized with cryopreserved semen from dietary manipulated males. *Avian Biology research*, 5 (3): 172-173
189. Massip A.; Leibo S.; Blesbois E. (2004) Cryobiology and the breeding of domestic animals. In: *Life in the Frozen State*; Benson, E.; Fuller, B.; Lane, N. (ed.), Taylor and Francis Group, London (GBR). Chap 12, p 371-392.
190. McAtee W. L. (1935). Preservation of species in aviaries. *Auk* 52: 128–129.
191. McFarlane R. W. (1963). The taxonomic significance of avian sperm. Pp. 91-102. In Sibley, G. C. (ed.). *Proceedings of the XIII International Ornithological Congress*. American Ornithologists' Union: Ithaca, New York.
192. McGowan J.D. (1975) Distribution, density and productivity of goshawks in interior Alaska. *Fed. Aid Wildl. Restor. Proj. Rep.* W-17-4, W17-5, W-17-6, Job 10.6 A. Alaska Dep. of Fish and Game.

193. Menkeveld R., Oettlè E.E., Kruger T.F., Swanson R.J., Acosta A.A., Oehninger S. (1991). Atlas of human sperm morphology. Baltimore: Williams and Wilkins
194. Meriggi A. (1992). Il fagiano comune. In: P. Bricchetti, P. De Franceschi & N. Baccetti (Eds) Fauna d'Italia, Vol. XXIX: Aves 1. Gaviidae-Phasianidae. Calderini Editore, Bologna. Pp 824-840.
195. Meriggi A., Pandini W., Cesaris C. (1996). Demography of the pheasant in relation to habitat characteristics in northern Italy. Journal of Wildlife Research 1: 15-23.
196. Miller S.A., Harley J.P. (2006). Zoologia - Parte sistematica. Idelson Gnocchi. Pp. 425-427
197. Mingozi T., Maffei G. (1988). Resoconto ornitologico per la Regione Piemonte-Valle'Aosta 1987. Rivista Piemontese di Storia Naturale; 9: 211-226.
198. Mitchell R.L., Buckland R.B., Kennedy B.W. (1977). Heritability of fertility of frozen and fresh chicken semen and the relationship between the fertility of frozen and fresh semen. Poultry Science, 56:1168-1177.
199. Mitchell L. G., Mutchmor J.A., Dolphin W. D. (1999). Zoologia Zanichelli. Pp. 1- 820.
200. Mocé E., Graham J.K. (2008). In vitro evaluation of sperm quality. Animal Reproduction Science;105:104 –18.
201. Moeller A.P. (1987). Copulation behaviour in the goshawk *Accipiter gentilis*. Animal Behaviour; 35 (3): 755-763. (doi:10.1016/S0003-3472(87)80112-4).
202. Morris G.J. (1981). Liposomes as model system for investigating freezing injury. In: Effects of low temperatures on biological membranes (Morris G.J. e Clarke A., Eds.), Academic Press, New York, pp. 214-262
203. Murgia C., Monni A., Marras G. (1988). Primi dati sulla riproduzione dell'Astore (*Accipiter gentilis arrigonii*) in Sardegna, con note sulla sua

distribuzione e consistenza nella provincia di Cagliari. *Rivista Italiana Ornitologia*; 58: 1-7.

204. Nagano T. (1962). Observations on the fine structure of the developing spermatid in the domestic chicken. *The Journal of Cell Biology* ;14:193–205.
205. Neumann D, Kaleta EF, Lierz M. (2013) Semen collection and artificial insemination in cocktaiels (*Nymphicus hollandicus*) – A potential model for psittacines. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*; 41:101-5
206. Newton I. (1979) *Population Ecology of Raptors*. T. & A.D. Poyser, Berkhamsted.
207. Nöthling J.O., Irons PC. (2008). A simple multidimensional system for the recording and interpretation of sperm morphology in bulls. *Theriogenology*;69:603–11.
208. O'Brien J. K., Robeck T.R. (2014). Semen characterization, seasonality of production, and in vitro sperm quality after chilled storage and cryopreservation in the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*). *Zoo Biology*; 33(2): 83-154
209. Oettlé E.E., Soley J.T. (1988) Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Revue de Médecine Vétérinaire*;59:28–70.
210. Oettlé E.E. (1993) Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*; 47:257–60.
211. Ottinger M.A., Duchala C.S., Masson M. (1983). Age-related reproductive decline in the male Japanese Quail. *Hormones and Behavior*, 17: 197-207
212. Palmer R.S. (1988). *Handbook of North American birds*. Vol. 4. Diurnal raptors (part. 1). Yale Univ. Press, New Haven, CT.
213. Parks E.P., Willard R.H., Hardaswick V. (1986). Cryopreservation of Peregrine falcon semen and post-thaw dialysis to remove glycerol. *Raptor Research*, 20: 16-20.
214. Penfold L.M., Wildt D.E., Herzog T.L., Lynch W., Ware L., Derrickson S.E., Monfort S.L. (2000). Seasonal patterns of LH, testosterone and semen

- quality in the Northern pintail duck (*Anas acuta*). *Reproduction, Fertility and Development* ;12:229 –235.
215. Penfold L.M., Harnal V., Lynch W., Bird D., Derrickson S.R., Wildt D.E. (2001). Characterization of Northern pintail (*Anas acuta*) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. *Reproduction*; 121:267-275
 216. Peraro Stefania (2014). Caratterizzazione fenotipica del *Phasianus colchicus* allevato in Veneto. Tesi di laurea
 217. Phillips D.M., Asa C.S., Stover J.(1987) Ultrastructure of spermatozoa of the white-naped crane. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*; 19:489–494.
 218. Phillips D.M., Asa C.S. (1989). Development of spermatozoa in the rhea. *The Anatomical Record*;223:276–82.
 219. Pinxten R., De Ridder E., Eens M. (2003). Female presence affects male behavior and testosterone levels in the European starling (*Sturnus vulgaris*). *Hormones and Behavior* ; 44:103-109.
 220. Piscione G. (2008) Stato di attuazione della Direttiva “Habitat” e prospettive future
 221. Polge C., S.A.U., Parkes A.S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
 222. Pukazhenthir B., Comizzoli P., Travis A.J., Wildt D. E. (2006). Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reproduction, Fertility and Development*, 18: 77-90
 223. Quinn J.P. and Burrows W.H. (1936). Artificial insemination in fowls. *Journal of Heredity*, 27, 31-37.
 224. Quinn P.J. (1985). A lipid-phase separation model of low temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*; 22 (2): 128-146.
 225. Rahbek C. (1993). Captive breeding - a useful tool in the preservation of biodiversity? *Biodiversity and Conservation* ; 2: 426-437

226. Retzius G. (1909). Die Spermien der Voegel. Biologische Untersuchungen, Neue Folge 14(10): 89-122 Taf XIX-XXXVII.
227. Retzius G. (1911). Zur Kenntniss der Spermien der Voegel. Biologische Untersuchungen, Neue Folge 16: 89-92. Taf XXVII.
228. Retzius G. (1912). Weitere Beitraege zur Kenntnis der Spermien der Gastropoden und Voegel. Biologische Untersuchungen, Neue Folge 17: 95-99 Taf XIV.
229. Reynolds R.T. (1972) Sexual dimorphism in Accipiter hawks: a new hypothesis. Condor; 74: 191–197.
230. Reynolds R.T., Wight H.M. (1978). Distribution, density, and productivity of accipiter hawks breeding in Oregon. Wilson Bulletin 90 (2): 182-196.
231. Reynolds R.T., Graham R.T., Reiser M. H., Basset R.L., Kennedy P.L., Boyce D.A., Goodwin G., Smith R., Fisher E.L. (1992). Management recommendations for the northern goshawk in the southwestern United States. U.S.D.A. For. Ser. Gen. Tech. Rep. RM-217. Rocky Mt. For and Range Exp. Stn. Fort. Collins, CO.
232. Reynolds R.T., Joy S.M., Leslie D.G. (1994). Nest productivity, fidelity, and spacing of Northern Goshawks in Arizona. Studies in Avian Biology 16:106–113
233. Rich T.D., Beardmore C.J., Berlanga H., Blancher P.J., Bradstreet M.S.W., Butcher G.S., Demarest D.W., Dunn E.H., Hunter W.C., Inigo-Elias E.E., Martell A.M., Panjabi A.O., Pashley D.N., Rosenberg K.V., Rustay C.M., Wendt J.S., Will,T.C. (2004). Partners in flight: North American landbird conservation plan. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY.
234. Roberson A.M. (2001). Evaluating and developing survey techniques using broadcast conspecific calls for northern goshawks in Minnesota. M.S. Thesis. University of Minnesota, St. Paul, MN.
235. Robertson L, Wishart GJ. (2010). Sperm Function Assessment - In Vitro Sperm-Egg Interaction Assay Utilizing Inner Perivitelline Layer from Laid

- Chicken Eggs. In Bakst MR and Long JA editors, 2nd Edition: Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage, and Fertility Determination, Buffalo, Minnesota: The Midwest Poultry Federation, p. 95-98
236. Rozenboim I., Navot A., Snapir N., Rosenstrauch A., El Halawani M.E., Gvoryahu G., Degen A. (2003) Method for collecting semen from the ostrich (*Struthio camelus*) and some of its quantitative and qualitative characteristics. *British Poultry Science*;44:607–611.
 237. Rutkowski R., Nieweglowski H., Dziedzic R., Kmiec M., Gozdziwski J. (2005). Genetic variability of Polish population of the capercailli *Tetrao urogallus*. *Acta ornithologica*, 40: 27-34
 238. Rutz C., Bijlsma R.G., Marquiss M., Kenward R.E. (2006). Population limitation in the Northern Goshawk in Europe: a review with case studies. *Studies in Avian Biology*; 31: 158–197.
 239. Rybnik P.K., Horbanczuk J.O., Lukaszewicz E., Malecki I.A. (2012). The ostrich (*Struthio camelus*) ejaculate effects of the method of collection, male age, month of the season, and daily frequency. *British Poultry science*, 53: 1, 134-140
 240. Saacke R.G., Nadir S., Nebel R.L. (1994). Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*;41:45–50.
 241. Saeki Y.(1960) Crooked-necked spermatozoa in relation to low fertility in the artificial insemination of fowl. *Poultry Science*;39: 1354–1360.
 242. Sæther B.-E. (1990). Age-specific variation in reproductive performance in birds. *Current Ornithology*; 7: 251–283.
 243. Saint Jalme M., Gaucher P., Paillat P. (1994). Artificial insemination in Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata*): influence of the number of spermatozoa and insemination frequency on fertility and ability to hatch. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118: 93-103.

244. Saint Jalme M., Lecoq R., Seigneurin F., Blesbois E., Plouzeau E. (2003). Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*; 59(3-4):875-88.
245. Saita A, Longo O.M., Tripepi S. (1983). Osservazioni comparative sulla spermiogenesi. III. Aspetti ultrastrutturali della spermiogenesis di *Jacana jacana* (Charariformes). *Accad Naz Lincei*;74:417–430.
246. Samour J.H., Smith C.A., Moore H.D., Markham J.A. (1986). Semen collection and spermatozoa characteristics in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Record*;118:397–9.
247. Samour J.H., Markham J.A., Moore H. D. M., and Watson P.F. (1988). Semen cryopreservation and artificial insemination in budgerigars (*Melopsittacus undulates*). *Journal of Zoology (London)* 216: 169-176.
248. Samour J. H. (2004). Semen collection, spermatozoa cryopreservation, and artificial insemination in nondomestic birds. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 18 (4): 219-223
249. Santiago-Moreno J.; Castano C., Toledano-Diaz A., Coloma M.A., Lopez-sebastian A., Prieto M.T., Campo J.L. (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry science*, 90: 2047-2053
250. Saunders L.B. (1982). Essential nesting habitat of the Goshawk (*Accipiter gentilis*) on the Shasta-Trinity National Forest, Mccloud District. M.S. thesis, California State Univ., Chico.
251. Sauver Bernard (1988). Reproduction des volailles et production d'œufs. INRA

252. Schenk H. (1976). Analisi della situazione faunistica in Sardegna. Uccelli e Mammiferi. In: SOS Fauna, animali in pericolo in Italia, Savini, Mercuri, Camerino. Pp. 465-556.
253. Scheres G. (1998). Breeding success with the Siberian Crane in Europe. *European Association of Zoos and Aquaria News*, 24: 21.

254. Seigneurin F., Blesbois E. (1995). Effects of freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology*, 43: 1351-1358
255. Sexton T.J., Gee G.F. (1978). A comparative study on the cryogenic preservation of semen from the Sandhill crane and the domestic fowl. *Symposia of the Zoological Society of London*, 43: 83-95.
256. Shaffner C.S., Henderson E.W., Card C.G. (1941) Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. *Poultry Science*, 20: 259-265.
257. Simoes K., Orsi A.M., Artoni S.M.B. (2012). Ultrastructure of the spermatozoa of the domestic duck (*Anas platyrhynchos* sp.). *Anatomia Histologia Embryologia*, 41: 202-208
258. Snyder L.L. (1948). Additional instances of paired ovaries in raptorial birds. *Auk* 65:602.
259. Snyder N. F. R., Derrickson S. R.; Beissinger, J. W., Wiley T. B., Smith W. D., Toone B. Miller. (1996). Limitations of captive breeding in endangered species recovery. *Conservation Biology* 10:338–348.
260. Soley J.T. (1993). Ultrastructure of ostrich (*Struthio camelus*) spermatozoa. I. Transmission electron microscopy. *Onderspoort Journal of Veterinary Research*; 60: 119-130.
261. Solomon S. E., (1983). Oviduct. in: *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, Volume 4, BM Freeman (ed.). Academic Press, London, UK. Pages 379-419.
262. Sontakke S.D., Umapathy G., Sivaram V., Kholkute S.D., Shivaji S. (2004) Semen characteristics, cryopreservation, and successfull artificial insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology*; 62 (1-2): 139-153
263. Soulè M. E. (1991). Conservation: tactics for a costant crisis. *Science*; 253: 744-750.

264. Spagnesi M, Serra L. (a cura di), (2004). Uccelli d'Italia. Quad. Cons. Natura, 21, Min. Ambiente. Ist. Nazionale Fauna Selvatica.
265. Speiser R., Bosakowski T. (1991). Nesting phenology, site fidelity, and defense behavior of northern goshawks in New York and New Jersey. *Journal of Raptor Research*; 25: 132-135.
266. Spiller N., Grahame I., Wise D.R. (1976). Experiments on the artificial insemination of pheasants at Daws Hall Wildfowl Farm. *World Pheasant Assoc* 1976/1977, 2: 89-96.
267. Squires J.R., Ruggiero L.F. (1995). Winter movements of adult northern goshawks that nested in south central Wyoming. *Journal of Raptor Research*; 29 (1): 5-9.
268. Squires J.R., Reynolds R.T. (1997). Northern Goshawk, No. 298 in *Birds of North America series*, c/o Academy of Natural Sciences, 1900 Benjamin Franklin Parkway, Philadelphia, PA. Pp. 1-31.
269. Stelzer G., Crosta L., Bu'rkle M., Krautwald-Junghanns M-E. (2005). Attempted semen collection using the massage technique and semen analysis in various psittacine species. *Journal of Avian Medicine and Surgery*; 19:7-13.
270. Stewart S.G., Bausek N., Wohlrab F., Wolfgang J. Schneider W.J., A. Janet Horrocks A. J., Wishart G.J. (2004). Species specificity in avian sperm: perivitelline interaction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*; 137: 657-663
271. Strix (2012). Developing and testing the methodology for assessing and mapping the sensitivity of migratory birds to wind energy development. BirdLife International, Cambridge.
272. Stunden C.E., Bluhm C.K., Cheng K.M., Rajamanhendran R. (1998). Plasma testosterone profiles, semen characteristics, and artificial insemination in yearling and adult captive mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Poultry Science*, 77: 882-887.

273. Suh A., Paus M., Kiefmann M., Churakov G., Franke F.A., Brosius J.,Kriegs J.O., Schmitz J. (2011). Mesozoic retroposons reveal parrots as the closest living relatives of passerine birds. *Nature communications*, 2: 443
274. Surai P., Wishart G.J. (1996) Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. *World's Poultry Science Journal* 52: 27-43.
275. Sutton G. M. (1925). Notes on the nesting of the goshawk in Potter County, Pennsylvania. *Wilson Bulletin*; 37: 193-199.
276. Swofford, D. L. 2001. *Phylogenetic analysis using parsimony*, version 4.0, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
277. Tabatabaei S., Batavani R.A., Talebi A.R. (2009) Comparison of semen quality in indigenous and Ross broiler breeder roosters. *Journal of Animal and Veterinary Advances*;8:90 –93
278. Tajima A. (2013). Conservation of avian genetic resources. *Journal Poultry Science*; 50: 1-8
279. Tella J. L., Manosa S. (1993) - Eagle owl predation on Egyptian vulture and northern goshawk: possible effect of a decrease in European rabbit availability. *Journal of Raptor Research*, 27: 111-112.
280. Temple S.A. (1972) Artificial insemination with imprinted birds of prey. *Nature (London)*, 237: 287
281. Thurston R.J., Hess R.A., Hughes B.L., Froman D.P. (1982). Ultrastructure of the guinea fowl (*Numidia meleagris*) spermatozoan. *Poultry Science*;61: 1738–1743.
282. Thurston R.J., Hess B.L. (1987). Ultrastructure of spermatozoa from domesticated birds: comparative study of turkey, chicken, and guinea fowl. *Scanning Microsc.* 1, 1829-1838.
283. Tornberg, R. (2001). Pattern of Goshawk *Accipiter gentilis* predation on four forest grouse species in northern Finland. *Wildlife Biology*; 7: 245–256.

284. Totrupp Nielsen J., Drachmann J. (2003). Age-dependent reproductive performance in Northern Goshawks *Accipiter gentilis*. *Ibis* , 145: 1–8.
285. Tselutin K., Seigneurin F. Blesbois, E. (1999) Comparison of cryoprotectants and method of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*, 78, 586–590
286. U.S. Fish and Wildlife Service. (1998). Endangered and threatened wildlife and plants; Notice of 12-month finding on a petition to list the northern goshawk in the contiguous United States west of the 100th meridian. *Federal Register* 63:35183-35184.
287. Umapathy G, Sontakke S, Reddy A, Ahmed S, Shivaji S. (2005) Semen characteristics of the captive Indian white-backed vulture. *Biology of Reproduction*;73:1039–45.
288. Varadi E., Vegi B., Liptoi K., Barna J. (2013). Methods for cryopreservation of Guinea Fowl sperm. *Plos one*, 8 (4): e62759
289. Venditti G. (2007). Class Italy Associazione Culturale di informazione e ricerca sul territorio e l'ambiente.1:2
290. Wagley L. (1980). SEM of peregrine spermatozoa. Western Release Program - 1980. In T. J. Cade and P. R. Dague (eds). *The Peregrine Fund Newsletter*. No. 8, Fall 1980: 4.
291. Waldoch J, Root T, Ramer J, Proudfoot J. (2007) Semen collection and characterization in rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome chrysocome*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*; 38: 13-7
292. Waldoch J., Root T., Dubach J.M., Proudfoot J., Ramer J. (2011). Semen collection and artificial insemination in rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome chrysocome*). *Zoo Biology* 30: 1-15
293. Ward J.M., Kennedy P.L. (1996). Effects of supplemental food on size and survival of juvenile northern goshawks. *Auk*; 113 (1): 200-208.

294. Weaver J.D. (1985). Artificial insemination. In Falcon propagation: A manual on Captive Breeding. Eds Weaver, J.D. and Cade, T.J. The Peregrine Fund, Inc. Ithaca, New York, Boise, Idaho, and Santa Cruz, California. p. 19
295. Wentworth B.C., Mellen W.J. (1963). Egg production and fertility following various methods of insemination in Japanese quail (*Coturnix coturnix Japonica*). Journal of reproduction and fertility, 8: 215-220.
296. Woodbridge B., Detrich P.J. (1994). Territory occupancy and habitat patch size of northern goshawks in the southern Cascades of California. Studies in Avian Biology; 16: 83-87.
297. Wunderle J.M. Jr. (1991). Age-specific foraging proficiency in birds. Current Ornithology; 8: 273–324.
298. Würfels M. (1999). Ergebnisse weiterer Beobachtungen zur Populationsentwicklung des Habichts (*Accipiter gentilis*) im Stadtgebiet von Köln 1993–1998 und zur Rolle der Elster (*Pica pica*) im Nahrungsspektrum des Habichts. Charadrius; 35: 20–32.
299. Yao Z., Crim L.W., Richardson G.F., Emerson C.J. (2000). Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. Aquaculture; 181 (3-4): 361-375
300. Zachel C.R. (1985). Food habits, hunting activity, and post fledgling behavior of northern goshawk in high elevation aspen forest of northern Nevada. Studies in Avian Biology; 16: 119-121
301. Zamboni Z. (1992) Sperm structure and its relevance to infertility: an electron microscopic study. Archives of Pathology & Laboratory Medicine ; 116: 325-344
302. Zaniboni L., Cerolini S., (2008). L'apparato riproduttore maschile. In: Avicoltura e Coniglicoltura. Editors Cerolini S., Marzoni M., Romboli I., Schiavone A., Zaniboni L, Le Point Veterinaire Italie, Milano: 93-105.
303. Zini A., Phillips A., Courchesne A., Boman J.M., Baazeem A., Bissonnette F., Kadoch I.J., San Gabriel M. (2009). Sperm head morphology is related to

high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility* ; 91:2495–500.

- 304. Zirrer F. (1947). The goshawk. *Passenger Pigeon*; 9 (3): 79-94
- 305. Zuleta M., Koefoed-Johnsen H.H., Bresciani J. (1978). The Dag defect of the tail of the bull spermatozoon. Observations with the scanning electron microscope. *Copenhagen: Yearbook Royal Vet Agric Univ*, pp. 21–26.

Ringraziamenti

Le origini di questa ricerca risalgono a diversi anni fa; il progetto, infatti, si è avviato, in collaborazione con Enzo e Daniele Arcioni, ancora prima che io discutessi la tesi di laurea specialistica in Scienze Biologiche redatta sotto la guida della professoressa Anna Maria Fausto. È a lei che devo la possibilità di questo percorso che mi ha portato ad approfondire quanto nella mia tesi era ancora *in nuce*. Ed è a lei che va il mio primo ringraziamento. Vorrei ringraziare, inoltre, la professoressa Margherita Marzoni dell'Università di Scienze Veterinarie di Pisa per la collaborazione e la fiducia che mi ha dimostrato in questi anni, la professoressa Ewa Łukaszewicz dell'Institute of Animal Breeding, University of Environmental and Life Science –Wrocław per avermi permesso di arricchire la metodologia della ricerca, e le dottoresse Anna Rita Taddei e Maria Cristina Belardinelli per la loro professionalità e Enzo e Daniele Arcioni per aver lavorato con me.

Le ultime parole, ma non per questo meno importanti, sono per mio padre che mi sostiene con amore, e per la zia Marcella e per le amiche - Catuscia, le Elise, Liana, Stefania e Valentina - che mi sono accanto.