UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

Tesi di Laurea

Analisi del seme e valutazione morfometrica degli spermatozoi di falco ibrido (*Falco rusticolus* x *Falco cherrug*) e Falco pellegrino (*Falco peregrinus*). Studio preliminare.

Relatore

Prof. Antonio Mollo

Correlatore

Dott. Marco Martini

Laureanda

Miranda Govoni

Matricola n. 1089423

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

A Yuri

RIASSUNTO

L'inseminazione artificiale e la crioconservazione giocano un ruolo importante nella propagazione di specie di uccelli minacciate. Ma lo sviluppo di tali tecniche sui rapaci prevede prima un'attenta valutazione delle caratteristiche spermatiche, che permette di stimare la potenziale fertilità e congelabilità del seme. L'obbiettivo del presente studio è stato quello di proporre un metodo di analisi semplice per la valutazione delle caratteristiche seminali nei falchi, e di verificare l'efficacia di un *extender* contenente Tris nel mantenere la funzione spermatica durante lo stoccaggio a temperatura ambiente. Gli eiaculati sono stati raccolti da un Falco pellegrino (*F. peregrinus*) e da falco ibrido (*F. rusticolus* x *F. cherrug*) mediante massaggio addominale. Dopo la raccolta sono stati valutati diversi parametri e sono stati confrontati i dati relativi ai due donatori. Nessuna differenza è stata riscontrata tra le due specie in termini di volume e colore del seme. Ma i risultati hanno rivelato una differenza significativa ($p \leq 0{,}001$) nella concentrazione spermatica e nel numero totale di spermatozoi, con valori più elevati nell'ibrido. Mentre il Pellegrino ha presentato un valore maggiore di pH ($p < 0.001$). Motilità totale e progressiva sono state valutate, sul seme fresco e diluito, immediatamente dopo la raccolta (T0) e dopo 20 (T20) e 40 (T40) minuti. Confrontando i due donatori è stata riscontrata una differenza legata alla specie, con il Pellegrino che ha mostrato una maggiore motilità totale e progressiva ($p < 0{,}001$). Tuttavia, entro la stessa specie, la diluizione con l'*extender* Tris non ha comportato nessuna differenza nei parametri di motilità, rispetto al seme non diluito, durante lo stoccaggio. L'*extender* Tris non ha provocato alcuna differenza anche nella percentuale di spermatozoi vitali, rispetto al seme non diluito, in entrambi i donatori. Ciò suggerisce che potrebbe rappresentare un buon diluitore per lo stoccaggio del seme a breve termine e potenzialmente anche a lungo termine. Utilizzando la colorazione Rosa Bengala è stato possibile evidenziare la morfologia e le anomalie degli spermatozoi. Tra i due donatori non è stata trovata alcuna differenza nella percentuale di anomalie spermatiche, tranne che per la percentuale di teste amorfe ($p = 0{,}001$) e teste piegate ($p = 0{,}015$), dove il Pellegrino ha mostrato valori più elevati. Grazie alla medesima colorazione e all'impiego di ImageJ è stato possibile eseguire un'attenta indagine morfometrica e ricavare diversi parametri dimensionali relativi alla testa e alla coda degli spermatozoi. Tale semplice metodica si può adattare anche ad altre specie in cui la morfologia spermatica si presenta molto diversa. La grande variabilità nelle caratteristiche spermatiche può influenzare lo sviluppo e l'efficacia dello stoccaggio a breve termine e della crioconservazione del seme di falco. Per tale motivo diventa importante trovare nuovi strumenti per eseguire l'analisi del seme in modo efficiente anche sul campo.

ABSTRACT

Artificial insemination and semen cryopreservation play an important role on threatened bird species propagation. However the development of these thecniques on raptors first needs of an accurate evaluation of semen characterisctics, which allows to estimate the potential fertility and freezabiliy of the semen. The aim of this study was to suggest a simple analysis method to evaluate sperm characteristics in falcons and to verify the efficacy of a Tris-based extender in mantaining sperm function during short-term storage at room temperature. Ejaculates from a Peregrine falcon (*F. peregrinus*) and a hybrid falcon (*F. rusticolus x F. cherrug*) were collected by abdominal massage. After sampling several parameters were evaluated and data concerning the two donors were compared. No difference has been found between the two species in terms of semen volume and semen color. But results revealed a significant difference ($p \leq 0{,}001$) in terms of sperm concentration and total number of spermatozoa, with higher values in the hybrid falcon. The Peregrine falcon, on the other hand, presents greater value of pH ($p < 0.001$). Total and progressive motility was evaluated on fresh and diluted semen immediately after collection (T0) and after 20 (T20) and 40 (T40) minutes. By comparing the two semen donors, a species-linked difference has been found, with the Peregrine falcon showing higher values of total motility and progressive motility ($p < 0{,}001$). However, among the same species, the dilution with Tris extender did not involve any difference in motility parameters during the storage compared to fresh semen. Tris extender did not cause any difference also in percentage of vital spermatozoa compared to fresh undiluted semen in both semen donors. This suggests that it could become a good extender for short-time semen storage, but potentially also for long-term storage. Using Rose Bengal staining it was possible to highlight spermatozoa morphology and abnormalities. No difference has been found in percentage of sperm abnormalities between semen donors, except for percentage of amorphous heads ($p = 0{,}001$) and bent heads ($p = 0{,}015$), where the Peregrine falcon has shown higher values. Thanks to the same staining technique and the use of ImageJ it was feasible to performe an accurate morphometric study and obtain several dimensional parameters concerning the head and tail of spermatozoa. This simple method can also be applied to other species in which sperm morphology looks very different. The great variability in sperm traits can affect the development and the efficacy of short-term storage and cryopreservetion of falcon semen. This is why it may be important to find new tools in order to perform sperm analysis in a more efficient way in the field.

INDICE

1. INTRODUZIONE....1
1.1 Importanza della valutazione e conservazione del seme negli uccelli....1
1.1.1 Ruolo nella conservazione delle specie in pericolo....3
1.1.2 Falconeria....7
1.2 I rapaci: cenni di sistematica e anatomia....9
1.2.1 Falco pellegrino (*Falco peregrinus*)....14
1.2.2 Ibridi....18

2. APPARATO RIPRODUTTORE MASCHILE....24
2.1 Anatomia e fisiologia....24
2.2 Fattori che influenzano la riproduzione negli uccelli....32
2.3 Caratteristiche degli spermatozoi degli uccelli....36

3. RACCOLTA DEL SEME....40
3.1 Metodo cooperativo....41
3.2 Tecnica del massaggio....43
3.3 Elettroeiaculazione....48

4. VALUTAZIONE DELL'EIACULATO....50
4.1 Volume....52
4.2 Colore....55
4.3 Contaminazione....56
4.4 pH....58
4.5 Concentrazione....59
4.6 Motilità....62
4.7 Vitalità....65
4.8 Morfologia e valutazione morfometrica....68

5. INSEMNAZIONE ARTIFICIALE....74
5.1 Ruolo dell'inseminazione artificiale negli uccelli selvatici....74
5.2 *Handling* dell'animale durante la procedura di IA....75
5.3 Caratteristiche riproduttive femminili di interesse....76
5.4 Inseminazione con seme fresco....78
5.5 Diluizione e conservazione del seme....81
5.6 Principali *extenders* usati negli uccelli....82

5.7 Crioconservazione.....84

6. SCOPO DELLA TESI.....91

7. MATERIALI E METODI.....92
7.1 Animali inclusi nello studio.....92
7.2 Raccolta del seme.....93
7.3 Valutazione campione di seme.....96
7.3.1 Volume.....96
7.3.2 Colore e pH.....97
7.3.3 Concentrazione.....99
7.3.4 Motilità.....103
7.3.5 Vitalità.....105
7.3.6 Morfologia e morfometria.....107
7.3.7 Analisi dei dati.....112

8. RISULTATI.....113
8.1 Raccolta del seme.....113
8.2 Volume.....113
8.3 Colore, contaminazione e pH.....113
8.4 Concentrazione.....116
8.5 Motilità.....116
8.6 Vitalità.....119
8.7 Anomalie morfologiche.....121
8.8 Indagine morfometrica.....124

9. DISCUSSIONE.....126

10. CONCLUSIONI.....137

11. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....139

12. SITOGRAFIA.....160

13. RINGRAZIAMENTI.....161

1. INTRODUZIONE

1.1 Importanza della valutazione e conservazione del seme negli uccelli

La conoscenza delle caratteristiche spermatiche di una specie assume una importanza fondamentale per comprenderne la biologia riproduttiva. La sua utilità si manifesta anche nella pianificazione delle inseminazioni artificiali nell'ambito dei programmi di riproduzione assistita (Dogliero *et al*., 2016) sia nelle specie domestiche che selvatiche.

"Le tecnologie di riproduzione assistita come l'inseminazione artificiale e la crioconservazione del seme giocano un ruolo importante nel preservare e trasmettere geni preziosi […] e così essere di supporto nella conservazione e propagazione di specie a rischio di estinzione" (Sontakke *et al*., 2004). Esse, infatti, potenzialmente permettono di custodire la diversità genetica di una popolazione nel tempo (Ballou, 1984), oltre l'aspettativa di vita del singolo esemplare.

Queste tecniche hanno trovato applicazione prima nei mammiferi, poi negli uccelli, a cominciare dalla raccolta del seme (Burrows and Quinn,1935) e dalla inseminazione artificiale (Quinn and Burrows, 1936). Sono utilizzate soprattutto nel settore avicolo industriale, in particolare nel tacchino (*Meleagris gallopavo*) (Donoghue and Wishart, 2000), ma anche nel pollo (*Gallus gallus domesticus*) (Donoghue, 1999) e nell'anatra (Penfold *et al*., 2001). Benché esistano esempi dell'impiego di queste metodiche anche negli uccelli selvatici, le informazioni riguardo l'utilizzo e l'efficacia delle stesse in tali specie sono ancora poche, soprattutto per quanto riguarda la crioconservazione (Sexton and Gee, 1978; Blanco *et al*., 2000).

"Il successo dell'applicazione di tali tecniche necessita prima della conoscenza della fisiologia spermatica, l'identificazione di un *extender* adatto, di un idoneo crioprotettore e lo sviluppo di un programma di congelamento per la crioconservazione del seme." (Sontakke *et al*., 2004).

La valutazione della qualità spermatica diventa fondamentale dal momento che numerosi fattori possono portare ad alterazioni di diversi parametri. Infatti "uno scadente *management* dell'animale, carenze nutrizionali e patologie associate contribuiscono comunemente ad una scarsa qualità spermatica" (Blanco *et al*., 2009), la quale condiziona la fertilità del seme e la possibilità di conservarlo nel breve o lungo periodo.

Inoltre, "la fertilità degli spermatozoi e la loro risposta a determinate tecniche di riproduzione assistita, come […] il processo di congelamento-scongelamento, possono essere fortemente influenzate dalle loro caratteristiche morfologiche e morfometriche" (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017), come è stato visto per toro (Sekoni and Gustafsson, 1987; Ostermeier *et al*., 2001), stallone (Ball and Mohammed, 1995), capra (Gravance *et al*., 1995), verro (Hirai *et al*., 2001; Peña *et al*., 2005) cervo (Esteso *et al*., 2003), fagiano (Immler *et al*., 2007), passeriformi (Lüpold *et al*., 2009) e rapaci (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). In più, si possono verificare alterazioni morfometriche a seguito del congelamento, che possono influire sulla qualità e fertilità del seme (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017).
Anche la motilità è un parametro da prendere in considerazione, dal momento che sembra essere positivamente correlata alla fertilità nel pollo domestico (Blesbois *et al*., 2008), e presumibilmente anche negli uccelli non domestici.

Quindi la valutazione della qualità spermatica sul seme fresco può essere utile per predire quale sarà la capacità di fecondazione dello stesso, e per definire la presenza di eventuali alterazioni intercorse durante il processo di congelamento e scongelamento. Tale valutazione, infatti, accompagna lo sviluppo delle tecnologie di riproduzione assistita, per l'applicazione delle quali è crescente l'interesse anche nelle specie selvatiche. Tuttavia, negli uccelli, l'analisi spermatica risulta essere meno agevole che in altre specie di interesse zootecnico: generalmente il volume e la concentrazione sono esigui, con variabilità di specie e individuali, e la qualità scarsa, con frequente contaminazione da urati (Blanco *et al*., 2009). Inoltre lo stress, cui possono essere sottoposti gli uccelli selvatici durante le manipolazioni, influisce negativamente sulla qualità del seme e, di conseguenza, sullo sviluppo della riproduzione assistita (Gee *et al*., 2004; Blanco *et al*., 2009).
Nonostante i diversi fattori che possono rendere complicata l'applicazione delle tecniche di riproduzione artificiale nei volatili, sono numerosi gli sforzi messi in atto per adattare le tecniche di raccolta del seme, di valutazione della qualità spermatica, inseminazione artificiale e crioconservazione alle diverse specie di uccelli non domestici. Tutto questo diviene di vitale importanza quando ad essere coinvolte sono specie minacciate. Infatti l'IA e la crioconservazione permetterebbero di ottenere progenie là dove l'accoppiamento naturale non sarebbe possibile a causa, ad esempio, di incompatibilità tra i partner, aggressività, mancanza di libido o inabilità fisica all'accoppiamento (Blanco *et al*., 2009). Garantirebbe, inoltre, di limitare il fenomeno

dell'*inbreeding*, che ha come conseguenze la compromissione della diversità genetica e della *fitness* riproduttiva di una popolazione (Ballou, 1984).

1.1.1 Ruolo nella conservazione delle specie in pericolo

È ormai assodato che la biodiversità sia in costante declino. Le attività umane stanno portando all'inesorabile scomparsa delle specie viventi e dei loro habitat ad un ritmo così elevato da non permettere l'evoluzione di nuove specie in un tempo sufficiente a colmare le costanti perdite.
Infatti, è stato stimato che oggi le specie stiano scomparendo ad un ritmo da 100 a 10.000 volte superiore al naturale tasso di estinzione (BirdLife International, 2018).
La *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2019), nata nel 1948, ha come obbiettivi principali la salvaguardia di tutte le specie animali e vegetali, la protezione dell'habitat nel quale tali specie vivono e la stima dell'impatto delle attività umane sulla natura. Con lo scopo di monitorare lo stato di conservazione della flora e della fauna mondiale, nel 1964 viene creata la *IUCN Red List of Threatened Species*™, che da allora rappresenta la più vasta raccolta di dati riguardo il rischio di estinzione delle specie a livello globale (https://www.iucn.org, 2019). Essa rappresenta, quindi, uno strumento indispensabile al fine di guidare tutte le azioni di conservazione della biodiversità.
Nella Red List tutte le specie viventi conosciute vengono divise in otto categorie in base al loro stato di conservazione (Figura 1.1). Più di 27.000 specie sono attualmente minacciate di estinzione, di queste il 13% sono uccelli (https://www.iucnredlist.org/, 2019).

Il compito di valutare lo stato di conservazione dell'avifauna mondiale è stato assegnato alla *BirdLife International*, che rappresenta la *Red List Authority* ufficiale per gli uccelli.
Negli ultimi trent'anni il 40% delle popolazioni di uccelli ha registrato un costante calo, e sempre più specie si avvicinano al rischio di estinzione. (BirdLife International, 2018). Ciò è dovuto frequentemente all'impatto delle attività umane come l'espansione dell'agricoltura, il disboscamento, lo sfruttamento eccessivo delle risorse, l'urbanizzazione, la caccia e il bracconaggio, l'inquinamento (chimico, acustico, luminoso, ma anche genetico) e l'introduzione di specie aliene (BirdLife International, 2018).

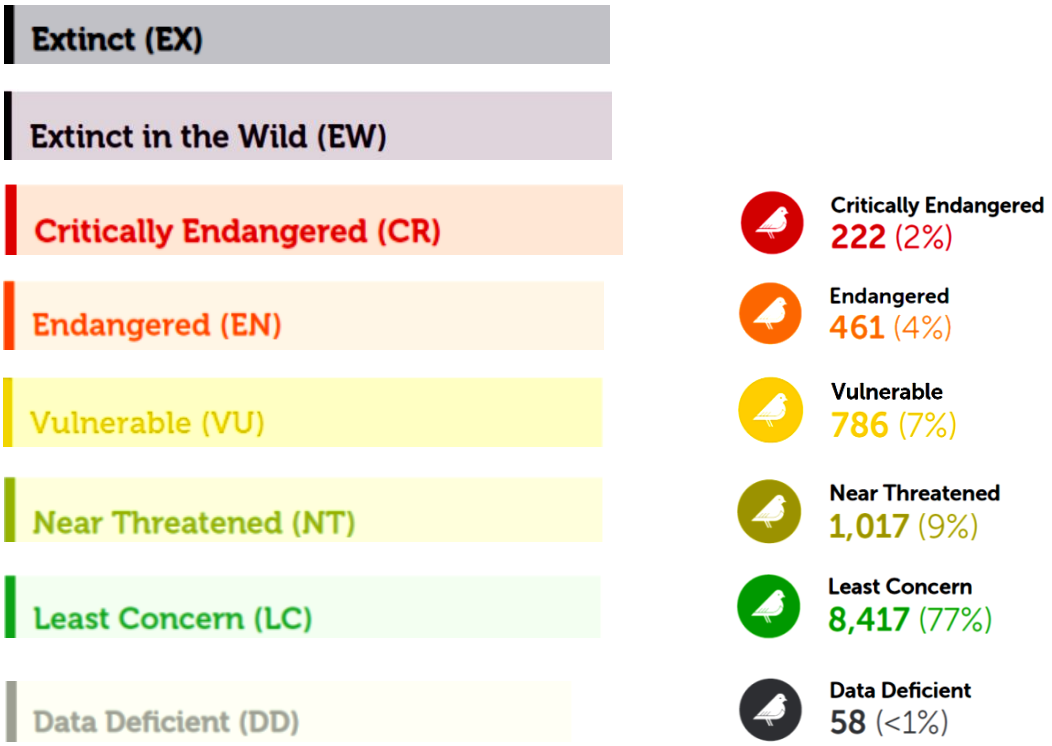


Figura 1.1: Elenco delle otto categorie IUCN, nelle quali tutte le specie vengono suddivise in base al loro stato di conservazione, e numero di specie di uccelli assegnate per ogni categoria. Adattamento dello schema fornito dalla BirdLife International (2018).

Nel 2018 la BirdLife International ha stimato che 1.469 specie di uccelli (una su otto) sono minacciate. Di queste, più di 683 specie sono state classificate come in via di estinzione ("*Endangered"*) o a rischio critico di estinzione ("*Critically endangered"*).

In Europa è stato stimato che il 13% delle specie di uccelli (67 specie) risultano minacciate, di queste il 2% (10 specie) risulta "*Critically Endangered*", il 3-4% (18 specie) come "*Endangered*", e il 7% (39 specie) come "*Vulnerable*" (BirdLife International, 2015; BirdLife International, 2018).

A livello globale alcuni gruppi sembrano essere particolarmente colpiti e presentano una maggiore percentuale di specie in pericolo, ne sono un esempio le gru (*Gruidae* 73%), avvoltoi (*Accipitridae*, sottofamiglia: *Aegypiinae* 68%), albatros (*Diomedeidae* 68%) e pappagalli (*Psittaciformes* 29%) (BirdLife International, 2018).

Si è assistito anche al declino delle popolazioni di rapaci in tutti i continenti. L'ordine dei *Falconiformes* annovera 307 specie, di cui il 10% rientra nella lista degli uccelli minacciati (Blanco *et al*., 2002b). Tra queste 18 specie appartenenti alla famiglia *Falconidae* sono ancora annoverate nella Red List della IUCN come a rischio di estinzione (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017).

Fattori come la perdita dell'habitat, il bracconaggio, la carenza di risorse alimentari o la contaminazione di queste da parte del DDT, hanno messo in serio pericolo numerose specie all'apice della catena trofica.

Una specie in particolare però, dopo aver subito un calo allarmante, è divenuta il simbolo dell'efficacia degli sforzi messi in atto per recuperarla: il Falco pellegrino (*Falco peregrinus*).

In risposta al rapido declino del Falco pellegrino dai siti di riproduzione nel Nord America, tra gli anni '50 e '60 nacquero diversi progetti di riproduzione artificiale di tale specie (Enderson *et al*., 1998). Tra questi i più importanti furono quelli sostenuti dalla *The Peregrine Fund* della Cornell University, la *U.S. Fish and Wildlife Service's program* nel Maryland, la *Canadian Wildlife Service's facility* in Alberta, la *Saskatchewan Co-operative Falcon Project* dell'Università di Saskatchewan, la *Macdonald Raptor Research Centre* alla McGill University (Platt *et al*., 2007) e la *The Raptor Research Foundation*, nata del 1966 (Platt *et al*., 2007). Lo scopo era quello di restaurare le popolazioni nord-americane di Falco pellegrino mediante piani di rilascio di esemplari nati in cattività. Negli anni '70, grazie al perfezionamento delle tecniche di inseminazione artificiale ed incubazione, è stato possibile rilasciare centinaia di falchi, per un totale di più di 6000 esemplari tra il 1974 e il 1994 (Enderson *et al*., 1998).

Nello stesso periodo anche in Europa nacquero associazioni (come la *Hawk Trust* nel Regno Unito) o gruppi di falconieri con l'interesse di riprodurre questa ed altre specie per la falconeria, ma anche con lo scopo di conservare le popolazioni locali (Platt *et al*., 2007).

Grazie al grande successo dei pionieristici progetti di reintroduzione del Falco pellegrino fu possibile dedicarsi anche ad altre specie. Programmi di riproduzione in cattività sono stati attuati per la salvaguardia di rapaci come Condor californiano (*Gymnogyps californianus*) e Aquila di mare a testa bianca (*Haliaeetus leucocephalus*) negli Stati Uniti, Nibbio reale (*Milvus milvus*) in Gran Bretagna, Aquila di mare coda bianca (*Haliaeetus albicilla*) in Scozia, Gipeto (*Gypaetus barbatus*), Barbagianni (*Tyto alba*) e Gufo reale (*Bubo bubo*) in Europa, Griffone (*Gyps fulvus*), Poiana di Harris (*Parabuteo unicinctus*), Gheppio di Mauritius (*Falco punctatus*), Falco Aplomado (*F. femoralis*) e Lanario (*F. biarmicus*) (Platt *et al*., 2007).

La riproduzione in cattività diventa, quindi, fondamentale nel preservare specie in pericolo (Mace, 1989) e garantisce un mezzo per sfruttare il valore genetico di esemplari selvatici che in natura non avrebbero modo di riprodursi. È il caso dei rapaci

in riabilitazione o degli esemplari che hanno subito danni tali da rendere impossibile il loro rilascio, in cui però la capacità riproduttiva non è compromessa (Ballou, 1984; Blanco *et al*., 2002b). A seguito di uno specifico *training*, infatti, possono essere facilmente utilizzati come donatori di materiale seminale, sfruttando al massimo il loro ruolo nel mantenimento della biodiversità. Questo diventa estremamente vantaggioso soprattutto quando si lavora con popolazioni di piccole dimensioni, in cui il rischio di *inbreeding* è elevato. Infatti, il principale obbiettivo della riproduzione artificiale, in questi casi, è introdurre nella popolazione geni di individui non imparentati tra di loro, al fine di garantire un maggiore grado di eterozigosi e, quindi, di variabilità genetica (Mace, 1989). È quest'ultima che fornisce una maggiore adattabilità e, di conseguenza, un vantaggio evolutivo, che diviene ancora più importante nel momento in cui una specie viene reintrodotta in natura (Ballou, 1984).

Grazie ad azioni di conservazione mirate è stato possibile recuperare specie sull'orlo dell'estinzione, come è avvenuto per la Colomba rosata (*Nesoenas mayeri*), il Condor Californiano (*Gymnogyps californianus*), e l'Ibis crestato (*Nipponia nippon*) (BirdLife International, 2018). "In alcuni casi la riproduzione in cattività rimane l'unica alternativa per conservare specie in via d'estinzione, che non hanno l'opportunità immediata di sopravvivere in natura" (Sontakke *et al*., 2004). È per tale motivo che si rende necessario investire nel progresso della riproduzione artificiale e nella conservazione del materiale genetico in tali specie.

Tuttavia, l'efficacia della riproduzione artificiale e della reintroduzione, e la corretta gestione di popolazioni instabili (Mace, 1989) non sono le uniche sfide. Il ripristino, il monitoraggio e la protezione dell'habitat e delle risorse alimentari diventano essenziali per il successo dei piani di reintroduzione di esemplari nati in cattività. A ciò si aggiunge la necessità di attuare un controllo delle specie invasive e di frenare il commercio di specie selvatiche. Per quest'ultimo scopo è nata la "*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*" (CITES), che ha il ruolo fondamentale di regolare tale mercato. Attualmente 155 specie di uccelli sono inserite in Appendice I della convenzione, che ne proibisce il commercio; mentre 1.278 specie ricadono in Appendice II, permettendo così il loro commercio solo in determinate circostanze (https://www.cites.org/eng/disc/species.php, 2019; BirdLife International, 2018).

Tutto ciò, però, sarebbe vano senza l'educazione delle popolazioni e delle nuove generazioni e senza il sostegno di normative a salvaguardia delle specie in pericolo (BirdLife International, 2018).

1.1.2 Falconeria

La falconeria rappresenta uno dei più antichi metodi di caccia (riconosciuta dall'UNESCO come patrimonio culturale dell'umanità), in cui uomo e animale stringono un forte legame (Ávalos, 2013), possibile solo grazie alla profonda conoscenza della biologia ed etologia dei rapaci. Ciò permette l'instaurazione di una relazione mutualistica tra falco e falconiere. Infatti, in tale interazione, anche il falco ne risulta avvantaggiato, ottenendo protezione, cibo e cure. Il falconiere deve, quindi, garantire il benessere e la salute dell'animale per massimizzarne le performance (https://iaf.org/a-history-of-falconry, 2019).

Questa tecnica di caccia ha origini antichissime e abbraccia più di 4.000 anni di storia (Muller, 2009a). L'esatto periodo e luogo di origine della falconeria è ancora dibattuto, ma alcune evidenze sembrano collocarla in Asia e Medio-oriente (culla delle civiltà mesopotamiche) 2.000 anni prima di Cristo, per poi diffondersi a Grecia, Italia e resto d'Europa (Pollock *et al*., 2016).

Fonti manoscritte riguardanti la caccia con il falco si ritrovano nelle opere di Marziale (primo secolo d.C.) e Abu Du'ad Al'Lyadi (480-550 d.C.), a testimonianza dell'importanza che tale arte venatoria rivestì nelle diverse epoche, tanto da rientrare anche nella "*Lex Baiuwariorum*" con il capitolo "*De accipitribus*" (635 d.C.) (Muller, 2009a).

La falconeria si è sviluppata di pari passo alla medicina dei falchi, della quale, sin dalle origini, i popoli Arabo-persiani sono stati i custodi (Muller, 2009a). In Europa occidentale la falconeria raggiunse il suo massimo splendore nel tredicesimo secolo, grazie al contatto con il mondo arabo, avvenuto durante le Crociate (Muller, 2009a).

Ispirati dai manoscritti arabi, diversi studiosi dell'epoca si interessarono alla falconeria ed alla medicina di questi uccelli. Tra i più importanti trattati in materia si ricordano il "*De Cura Accipitrum*" di Adelardo di Bath, il trattato sul "podagra" (*bumblefoot* o pododermatite ulcerativa) e quello sulla falconeria di Demetrios Pepagomenos e il "*De falconibus*" di Alberto Magno (1200-1289 d.C.) (Muller, 2009a).

Ma il più importante e famoso scritto riguardante la falconeria e la cura dei rapaci rimane il "*De Arte Venandi cum Avibus*" di Federico II di Svevia (1194-1250 d.C.) (Pollock *et al*., 2016), nel quale si elencano le principali tecniche di gestione dei falchi, apprese dal mondo arabo e ancora oggi impiegate (come l'utilizzo del cappuccio) (Gentile, 2019), e dove sono incluse importanti informazioni riguardo l'anatomia di

tali uccelli (Muller, 2009a). A questo si aggiunge un altro importante testo, il "*The Boke of St. Albans*", che rappresenta il primo trattato medievale, in materia di caccia e medicina del falco, pubblicato in lingua inglese, nonché il primo sull'argomento scritto da una donna (Muller, 2009a).

Quindi, è da centinaia di anni che i rapaci vengono mantenuti in cattività nell'ambito della falconeria, ma è solo negli ultimi decenni del ventesimo secolo che si è cominciato ad avere l'interesse di riprodurli in cattività (Platt *et al*., 2007). Questo è avvenuto contestualmente all'inserimento di alcune specie impiegate in falconeria, come Falco pellegrino e il Girfalco (*Falco rusticolus*), in Appendice I CITES (Fleming *et al.*, 2011). Ciò comporta che tali specie non possano essere commercializzate, a meno che non si tratti di esemplari nati in cattività dalla seconda generazione in poi (Appendice II) (Fleming *et al.*, 2011; https://cites.org/eng/prog/captive-breeding, 2019). A fronte, quindi, delle restrizioni riguardanti la cattura di esemplari selvatici si è investito sulla riproduzione in cattività e sulle tecnologie legate ad essa.
Questo ha permesso di limitare il traffico illegale di esemplari selvatici (Fleming *et al*., 2011) e di ottenere falchi ibridi incrociando specie che solitamente non si accoppierebbero in natura. Proprio gli esemplari ibridi, però, possono avere un impatto notevole sulle stesse popolazioni selvatiche, soprattutto quando a seguito del loro rilascio accidentale, si inseriscono in natura con il rischio di inquinamento genetico.
Ma oltre all'aspetto economico legato al settore della caccia con il falco, crebbe la consapevolezza che fosse necessario preservare le popolazioni di rapaci selvatici. Alcuni gruppi di falconieri hanno contribuito in maniera importante nel ripristinare popolazioni in pericolo, come è avvenuto per il Falco pellegrino (Platt *et al*., 2007).
Quindi la tutela della falconeria non prevede solo il mantenimento di una tradizione millenaria, ma garantisce la salvaguardia dei rapaci, delle loro prede e del loro habitat attraverso un utilizzo sostenibile delle stesse.
Il ruolo della falconeria, pertanto, va ben oltre il semplice svago legato all'attività venatoria, diventando uno strumento fondamentale per la salvaguardia ambientale (progetti di ricerca e di conservazione delle specie selvatiche, riabilitazione di uccelli selvatici attraverso le tecniche impiegate in falconeria che ne permettono poi il rilascio, riduzione del traffico illegale con costruzione di centri di riproduzione in cattività, pest-control) e per l'educazione delle nuove generazioni.

1.2 I rapaci: cenni di sistematica e anatomia

I rapaci, per la loro potenza, hanno da sempre suscitato un grande fascino nell'uomo, tanto da essere elevati a divinità (come il dio egizio *Horus*) (Venable, 1996)
Il termine rapace deriva dal latino "*repere*", ossia afferrare (Deem, 2002), e con esso si intende indicare gli uccelli predatori appartenenti a quattro Ordini: *Falconiformes*, *Accipitriformes*, *Cathartiformes* e *Strigiformes* (HBW and BirdLife International, 2018; Mindell *et al*., 2018; Gill and Donsker, 2019). La classificazione sistematica dei rapaci è stata a lungo dibattuta e tuttora gli studiosi non sono tutti concordi nel considerare gli *Accipitriformes* come ordine a sé stante. La tassonomia degli uccelli è, infatti, sotto costante revisione a seguito dell'impiego delle più recenti tecniche di biologia molecolare (Cooper, 2002).
Falconiformes ed *Accipitriformes* comprendono i rapaci diurni, tra i quali si annoverano specie comunemente utilizzate in falconeria come il Falco pellegrino, Falco sacro (*Falco cherrug*), Girfalco ed Astore (*Accipiter gentilis*), ma anche aquile e avvoltoi; mentre gli *Strigiformes* includono i rapaci notturni (gufi, civette, barbagianni, allocchi) (Muller, 2009b). L'ordine dei *Cathartiformes* include le specie rappresentanti gli avvoltoi del Nuovo Mondo. Questi ultimi, viste le grandi differenze che li caratterizzano rispetto agli altri rapaci (come l'assenza di siringe, l'assenza di dimorfismo sessuale e i peculiari tratti comportamentali), sono stati inseriti in un ordine a parte (Cooper, 2002). Tuttavia altri autori li considerano ancora inclusi nell'ordine *Accipitriformes* (Gill and Donsker, 2019)
Nella Tabella 1.1 è indicata la versione più recente della classificazione sistematica dei rapaci secondo HBW and BirdLife International (2018).

In generale i rapaci presentano le medesime caratteristiche di tutti gli uccelli, ma la loro anatomia si è adattata, facendo di essi formidabili volatori e micidiali predatori.
Nonostante presentino una morfologia comune esiste una grande variabilità nella forma e dimensione del becco, degli artigli e delle ali a seconda delle abitudini alimentari e della tipologia di volo.
Tendenzialmente carnivori, la loro dieta può includere invertebrati, rettili, pesci, uccelli, uova e mammiferi (Deem, 2002), ma anche carogne, che individuano grazie alla potente vista (rapaci diurni), all'udito (rapaci notturni) o all'olfatto (avvoltoi) (Zucca, 2002).

Tabella 1.1: Classificazione sistematica dei rapaci (HBW and BirdLife International, 2018). Nella colonna di sinistra sono riportati alcuni esempi di specie appartenenti alle diverse famiglie.

Ordine	**Famiglia**	**Specie**
Falconiformes	*Falconidae*	Falco pellegrino (*F. peregrinus*)
		Falco sacro (*F. cherrug*)
		Girfalco (*F. rusticolus*)
		Gheppio (*F. tinnunculus*)
Accipitriformes	*Sagittariidae*	Uccello serpentario (*Sagittarius serpentarius*)
	Pandionidae	Falco pescatore (*Pandion haliaetus*)
	Accipitridae	Astore (*Accipiter gentilis*)
		Poiana di Harris (*Parabuteo unicinctus*)
		Aquila reale (*Aquila chrysaetos*)
		Grifone (*Gyps fulvus*)
Cathartiformes	*Cathartidae*	Condor californiano (*Gymnogyps californianus*)
		Condor andino (*Vultur gryphus*)
		Avvoltoio testa nera (*Coragyps atratus*)
Strigiformes	*Tytonidae*	Barbagianni (*Tyto alba*)
	Strigidae	Gufo reale (*Bubo bubo*)
		Gufo comune (*Asio otus*)
		Civetta (*Athene noctua*)
		Allocco (*Strix aluco*)

Le abitudini alimentari possono essere pertanto estremamente varie e altamente specie-specifiche. Si possono riconoscere rapaci la cui dieta include una grande eterogeneità di fonti di cibo ed altri altamente specializzati, come il Gipeto (*Gypaetus barbatus*), maestoso avvoltoio che si nutre esclusivamente di ossa e midollo osseo.
Questa enorme diversità nelle abitudini alimentari ha portato all'evoluzione di diverse morfologie di becco.
In generale il becco dei rapaci si presenta uncinato e tagliente, ma forma e dimensioni variano notevolmente a seconda della specie considerata. Le specie non specializzate hanno un becco moderatamente uncinato e senza particolari caratteristiche, mentre i rapaci più specializzati hanno becchi con morfologia compatibile con il tipo di preda. Ad esempio, molti falchi hanno strutture particolari a carico della ranfoteca, congeniali all'immobilizzazione della preda, mentre aquile e alcuni avvoltoi hanno becchi forti e massicci (Zucca, 2002), adatti a spezzare e strappare, e ancora alcune specie hanno becchi affusolati utili a spolpare.

Allo stesso modo gli artigli si sono adattati a seconda della tipologia di preda e presentano una forma e una curvatura peculiare che permette di distinguere i rapaci appartenenti ad una stessa famiglia (Fowler *et al*., 2009). Tutti i rapaci presentano quattro dita, con il primo dito (alluce) sempre rivolto caudalmente, ma esiste una differenza nella disposizione delle restanti tre dita (Scott, 2016). Falchi e Accipitridi sono caratterizzati da anisodattilia, presentano cioè le restanti tre dita rivolte cranialmente, mentre gufi e Falco pescatore (*Pandion haliaetus*) possiedono un piede zigodattilo, in cui il quarto dito è rivolto latero-caudalmente (Scott, 2016).
Il Falco pescatore, inoltre, presenta artigli possenti e caratterizzati da un'evidente curvatura (Fowler et al., 2009) e da spicole che ricoprono la pelle del piede, strumenti fondamentali per catturare e immobilizzare i pesci di cui si nutre (Zucca, 2002).
Gli artigli degli avvoltoi, invece, sono meno ricurvi e scarsamente affilati, non dovendo essi catturare prede vive (Zucca, 2002).

Struttura e forma di ali e coda si sono, invece, adattate in relazione alla tipologia di volo e alla tecnica di caccia (Zucca, 2002), caratteristiche che ne hanno condizionato anche l'utilizzo in falconeria.
Infatti, in tale disciplina, i rapaci vengono distinti in specie "d'alto volo" (fam. *Falconidae:* Falco pellegrino, Girfalco, Falco sacro, Lanario), caratterizzati da adattamenti anatomici (ali appuntite) che ne permettono il volo d'alta quota, il quale

termina con la picchiata sulla preda, e specie di "basso volo" (fam. *Accipitridae:* Astore, Sparviere, Poiana di Harris), che si prestano maggiormente al volo di inseguimento tra la vegetazione (http://www.falconeria.info/altro/articoli_falconeria_rapaci/articolo_rapaci_alto_basso_volo.htm, 2019).

Molte delle specie impiegate in falconeria appartengono ai generi *Falco* e *Accipiter*, che talvolta possono somigliarsi dal punto di vista morfologico per un occhio poco esperto, ma in realtà presentano macroscopiche differenze anatomiche ed etologiche.
Una volta note tali differenze l'identificazione risulta semplice. Esse, infatti, differiscono per taglia, portamento e altri caratteri anatomici. Le specie del genere *Falco* presentano dimensioni comprese tra 35-64 cm per un peso di 500-2.100 g, mentre per le specie del genere *Accipiter* la dimensione media è di 47-62 cm per 600-1.300 g di peso (Muller, 2009b). Queste ultime, inoltre, possiedono un osso infraorbitale prominente (assente nel genere *Falco*), iridi rosse o color oro a seconda dell'età dell'animale e punta delle ali arrotondata, la quale, quando le ali vengono portate a riposo, non raggiunge la punta della coda, come invece avviene nel genere *Falco*. Caratteristiche esclusive delle specie del genere *Falco* sono le narici con opercolo centrale (Figura 1.2) (adattamento necessario ad impedire l'ingresso violento dell'aria durante il volo e le picchiate) (Muller, 2009b) e la presenza del dente del becco o dente tomiale (Figura 1.2) che utilizzano per uccidere la preda, spezzandole il collo (Fowler et al., 2009).
Gli uccelli del genere *Accipiter*, al contrario, immobilizzano la preda atterrandola o stringendola con forza tra gli artigli. Per fare ciò gli artigli del primo e secondo dito si sono adattati, risultando molto più grandi rispetto a quelli delle restanti dita e a quelli dei Falconidi (Fowler et al., 2009).

Differenze tra i diversi ordini si riscontrano anche nella struttura dell'apparato gastro-enterico. *Falconiformes* e *Accipitriformes* possiedono il gozzo, assente negli *Strigiformes*, che presentano, invece, ciechi ben sviluppati (vestigiali nei primi due ordini) (Zucca, 2002). Ma tutti i rapaci sono accomunati dal fenomeno di "*casting*", ossia il rigurgito dei resti indigeriti delle prede sotto forma di bolo compatto chiamato borra (Mancinelli and Bament, 2014), emessa dopo il pasto con un intervallo di tempo variabile a seconda della specie.

Figura 1.2: Falco pellegrino. È possibile notare la presenza del peculiare opercolo all'interno della narice e del dente tomiale, caratteristiche tipiche delle specie appartenenti al genere *Falco*. (Muller, 2009b)

In generale i rapaci sono uccelli monogami (con alcune eccezioni) e raggiungono la maturità sessuale attorno i 2-6 anni (Lierz, 2014) a seconda della specie.

In gran parte delle specie, soprattutto nei *Falconiformes* e *Accipitriformes*, è presente dimorfismo sessuale, in cui la femmina si mostra di dimensioni maggiori (circa il 30% più grande) rispetto al maschio. Mentre il piumaggio, se considerato singolarmente come carattere, difficilmente permette di distinguere i due sessi (Platt *et al*. 2007), tranne che in alcune specie come, ad esempio, il Gheppio (*F. tinnunculus*), il Falco cuculo (*F. vespertinus*), il Grillaio (*F. naumanni*) e l'Astore (*Accipiter gentilis*). In altre specie, però, tale dimorfismo sessuale non è apprezzabile, e l'unico modo per poter distinguere i due sessi è rappresentato dal sessaggio per via laparoscopica/endoscopica (Best, 1996) o la valutazione del DNA (tramite raccolta di un campione di sangue o dalle penne) (D'Aloria, 2000), mentre la ricerca di ormoni sessuali negli escreti (Saint Jalme, 1999) rappresenta una metodica efficace ma ancora pionieristica.

Le coppie sono molto legate al sito di nidificazione, al quale ritornano appena prima della stagione riproduttiva, e risultano pertanto estremamente territoriali soprattutto in tale periodo. (Lierz, 2014). Alle nostre latitudini gli accoppiamenti si concentrato tra Febbraio e Aprile, quando si assiste ad un aumento delle ore di luce e ad una maggiore ricchezza di risorse (Lierz, 2008). Nei falchi la femmina, più robusta, difende il nido, le uova e i piccoli, mentre il maschio si dedica alla caccia e al fornire cibo alla femmina in cova e alla prole (Lierz, 2008; Lierz, 2014).

Il maschio rappresenta un fattore chiave se si intende attuare la riproduzione "naturale" in cattività. Infatti la femmina necessita anche della stimolazione data dal corteggiamento del partner per essere pronta all'accoppiamento. Tuttavia, vista la differenza di taglia, il maschio può essere aggredito e ferito dalla femmina durante il corteggiamento e i tentativi di accoppiamento, soprattutto se non vi è piena compatibilità tra i due partner. Questo deve essere sempre tenuto in considerazione in ambiente di allevamento, dal momento che la stabulazione in voliera limita fortemente le possibilità di fuga (Lierz, 2008).

1.2.1 Falco pellegrino (*Falco peregrinus*)

Il Falco pellegrino (*Falco peregrinus*) è un rapace di medie dimensioni robusto ed atletico (Ávalos, 2013) appartenente all'ordine *Falconiformes*, famiglia *Falconidae*, perfettamente adattato alla caccia in volo, caratteristica che ha fatto di lui uno dei falchi più apprezzati in falconeria sin dalle sue origini. Questa specie è celebre per essere tra gli animali più veloci al mondo, raggiungendo quasi i 300 km/h quando si lancia in picchiata sulla preda (Ávalos, 2013).

In questa specie esiste un evidente dimorfismo sessuale in cui la femmina si presenta marcatamente più grande e pesante rispetto al maschio (Ávalos, 2013) e per tale motivo molto più apprezzata in falconeria. In media il Falco pellegrino ha una dimensione di 34-50 cm e un'apertura alare di 90-105 cm, ma il maschio presenta un peso compreso tra i 580-720 g, mentre la femmina può arrivare a 860-1.090 g (Muller, 2009b). Come le altre specie appartenenti alla famiglia *Falconidae*, il Falco pellegrino presenta ali affusolate e coda corta (Dewey and Potter, 2002), che consentono un'elevata dinamicità in volo. La sua silhouette in volo è compatta e aereodinamica, con caratteristica forma ad arco di balestra.
Gli esemplari adulti presentano le parti dorsali del corpo, ali e coda di colore grigio-bluastro, di diverse gradazioni e con possibili sfumature bruno-rossastre a seconda della sottospecie considerata. Addome e petto, invece, sono caratterizzati da un colore chiaro e da strie scure orizzontali, mentre macchie a forma di lacrima possono trovarsi sul petto e sotto le ali (Muller, 2009b; Ávalos, 2013). Gli esemplari giovani, al contrario, possiedono il piumaggio del dorso brunastro, mentre petto e addome si presentano di color crema, con strie scure longitudinali, e piedi di colore azzurrognolo (Muller, 2009b).

Ma la caratteristica che più contraddistingue la specie è la presenza delle strie malari nere o mustacchi (più scure e meglio delineate negli adulti) che risaltano nettamente sulle guance chiare (Muller, 2009b).
Sono state riconosciute 19 diverse sottospecie differenziabili in parte per le caratteristiche morfologiche (come taglia e colorazione del piumaggio), oltre che per l'area geografica di distribuzione (Global Raptor Information Network, 2019) (Tabella 1.2). Tuttavia gli studiosi ancora si interrogano se considerare il Falco di Barberia come sottospecie di Falco pellegrino (*Falco peregrinus pelegrinoides* e *F. peregrinus babylonicus*) o come specie a sé stante (*Falco pelegrinoides*), comprendente due sottospecie (*Falco pelegrinoides pelegrinoides* e *F. pelegrinoides babylonicus*).
La valutazione della sequenza nucleotidica del gene del citocromo b mitocondriale ha evidenziato una differenza < 0,6% tra Falco pellegrino e Falco di Barberia (Wink *et al*., 2000). Ciò ha dimostrato l'estrema vicinanza genetica tra i due falchi, ma non è risultata sufficiente a garantire una classificazione definitiva.

Il Falco pellegrino presenta una distribuzione cosmopolita, trovandosi in tutti continenti escluso l'Antartide (Ávalos, 2013), dimostrando di adattarsi agli habitat più vari, dai picchi montani alle aree paludose, dalle zone costiere alle città. Denominatore comune degli ambienti che occupa sono le scogliere e i dirupi (o i grattacieli in ambienti antropizzati), che rappresentano i luoghi ideali per la nidificazione e la caccia (Global Raptor Information Network, 2019).
Specie tendenzialmente migratrice, da cui il nome "pellegrino", vola dal Nord al Sud America, dall'Europa all'Africa e dalle regioni dell'Asia del nord a quelle del sud fino all'Indonesia, lasciando i luoghi di nidificazione tra Agosto e Novembre, per poi farvi ritorno tra Febbraio e Marzo poco prima della stagione riproduttiva (BirdLife International, 2016b). Ma l'entità di tali spostamenti può cambiare a seconda della latitudine e della disponibilità di risorse. Se le condizioni sono favorevoli, possono diventare stanziali, compiendo solo spostamenti a corto raggio su scala regionale.
È una specie prevalentemente ornitofaga (Ávalos, 2013), gli uccelli infatti rappresentano il 77-99% delle sue prede (White *et al*., 2002). La sua dieta può includere uccelli di piccole dimensioni (passeriformi) fino a uccelli di quasi 1,5 kg, come il Germano reale (*Anas platyrhynchos*), anche se la preda principe del Pellegrino è rappresentata dai columbiformi (Ávalos, 2013), che catturano lanciandosi in picchiata su di essi e uccidendoli in volo. Però non vengono disdegnati anche piccoli mammiferi come pipistrelli e roditori (Dewey and Potter, 2002).

Tabella 1.2: Elenco delle diverse sottospecie di Falco pellegrino in relazione all'areale geografico di distribuzione secondo quanto indicato dalla Global Raptor Information Network (2019).
Con il simbolo "*" sono indicate le sottospecie considerate da alcuni come facenti parte di una specie a sé stante, il Falco di Barberia.

Sottospecie	**Areale di distribuzione**
F. p. anatum	Canada, Stati Uniti fino al Messico
*F. p. babylonicus**	Iran, Mongolia, Pakistan
F. p. brookei	Francia, Spagna, coste del nord Africa fino al Caucaso
F. p. calidus	Tundra euro-asiatica fino alla Siberia
F. p. cassini	Equador, Bolivia, Perù, Argentina, Cile, Terra del fuoco, Isole Falkland
F. p. ernesti	Indonesia, Filippine, Nuova Guinea, Arcipelago di Bismarck
F. p. furuitii	Isole Ogasawara (Giappone)
F.p. japonensis	Siberia, Kamchatka, Giappone, Taiwan
F. p. macropus	Australia, Tasmania
F. p. madens	Isola di Capo Verde
F. p. minor	Africa sub-sahariana, sud del Marocco
F. p. nesiotes	Fiji, Vanuatu e Nuova Caledonia
F. p. pealei	Costa ovest del Nord America fino all'Alaska
*F. p. pelegrinoides**	Isole Canarie, nord Africa, Iraq
F. p. peregrinator	Pakistan, India, Sri Lanka, Cina
F. p. peregrinus	Eurasia
F. p. radama	Madagascar e Isole Comore
F. p. submelanogenys	Sud-est dell'Australia
F. p. tundrius	Tundra artica (dall'Alaska alla Groenlandia), Cile e Argentina

Le coppie si riuniscono nei siti di nidificazione poco prima dell'inizio della stagione riproduttiva vera e propria, che si ha tra Marzo e Giugno (Nelson, 1972) con variazioni legate al fotoperiodo, all'area geografica (latitudine) e alla sottospecie.
Il legame tra i partner viene rafforzato durante il corteggiamento, in cui i maschi si esibiscono ai bordi del nido (frequentemente rappresentato da una nicchia nella roccia, a grande altezza) per attirare la femmina e segnalare la propria presenza su quel territorio. Gli esemplari spesso stanno l'uno accanto all'altro, si osservano, vocalizzano ed eseguono il cosiddetto "*bill*", in cui uno dei partner afferra delicatamente il becco dell'altro. È frequente, poi, vedere la coppia lanciarsi in acrobazie aeree, caratterizzate da virate strette, picchiate ed impennate (Dewey and Potter, 2002). Tipico poi è osservare il maschio offrire cibo alla femmina dopo aver eseguito una serie di inchini e richiami.
La femmina generalmente depone dalle 3 alle 4 uova di colore variabile, dal crema al rosso mattone chiaro, con screziature marrone-rossastre, talvolta così numerose da coprire l'intera superficie. I piccoli nascono dopo 31-33 giorni di incubazione e sono inetti, pertanto vengono accuditi dai genitori almeno fino allo sviluppo completo e al primo volo, che avviene dopo circa 35-42 giorni (Global Raptor Information Service, 2019).
In natura la maturità sessuale è raggiunta attorno al primo e quinto anno di vita nella femmina, e tra i due e gli otto anni nel maschio (Dewey and Potter, 2002). Lo stesso avviene in cattività (Enderson *et al*., 1998).

Sono animali longevi che in natura possono vivere in media 13 anni, fino a un massimo di 16-20 anni, mentre in cattività possono raggiungere i 25 anni (Dewey and Potter, 2002), mantenendo una produzione spermatica soddisfacente anche fino ai vent'anni di vita (Enderson *et al*., 1998).
Nonostante la sua longevità e capacità di adattamento la specie ha sofferto in passato proprio a causa del suo ruolo all'apice della catena alimentare. Bracconaggio, degradazione dell'habitat ed inquinamento hanno messo a repentaglio la popolazione, fino alla quasi totale scomparsa negli Stati Uniti.
Solo dopo il bando degli idrocarburi alogenato aromatici (DDT) in molti paesi si è assistito ad un recupero della specie. Proprio l'utilizzo di tali pesticidi aveva provocato il drastico declino del Falco pellegrino tra gli anni '60 e '70 in conseguenza dell'incremento della fragilità del guscio delle uova che andavano incontro a rottura, e alla maggiore mortalità embrionale e degli adulti a causa proprio di tali sostanze

accumulatesi nella catena trofica. Grazie agli immensi sforzi messi in atto da falconieri e ricercatori per il recupero della specie tramite programmi di riproduzione in cattività oggi il Falco pellegrino è stato riclassificato come "a rischio minimo" (BirdLife International, 2016a), con una popolazione europea stimata su 14.900-28.800 coppie e 29.700-57.600 esemplari adulti.

1.2.2 Ibridi

"Uno dei primi falchi ibridi venne prodotto nel 1971 da una femmina di Falco sacro (*Falco cherrug*) e da un maschio di Falco pellegrino (*F. peregrinus*)" (Eastham and Nicholls; 2005).

Da allora, grazie all'utilizzo dell'inseminazione artificiale (Lierz, 2014), è stato possibile implementare la produzione di ibridi, apprezzati in falconeria dal punto di vista estetico, ma anche per le notevoli performance di volo, la maggiore adattabilità alle condizioni climatiche e, talvolta, per la minore suscettibilità alle patologie (Aspergillosi) rispetto ad alcune linee pure (Fleming *et al*., 2011; Peter 2012).

Il mercato degli ibridi è pertanto fiorente, con richieste soprattutto da parte dei paesi del Medio Oriente.

Gli incroci Falco sacro x Pellegrino (*F. cherrug* x *F. peregrinus*), Girfalco x Pellegrino (*F. rusticolus* x *F. peregrinus*) e Girfalco x Falco sacro (*F. rusticolus* x *F. cherrug*) sono i più apprezzati, ma sono frequenti anche gli incroci tra sottospecie differenti (soprattutto tra le sottospecie di Falco pellegrino come *F. p. pealei*, *F. p. peregrinus* e *F. p. brookei)* (Lindberg and Nesje, 2000; Muller, 2009b)

L'aspetto degli ibridi può essere molto vario (Muller, 2009b). Il colore bianco spesso deriva dal *F. rusticolus*, mentre le strie malari dal Pellegrino (Muller, 2009b).

Generalmente, quindi, gli ibridi presentano un fenotipo intermedio tra i due parentali, ma è stato notato che il contributo paterno sembra influire maggiormente sul fenotipo rispetto a quello materno. È probabile che questo sia legato al fatto che due terzi degli alleli sono portati dal sesso omogametico (che negli uccelli è rappresentato da quello maschile) (Eastham and Nicholls; 2005).

Potenzialmente, con l'inseminazione artificiale, è possibile ottenere ibridi incrociando qualsiasi specie appartenente al genere *Falco* (Lindberg and Nesje, 2000), ma a destare preoccupazione è l'eventualità che tali incroci si verifichino anche mediante accoppiamento naturale.

L'ibridazione tra specie selvatiche diverse in natura è rara, ma può verificarsi occasionalmente soprattutto se tali specie popolano la medesima area. Esistono, infatti, alcuni esempi che riportano l'incrocio in natura di Falco sacro x Falco pellegrino, Falco sacro x Lanario, Lanario x Pellegrino e Pellegrino x Girfalco (Dixon, 2012). Tuttavia tale eventualità viene limitata dalla presenza di "barriere" di natura ecologica ed etologica, cui si aggiunge la possibile compromissione della fertilità della prole ibrida generata (Lindberg and Nesje, 2000), che rappresenta uno svantaggio evolutivo.
Nonostante ciò, tali incroci in natura potrebbero rappresentare un serio rischio, soprattutto se esemplari ibridi ottenuti in cattività si dovessero accoppiare con soggetti selvatici, portando all'introduzione non voluta di nuovi geni (Wink *et al*., 2004). Infatti non è raro che alcuni esemplari fuggano dalla stabulazione in cattività. Generalmente la sopravvivenza di questi in ambiente naturale è molto bassa, dal momento che dovrebbero prima sopravvivere in natura, trovare un partner con cui accoppiarsi, produrre uova fertili, riuscire a crescere la prole, la quale a sua volta dovrebbe sopravvivere e accoppiarsi (https://iaf.org/exotic-species-and-hybrids-in-falconry, 2019). Tuttavia gli stessi esemplari possono interferire con le popolazioni selvatiche agendo come *competitors* per i siti di alimentazione e riproduzione (Lindberg and Nesje, 2000; Fleming *et al*., 2011).
Nonostante la possibilità che soggetti ibridi, fuggiti alla stabulazione in cattività, sopravvivano e si riproducano in natura sia estremamente ridotta, sono stati osservati episodi di accoppiamento tra questi ed esemplari selvatici (Lindberg and Nesje, 2000). Un esempio è rappresentato dall'episodio del 1995 in Germania, in cui un maschio ibrido (Pellegrino x Girfalco) si accoppiò con un esemplare selvatico di Pellegrino, generando prole (Lindberg and Nesje, 2000). Normalmente l'ingresso di nuovi geni in una popolazione è vantaggioso per il mantenimento di una specie, dal momento che garantisce una maggiore variabilità genetica. Tuttavia, se il contributo deriva da esemplari ibridi o alloctoni si assiste ad un vero e proprio inquinamento genetico, che rischia di interferire pesantemente sui già fragili equilibri delle popolazioni selvatiche.
Inoltre gli ibridi, e la prole da essi ottenuta, possono presentare caratteristiche morfologiche miste, oppure risultare macroscopicamente indistinguibili dalle specie selvatiche, rendendo impossibile la loro identificazione e cattura (Barthel and Fünfstück, 2012) senza un'indagine genetica (Lindberg and Nesje, 2000) (Figura 1.3 e Figura 1.4).

Figura 1.3: Due esemplari di *F. rusticolus* (Barthel and Fünfstück, 2012).
L'enorme differenza nella colorazione del piumaggio potrebbe far credere che appartengano a due specie differenti.

Figura 1.4: Esemplari ibridi (Barthel and Fünfstück, 2012). A sinistra ibrido *F. rusticolus x F. cherrug*; a destra ibrido *F. rusticolus x F. peregrinus*.
L'aspetto fenotipico talvolta ricorda le caratteristiche morfologiche delle specie parentali, ma molto più spesso risulta fuorviante e ne rende difficoltosa l'identificazione.

Quindi, la produzione di esemplari ibridi da un lato ha rappresentato la chiave per la riduzione del traffico illegale di falchi selvatici, promuovendo l'utilizzo in falconeria di esemplari nati in cattività, che rispondessero alle crescenti richieste e alle esigenze del mercato della falconeria (Dixon, 2012), dall'altro potrebbe rappresentare un rischio

di introduzione di geni "alieni" nelle popolazioni di falchi selvatici a seguito della fuga degli ibridi stessi (BirdLife International, 2016a; Fleming *et al*., 2011), con impatto non trascurabile, soprattutto se tale evento dovesse coinvolgere specie a rischio (BirdLife International, 2016a).

È per tale motivo che in alcuni paesi l'utilizzo e la produzione di ibridi sono sottoposti a restrizioni. In Germania, ad esempio, la produzione di ibridi con contributo genetico di specie native è stata fortemente soggetta a limitazioni dal 2005, mentre dal 2015 è stata proibita (Barthel and Fünfstück, 2012). Lo stesso è avvenuto in Olanda e Slovacchia (BirdLife International, 2016a). Nonostante il bando in questi Stati, la produzione di ibridi da falconeria è comune in molti altri paesi europei e non è soggetta a nessuna regolamentazione. A fronte del possibile rischio di introduzione di geni alieni è stato proposto di estendere la proibizione della produzione di ibridi a tutti i paesi dell'Unione Europea (BirdLife International, 2016a), tuttavia la domanda di tali animali è così elevata da rendere difficilmente applicabili manovre di questo tipo. Inoltre non vi sono sufficienti prove oggettive che dimostrino l'effettivo ruolo degli uccelli fuggiti alla cattività nell'introduzione di geni ibridi.

In risposta a tali pressioni la *International Association for Falconry* (IAF) e la *North American Falconers Association* (NAFA) formarono nel 1997 la *International Committee on Hybrids*, con lo scopo di proporre linee guida riguardo l'impiego di ibridi in falconeria, al fine di scongiurare l'eventualità di proibirne l'utilizzo (Lindberg and Nesje, 2000; https://iaf.org/exotic-species-and-hybrids-in-falconry, 2019).

Sono stati proposti, inoltre, dei codici di condotta per quei falconieri che utilizzano specie esotiche o ibridi, nei quali si chiede l'impegno nell'eseguire un corretto *training* dell'animale, di non rilasciare gli esemplari volontariamente e di applicare l'uso sistematico della radio-telemetria al fine di limitare le fughe (https://www.iaf.org/download/docs, 2019).

Ma il problema dell'ibridazione riguarda anche i progetti di reintroduzione di specie in pericolo. In Germania, ad esempio, gli esemplari di Falco pellegrino, scelti come riproduttori nel programma di riproduzione e reintroduzione, appartenevano a sottospecie diverse (*F.p.brookei* e *F.p.pealei*) da quella presente nella regione (*F.p. peregrinus*), rischiando, di conseguenza, di compromettere la popolazione dal punto di vista genetico (Lindberg and Nesje, 2000). La scelta dei riproduttori in tali programmi deve pertanto tenere in considerazione anche le minime differenze genetiche esistenti

tra le varie sottospecie, prediligendo quelle presenti sul territorio designato per la reintroduzione.

Nonostante tale accortezza, il rilascio di soggetti nati e cresciuti in cattività potenzialmente può accrescere l'eventualità che tale ibridazione avvenga con maggiore frequenza. Non è raro, infatti, che nei centri di riproduzione, vengano impiegati esemplari adulti di una specie come "genitori adottivi" per piccoli di un'altra specie (Lindberg and Nesje, 2000). Queste combinazioni interspecifiche fanno sì che gli uccelli così cresciuti riconoscano come potenziali partner esemplari appartenenti alla specie cui facevano parte i genitori adottivi (Lindberg and Nesje, 2000). Gli esemplari imprintatisi con specie differenti da quella di appartenenza tenderanno maggiormente a cercare l'interazione con soggetti delle specie dei genitori adottivi, mostrando anche un comportamento di corteggiamento più simile a quello di questi ultimi, aumentando il rischio di formare coppie interspecifiche in caso di rilascio in natura. L'episodio osservato in Canada nel 1985, nel quale si assistette all'accoppiamento tra un Falco pellegrino e un Falco della prateria (*Falco mexicanus*), presumibilmente è da ricondursi al fenomeno sopracitato. Infatti, i Falchi della prateria, assieme ai Girfalchi, furono utilizzati come genitori surrogato per i piccoli di Pellegrino nati nei centri di riproduzione in cattività, creati con lo scopo di reintrodurre e salvare la specie (Oliphant, 1991).

Non vi è dubbio che le tecnologie riproduttive abbiano un ruolo vitale nella conservazione delle popolazioni selvatiche. Ma, se da un lato hanno permesso di reintrodurre in natura specie in pericolo ed hanno concesso di limitare la cattura di esemplari selvatici da dedicare alla falconeria, dall'altro potrebbero portare al rischio di inquinamento genetico delle popolazioni selvatiche, con grave compromissione delle stesse, benché i reali pericoli che ne compromettono la sopravvivenza rimangano la distruzione dell'habitat, l'inquinamento e il bracconaggio.

Ecco che la valutazione del seme dei falchi detenuti in cattività diventa fondamentale non solo al fine di implementare le tecniche di riproduzione artificiale, ma anche per ampliare le attuali conoscenze riguardanti la qualità spermatica anche di esemplari ibridi, al fine di comprendere quali differenze possano sussistere tra questi ultimi e gli esemplari di specie pure. Valutare la morfologia, la morfometria, la motilità e la vitalità degli spermatozoi di soggetti ibridi può fornire indicazioni utili riguardo il potenziale riproduttivo di tali esemplari, oltre che informazioni riguardo la possibilità di conservare il loro materiale seminale.

Tutto ciò assume connotati interessanti dal momento che è stato notato che la fertilità negli ibridi può essere inferiore, ma generalmente questo è vero per gli esemplari femmina, mentre per i maschi la fertilità può essere mantenuta (Schmutz and Oliphant, 1987; Lindberg and Nesje, 2000). È stato visto che questo dipende dal tipo di incrocio effettuato. Infatti, ibridi derivanti da specie facenti parte del sottogenere *Hierofalco*, che include Falco sacro (*F. cherrug*), Girfalco (*F. rusticolus*), Lanario (*F. biarmicus*), Falco laggar (*F. jugger*), sembrano mantenere una piena fertilità. Mentre la prole derivante da specie meno correlate (*Hierofalco* x Pellegrino) presenta una ridotta fertilità, che si manifesta con spermatozoi morfologicamente anomali e con ridotta vitalità o con sterilità delle femmine (Eastham and Nicholls, 2005; Dixon, 2012).

2. APPARATO RIPRODUTTORE MASCHILE

Per stabilire programmi di inseminazione artificiale è fondamentale conoscere l'anatomia, la fisiologia e gli specifici adattamenti unici degli uccelli per quanto concerne la riproduzione (Gee *et al*., 2004). Essenziale è anche approfondire la conoscenza nei confronti delle singole specie in modo da adattare ad esse le tecniche di riproduzione artificiale.

Alcune informazioni di base, come presenza e localizzazione dei tubuli di stoccaggio degli spermatozoi nella femmina o la durata del periodo fertile, sono ancora poco conosciuti in molte specie di rapaci. La scarsità di informazioni rappresenta un fattore limitante lo sviluppo di programmi di riproduzione in cattività e rende difficoltosa la comprensione dell'ecologia riproduttiva dei rapaci selvatici (Blanco *et al*., 2007).

2.1 Anatomia e fisiologia

L'apparato riproduttore maschile presenta una struttura simile sia nelle specie domestiche che nelle specie selvatiche, con alcune eccezioni.

Gli uccelli presentano due testicoli posti all'interno della cavità celomatica, localizzati posteriormente al margine caudale del polmone e medialmente al lobo craniale di ciascun rene (Pollock and Orosz 2002; D'Ovidio, 2017). Medialmente ad essi sono poste l'aorta e la vena cava (O'Malley, 2005). Il mesorchio mantiene i testicoli strettamente adesi alla volta della cavità celomatica, ai due lati della colonna vertebrale (Pollock and Orosz, 2002; Girling, 2003) (Figura 2.1), e il sacco aereo addominale circonda parzialmente le gonadi nel maschio come nella femmina (Pollock and Orosz, 2002).

A seconda della specie uno dei due testicoli può presentarsi di dimensioni maggiori (solitamente il sinistro) rispetto al controlaterale, ma entrambi rimangono funzionali (Johnson, 1986).

Inoltre la dimensione dei testicoli varia a seconda della stagione, aumentando di volume durante la stagione riproduttiva, soprattutto nei Columbiformi (Girling, 2003), ma anche nei rapaci (dove i testicoli possono aumentare la loro dimensione di venti volte, come è stato riportato nello Sparviero, *Accipiter nisus*) (Young *et al*., 2009) o nei passeriformi, in cui i testicoli aumentano di volume di più di trecento volte rispetto alla loro dimensione a riposo (Pollock and Orosz, 2002; Jones and Dodd, 2012). In gran parte delle specie di rapaci tale crescita testicolare richiede fino a 45 giorni

(Blanco *et al*., 2007), e ciò coincide con l'arrivo degli uccelli nei siti di riproduzione a seguito della migrazione stagionale. Questo fa sì che nella stagione non riproduttiva l'energia volta alla produzione spermatica sia pressoché nulla e che durante la migrazione il peso dato dalle gonadi sia minimo, rendendo il volo dell'animale più performante.

La dimensione testicolare non è correlata soltanto alla stagione riproduttiva. Il volume dei testicoli sembra essere legato alla taglia dell'animale, al numero di femmine con cui il maschio si accoppia e alla frequenza di accoppiamenti per ogni femmina per unità di tempo: maggiore è tale frequenza maggiore sarà la dimensione delle gonadi maschili. Inoltre, è stata individuata una correlazione tra dimensione testicolare e produzione spermatica. Infatti, analogamente a quando riscontrato nei mammiferi, maggiore è il volume testicolare, maggiore è il quantitativo di spermatozoi prodotti (Moller, 1991). Questo risulta vantaggioso nelle specie poligame, nelle quali si assiste a competizione spermatica, in cui il materiale seminale di due o più maschi si trova contemporaneamente nell'apparato riproduttore femminile (Vizcarra *et al*., 2015). In tali specie, quindi, la possibilità per un maschio di dare prole è legata alla frequenza con cui avvengono gli accoppiamenti e al numero di spermatozoi presenti all'interno dell'apparato riproduttore femminile, di conseguenza presentano testicoli di dimensioni superiori rispetto alle specie tendenzialmente monogame (Moller, 1991).

Anche il colore può variare andando dal giallastro (nel testicolo a riposo) al biancastro nella stagione riproduttiva (Pollock and Orosz, 2002; Girling, 2003; O'Malley, 2005); mentre in alcune specie si presentano brunastri per la presenza di melanociti siti nell'interstizio testicolare (*Cacatua spp*. e *Ara spp.*) (O'Malley, 2005; D'Ovidio, 2017).

La superficie esterna dei testicoli si presenta liscia e regolare (Pollock and Orosz, 2002) per la presenza della capsula testicolare che avvolge il parenchima. Tale capsula è costituita da tre strati: la sierosa, la tonaca albuginea e la tonaca vasculosa (Vizcarra *et al*., 2015). L'albuginea, benché rappresenti lo strato prevalente, è molto più sottile rispetto a quella dei mammiferi, inoltre non è presente il plesso pampiniforme (O'Malley, 2005).

Il tessuto testicolare è costituito da una trama formata da tubuli seminiferi anastomizzati e da tessuto interstiziale. All'interno dei tubuli seminiferi sono presenti le cellule germinali, che costituiscono l'epitelio seminifero, e le cellule del Sertoli. Queste ultime svolgono le funzioni di sostegno per le cellule germinali, di fagocitosi e di captazione degli ormoni steroidei, analogamente a quanto avviene nei mammiferi

(Pollock and Orosz, 2002). Nell'interstizio sono localizzate le cellule del Leydig che, sotto l'influenza dell'LH, producono testosterone e androstenedione (precursore del testosterone) (Kirby and Froman, 2000; Girling, 2003). Questi ultimi due ormoni sono responsabili dello sviluppo dei testicoli e dei caratteri sessuali secondari (O'Malley, 2005).

Nel testicolo di un maschio sessualmente maturo i tubuli seminiferi presentano un epitelio multistratificato, in cui sono rappresentate cellule a vari stadi di sviluppo. Dalla porzione basale del tubulo al comparto luminale si trovano rispettivamente spermatogoni e cellule del Sertoli, spermatociti primari, spermatociti secondari, spermatidi, spermatozoi (analogamente a quanto si ritrova nei mammiferi) (Johnson, 1986). Il processo di spermatogenesi, tramite il quale dagli spermatogoni si ottengono spermatozoi, dipende dall'azione del testosterone, dell'FSH, dall'attività delle cellule del Sertoli e dalla interazione delle stesse con le cellule germinali (Vizcarra *et al*., 2015).

Al termine della spermiazione, le cellule spermatiche staccano dalla mucosa dei tubuli seminiferi rimanendo immersi nel fluido prodotto dalle cellule del Sertoli. Le contrazioni peristaltiche del sistema duttale spingono gli spermatozoi fino alla *rete testis*, quindi ai *vasa efferentiae* (Johnson, 1986; Pollock and Orosz, 2002), ai dotti di connessione (Vizcarra *et al*., 2015) fino all'epididimo.

Nei *vasa efferentiae* avviene il riassorbimento di gran parte del fluido derivante dai tubuli seminiferi, comportando una concentrazione del materiale seminale. In tale sede, inoltre, avviene la maturazione degli spermatozoi. I *vasa efferentiae* e i dotti di connessione presentano, in quasi tutte le specie, un epitelio pseudostratificato con presenza di cellule non ciliate, preposte all'assorbimento del fluido spermatico tramite pinocitosi, frammiste a cellule ciliate. Queste ultime vengono a mancare nell'epididimo e nel dotto deferente, dove però viene mantenuto l'epitelio pseudostratificato (Vizcarra *et al*., 2015).

Il tempo necessario per il completamento della spermatogenesi e per il trasposto degli spermatozoi nel sistema duttale extra-testicolare è stato studiato soprattutto negli avicoli domestici (Johnson, 1986), ma pochi o assenti sono i dati riguardanti le specie non domestiche come i rapaci (Blanco *et al*., 2007).

L'epididimo è posto lungo la superficie dorso-mediale del testicolo e ha dimensioni modeste rispetto al volume della gonade. Inoltre presenta una struttura semplice, in cui non si riconoscono testa, corpo e coda, come avviene per i mammiferi (Pollock and Orosz, 2002; O'Malley, 2005). In alcune specie l'epididimo presenta una appendice

che si estende verso la ghiandola surrenale. Tale appendice è costituita da numerosi dotti aberranti a fondo cieco, che in alcuni casi possono invadere il parenchima surrenalico. Ciò deve essere tenuto in considerazione nel momento in cui si esegue l'ablazione chirurgica dei testicoli, poiché residui dell'appendice epididimale possono permanere all'interno del corpo dell'animale continuando a secernere ormoni sessuali, provocando la mancata involuzione dei caratteri sessuali secondari (Pollock and Orosz, 2002).

L'epididimo si continua nel vaso deferente, che corre lungo la faccia ventrale del rene per poi sboccare nella porzione dorsale dell'urodeo (compartimento centrale della cloaca) (Girling, 2003). Generalmente presenta un andamento serpiginoso, che permette di distinguerlo dall'uretere, e diviene meglio apprezzabile durante il periodo di attività riproduttiva (Pollock and Orosz, 2002; O'Malley, 2005) (Figura 2.1). Nei rapaci, invece, il deferente è caratterizzato da un andamento rettilineo (Blanco *et al*., 2007). Contrariamente a quanto avviene nei mammiferi, negli uccelli i dotti deferenti, nella loro porzione prossimale, sono il principale sito di stoccaggio del seme. Da tale sede, durante l'accoppiamento, il seme viene poi indirizzato alla cloaca (Sjaastad *et al*., 2010). La cloaca è la struttura che accoglie la porzione più distale sia del tratto gastroenterico che dell'apparato urogenitale ed è costituita da tre aree: coprodeo (in cui viene stoccato il materiale fecale), urodeo (dove sboccano gli ureteri e i deferenti) e proctodeo (Pollock and Orosz, 2002).

Nei passeriformi la porzione distale dei dotti deferenti si presenta convoluta (Wolfson, 1952), a formare i "glomeruli seminali", posti su entrambi i lati del proctodeo (Samour, 2016a). Durante la stagione riproduttiva questi aumentano di dimensioni al punto da far protrudere la parete cloacale fino a formare una struttura voluminosa conosciuta come "promontorio cloacale", che si trova a livello del margine dorsale dello sbocco cloacale (Blanco *et al*., 2009) e funge da sede di stoccaggio per gli spermatozoi (Girling, 2003; Pollock and Orosz, 2002) (Figura 2.1). La presenza di tale peculiare struttura condiziona la tecnica di raccolta del seme, che pertanto differisce leggermente dalla metodica utilizzata negli avicoli domestici.

In molte specie di uccelli, come nei rapaci, Columbiformi e Psittaciformi (O'Malley, 2005), non è presente un organo copulatorio e il trasferimento del seme avviene per apposizione degli sbocchi cloacali del maschio e della femmina (Girling, 2003). Tuttavia, in altre specie, è presente una appendice copulatoria assimilabile ad un fallo. Tale struttura è presente nei ratiti (struzzi, casuari, emù, nandù) e negli uccelli

acquatici (Jones and Dodd, 2012), ed è localizzata nella porzione ventrale del proctodeo (O'Malley, 2005).

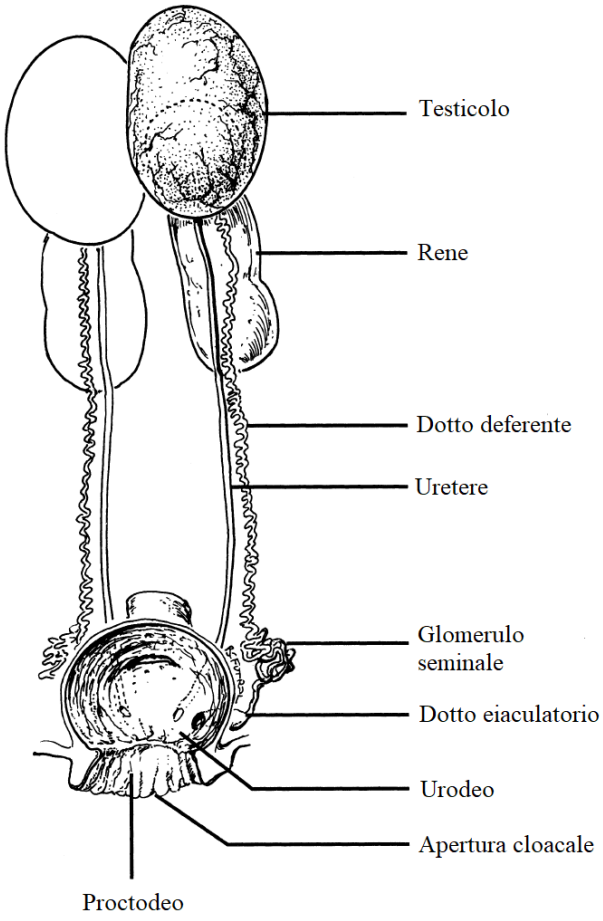


Figura 2.1: Anatomia dell'apparato riproduttore maschile (*Passeriformes*) (Pollock and Orosz, 2002).
Durante la stagione riproduttiva i testicoli aumentano di dimensioni, così come il sistema duttale. Il dotto deferente presenta un andamento differente a seconda della specie, ma possiede una struttura analoga in tutti gli uccelli. In particolare nei passeriformi la sua porzione distale è convoluta, a formare il "glomerulo seminale".

Si distinguono due tipologie di fallo: fallo intromettente (presente in appena il 3% delle specie di volatili) (Vizcarra *et al*., 2015) e fallo non intromettente. Il fallo non intromettente è presente nel pollo, nel tacchino e alcuni Passeriformi, ed è rappresentato da un tubercolo che, durante l'accoppiamento, facilita il passaggio del seme nell'ovidotto della femmina senza che vi sia una vera e propria intromissione. Il fallo intromettente è tipico di ratiti ed Anseriformi, presenta dimensioni notevoli e permette una vera e propria intromissione (O'Malley, 2005). In quest'ultimo caso, durante l'accoppiamento, il fallo si ingorga di linfa e protrude dalla cloaca. Esso è

percorso, sulla sua superficie dorsale, da un solco seminale in cui sboccano i deferenti e che permette il passaggio del seme nell'apparato riproduttore femminile (Girling, 2003). Il solco seminale è un carattere sessuale secondario il cui sviluppo dipende dall'influsso degli androgeni (Johnson, 1986). La superficie del fallo, inoltre, si presenta irregolare per la presenza di asperità e crenulazioni, che possono rendere difficoltosa la raccolta manuale del seme (come verrà approfondito di seguito) (Gee *et al*., 2004).

Gli uccelli mancano anche delle ghiandole genitali accessorie e questo fa sì che il volume di seme sia generalmente ridotto (O'Malley, 2005). Il fluido seminale deriva pertanto dai fluidi dei tubuli seminiferi e dalle secrezioni simil-linfatiche prodotte durante l'eccitazione sessuale (Sjaastad *et al*.; 2010).

In alcune specie di uccelli (72 specie appartenenti a 42 famiglie) sono state riscontrate delle ghiandole anali site esternamente ed internamente all'apertura cloacale (Quay, 1967) la cui funzione ancora è poco chiara. Queste sembrano differire istologicamente dalle ghiandole cloacali propriamente dette, presenti invece in altre specie, come la Quaglia del Giappone (*Coturnix japonica*).

Infatti, nella Quaglia del Giappone e nella Quaglia comune (*C. coturnix*) è presente una particolare ghiandola, a livello di proctodeo, che produce un secreto biancastro schiumoso e compatto (Cheng *et al*., 1989). Sembra che questa secrezione, mischiandosi al seme durante l'eiaculazione, ne incrementi la fertilità. Infatti è stato ipotizzato che tale schiuma, depositata a livello di proctodeo della femmina, funga da medium facilitando il trasporto degli spermatozoi lungo l'ovidotto (Cheng *et al*., 1989).

La ghiandola del proctodeo si ritrova solo nelle specie del genere *Coturnix* e il suo sviluppo è testosterone dipendente (Cheng *et al*., 1989), tuttavia una struttura simile è stata riscontrata anche nel pollo domestico e nel tacchino (Komarek, 1970). In essi, però, il secreto appare solo lievemente schiumoso e il reale effetto di questo sulla fertilità degli spermatozoi non è ancora stato chiarito completamente (Fujihara *et al*., 1985).

A seguito dell'eiaculazione, quindi, lo sperma viene depositato nell'apparato riproduttore femminile con modalità differenti a seconda della tipologia di fallo presente. Gli spermatozoi possono poi essere immagazzinati in peculiari strutture poste in corrispondenza della giunzione utero-vaginale dell'ovidotto della femmina, i cosiddetti "*sperm storage tubules"* (SSTs) (Gee *et al*., 2004). Si tratta di invaginazioni

dell'epitelio, caratterizzato da un singolo strato di cellule non ciliate (Johnson, 2015), presenti sia negli uccelli domestici che selvatici, compresi i rapaci come il Gheppio americano (*Falco sparverius*), Falco pellegrino (*Falco peregrinus*) e Gufo reale (*Bubo bubo*) (Blanco *et al*., 2009). Il numero, la dimensione e la distribuzione degli SSTs varia a seconda della specie (Gee *et al*., 2004).

È stato stimato che solo l'1-2% degli spermatozoi morfologicamente normali viene immagazzinato all'interno di questi tubuli e che il tempo di stoccaggio è di 7-14 giorni nel pollo e circa 10 giorni nel tacchino (Johnson, 2015). Gli SSTs garantiscono, non solo lo stoccaggio a lungo termine, ma anche la protezione degli spermatozoi dal sistema immunitario (Johnson, 2015).

A seguito di ogni ovideposizione gli spermatozoi vengono rilasciati dagli SSTs, permettendo di sfruttare più cicli di ovulazione con una singola eiaculazione o consentendo la fecondazione anche se l'accoppiamento è avvenuto lontano dall'ovulazione (Gee *et al*., 2004), incrementando di conseguenza la *fitness* riproduttiva. La presenza di tali SSTs può offrire un notevole vantaggio nei programmi di IA, permettendo di ridurre gli interventi inseminativi e ampliare la finestra utile per la fecondazione (Blanco *et al*., 2009).

Il meccanismo con il quale le cellule spermatiche vengono reclutate e rilasciate dagli SSTs non è stato ancora chiarito completamente, ma sembra che non dipenda dall'azione attiva dello sperma (Gee *et al*., 2004). Certo è che da tale sede gli spermatozoi devono ascendere lungo l'apparato riproduttore femminile fino all'infundibolo, che rappresenta un secondo sito di stoccaggio (Johnson, 2015), ma soprattutto il luogo in cui avviene la fecondazione (Gee *et al*., 2004).

L'interazione tra ormoni sessuali e riproduzione è stata studiata prendendo come modelli gli avicoli domestici o gli uccelli canori (*Passeriformes*). Per tale motivo per molti ordini di uccelli, tra cui *Falconiformes* e *Accipitriformes*, la fisiologia riproduttiva rimane in gran parte inesplorata. Poiché molte popolazioni di rapaci risentono dell'impatto derivante, ad esempio, da alcuni inquinanti ambientali che fungono da distruttori endocrini, la conoscenza della normale fisiologia riproduttiva in tali specie diviene essenziale (Blas *et al*., 2010).

"Lo sviluppo dei testicoli dipende in gran parte da "*releasing factors*" ipotalamici e dalla secrezione di ormoni gonadotropi. L'attività neurosecretoria ipotalamica, d'altro canto, è influenzata dallo stadio di maturazione sessuale (età) e da stimoli ambientali (in maggior misura dal fotoperiodo)" (Johnson, 1986).

Gli uccelli non domestici presentano un ciclo riproduttivo fortemente legato alla stagionalità. Così la produzione di spermatozoi si concentra solo in alcuni mesi all'anno, durante la stagione riproduttiva. Blas *et al*. (2010), scegliendo il Nibbio bruno (*Milvus migrans;* famiglia: *Accipitriformes*) come specie soggetto di studio, hanno riscontrato aumentati livelli di testosterone e androgeni già all'arrivo di questi rapaci nei territori di riproduzione e nidificazione. È possibile che ciò sia vero anche per altri rapaci migratori appartenenti anche ad altre famiglie, come il Falco pellegrino. È stato inoltre notato che nei rapaci, e altri uccelli, i livelli di LH e testosterone sono soggetti a fluttuazioni, con concentrazioni maggiori soprattutto all'inizio della stagione riproduttiva (prima della deposizione delle uova). Questo è coerente con la normale biologia riproduttiva, in cui il testosterone promuove la spermatogenesi e innesca il comportamento di corteggiamento, monta e costruzione del nido, che avvengono proprio nella prima parte della stagione riproduttiva, nonché il comportamento aggressivo di difesa del territorio (Meijer and Schwabl, 1989; Beletsky *et al*.,1995; Blas *et al*., 2010). La diminuzione dei livelli sierici di testosterone durante la cova sembra, invece, favorire il comportamento parentale.
In generale negli uccelli si hanno grandi differenze interspecifiche nei livelli di steroidi sessuali e tale variabilità sembra riflettere il livello di legame della coppia (Blas *et al*., 2010). Nelle specie tendenzialmente monogame, come il Nibbio e presumibilmente anche Falco pellegrino, Falco sacro e Girfalco, si hanno concentrazioni di tali ormoni inferiori rispetto alle specie poligame (Beletsky *et al*., 1995).
Le fluttuazioni stagionali nei livelli ormonali fanno sì che il testicolo attraversi diverse fasi di sviluppo prima di poter produrre spermatozoi fertili. La prima di queste fasi è la "fase di rigenerazione", in cui si assiste ad una rigenerazione dell'intero sistema duttale (dai tubuli seminiferi ai dotti efferenti che si connettono con l'epididimo) e delle cellule interstiziali. A questa segue la "fase di accelerazione", in cui le gonadotropine innescano la produzione spermatica e le cellule del Leydig incrementano la loro attività, aumentando di volume e accumulando nel citoplasma vacuoli lipidici. Al termine di quest'ultima fase si assiste alla piena gametogenesi e al completo sviluppo dell'apparato riproduttore maschile (Pollock and Orosz, 2002; King and McLelland,1984).

Benché molti aspetti della fisiologia riproduttiva dei rapaci, e degli uccelli in generale, siano simili a quelli dei mammiferi, apprezzare e conoscere le sottili differenze può aiutare a comprendere meglio quale impatto possono avere fattori esterni su tale

delicato meccanismo. Ad esempio, capire come alcune sostanze chimiche possano impattare sulla fisiologia, permetterà di mettere in atto misure idonee a garantire la normale riproduzione e di conseguenza la sopravvivenza di molte specie.

2.2 Fattori che influenzano la riproduzione negli uccelli

I fattori che influenzano la riproduzione e la fertilità negli uccelli, sia nel maschio che nella femmina, sono numerosi e complessi e coinvolgono fattori comportamentali e ambientali (Johnson, 1986).

"La riproduzione negli uccelli segue un preciso ciclo riproduttivo, il quale è controllato da fattori ambientali quali il fotoperiodo, la disponibilità di alimento e la temperatura. Nei climi temperati il fattore scatenante è l'aumento delle ore di luce primaverili, mentre nei climi aridi è l'avvento della stagione delle piogge che, portando ad un aumento delle risorse di cibo, segnala l'avvio del momento più favorevole della stagione, stimolando lo sviluppo delle gonadi (O'Malley, 2005).

Nelle aree a clima temperato gli accoppiamenti avvengono solo in un ristretto periodo dell'anno (primavera/inizio estate) (Meijer *et al*., 1992) e il fattore che maggiormente influenza la spermatogenesi è il fotoperiodo (Johnson, 1986). Esso ha un ruolo importante anche nel sincronizzare la muta e le migrazioni, concentrando tali avvenimenti nel periodo più favorevole dell'anno. (Coppack and Pulido, 2004). Nelle specie domestiche, se mantenute in ambienti con fotoperiodo artificiale e modulando la durata di esposizione alla luce, la ciclicità riproduttiva può essere ritardata o anticipata (Johnson, 1986), mentre nelle specie selvatiche tale ciclicità, sia nel maschio che nella femmina, dipende dal fotoperiodo naturale. Tuttavia la manipolazione del fotoperiodo per il controllo della riproduzione è stata sperimentata anche nel Falco pellegrino, in condizioni di stabulazione *indoor*, in cui l'incremento graduale delle ore di luce sembra aver dato risultati migliori rispetto al cambiamento repentino del fotoperiodo, solitamente utilizzato negli avicoli domestici (Nelson, 1972).

Nelle specie a riproduzione stagionale, la durata delle ore di luce e l'intensità luminosa ambientale sono in grado di agire sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, promuovendo la liberazione di *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) (del quale esistono due diverse isoforme negli uccelli) (Vizcarra *et al*., 2015). Perché l'informazione luminosa influisca sullo sviluppo delle gonadi, essa deve essere recepita da fotorecettori, i quali non comprendono solo quelli retinici, ma anche recettori extraretinici (Cassone and Kumar, 2015).

In una serie di esperimenti portati avanti dalla metà degli anni ’30, Benoit e colleghi evidenziarono che, in anatre rese cieche tramite enucleazione di entrambi i globi oculari, si continuava a manifestare una crescita testicolare al variare del fotoperiodo (Benoit and Assenmacher, 1954; Menaker, 1968). Studi successivi eseguiti sui passeri (*Passer domesticus*) portati avanti da Menaker e colleghi confermarono quanto osservato da Benoit (Menaker, 1968).

Sempre Benoit dimostrò che erano presenti fotorecettori extraretinici, siti a livello ipotalamico, coinvolti nella risposta “foto-sessuale” delle gonadi. (Menaker and Underwood, 1976). Successivamente sono state individuate altre strutture encefaliche funzionalmente fotorecettive (come la ghiandola pineale e l’area pre-ottica) (Figura 2.2), nelle quali sono stati individuati diversi fotopigmenti. Plausibilmente anch’esse potrebbero essere coinvolte nello sviluppo gonadico (Cassone and Kumar, 2015).

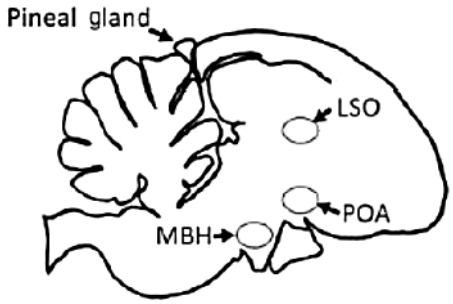


Figura 2.2: Rappresentazione schematica dell’encefalo di uccello, veduta sagittale (Cassone and Kumar, 2015).
Si ipotizza che i fotorecettori extraretinici siano localizzati a livello di: epifisi (Pineal gland), organo settale laterale (LSO), area pre-ottica (POA) e ipotalamo medio-basale (MBH).

Il reale meccanismo con il quale la luce arrivi a stimolare i fotorecettori encefalici non è stato ancora completamente compreso. Un’ipotesi sostiene che gli occhi fungano come una sorta di lente, che convoglia la luce in un punto specifico dell’orbita, e che da qui il segnale pervenga all’ipotalamo (Benoit, 1964). Un’altra teoria, invece, sostiene che l’informazione luminosa sia in grado di stimolare i fotorecettori encefalici attraversando i tessuti della scatola cranica (Menaker and Underwood, 1976).

Comunque è probabile che nello sviluppo delle gonadi siano coinvolti sia i fotorecettori superficiali (retinici) che i fotorecettori profondi (ipotalamici) (Benoit, 1964), ma il reale peso che ciascuna delle due componenti ha nella crescita del

testicolo, in risposta al variare del fotoperiodo, è ancora poco chiara e difficile da dimostrare.
Altri studi hanno fatto, però, emergere un possibile altro ruolo dei fotorecettori retinici. Infatti, sembra che le informazioni ottiche possano avere un'azione inibitoria sulla gonade, promuovendo la regressione testicolare (Johnson, 1986).
Quindi l'effettivo ruolo dei fotorecettori retinici è ancora dibattuto, ma è indubbia la loro importanza nello sviluppo del testicolo.
Nonostante le perplessità riguardanti l'effettivo meccanismo di attivazione, tutti concordano sul fatto che, con l'aumento delle ore di luce, i fotorecettori encefalici percepiscono il fotoperiodo crescente e trasducono l'energia luminosa in un segnale biologico. Questo stimola alcuni neuroni posti in prossimità dei fotorecettori ipotalamici, permettendo il rilascio di GnRH, il quale, attraverso il sangue, raggiunge l'ipofisi. Qui stimola la produzione di *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) e *Luteinizing Hormone* (LH) (O'Malley, 2005; Cassone and Kumar, 2015). L'FSH agisce a livello delle cellule del Sertoli, promuovendone la differenziazione, e stimolando così l'attività spermatogenica del tubulo seminifero. L'LH promuove l'attività steroidogenica delle cellule del Leydig (Johnson, 1986; Vizcarra *et al*., 2015). Quindi entrambi gli ormoni agiscono di concerto promuovendo la produzione spermatica, lo sviluppo testicolare e il conseguente aumento di dimensione della gonade durante la stagione riproduttiva (O'Malley, 2005).

In molte specie di uccelli lo sviluppo dei testicoli si può suddividere in due fasi fisiologiche: la fase di "fotosensibilità" in cui si ha una pronta risposta gonadica all'aumentare delle ore di luce e in cui si assiste allo sviluppo delle gonadi stesse, e la fase di "fotorefrattarietà" (Dawson and Sharp, 2007).
Per le specie delle medie-alte latitudini, al termine del periodo degli accoppiamenti (estate), si assiste ad una progressiva regressione dei testicoli e al calo della spermatogenesi nonostante il fotoperiodo sia ancora favorevole alla produzione spermatica. Questo sembra essere legato proprio alla "fotorefrattarietà" ipotalamica che si ha al termine della stagione riproduttiva (Johnson, 1986; Meijer *et al*., 1992; Coppack and Pulido, 2004). Tale fotorefrattarietà agisce sull'apparato riproduttore sia del maschio che della femmina, facendo cessare l'attività riproduttiva e preparando gli esemplari alla muta e alla migrazione verso i luoghi in cui essi sono soliti svernare (Beebe *et al*., 2005).

Non tutte le specie, però, manifestano lo stesso tipo di fotorefrattarietà. Gli uccelli che presentano una stagione riproduttiva breve sono caratterizzati da una fotorefrattarietà assoluta, in cui si assiste ad un calo drastico della concentrazione di GnRH. Tuttavia, la regressione dei testicoli precede la diminuzione di secrezione di GnRH. È quindi stato ipotizzato che altri fattori, come la prolattina, gli ormoni tiroidei (Proudman and Siopes, 2002) e il GnIH (*Gonadotropin Inhibitory Hormone*), agiscano prima sulla gonade, facendola regredire, e poi sull'ipotalamo facendo diminuire la concentrazione di GnRH (Dawson and Sharp, 2007).
Nelle specie con stagione riproduttiva lunga si ha una fotorefrattarietà relativa, in cui si ha solo un lieve calo della concentrazione di GnRH. In quest'ultimo caso è necessaria l'esposizione ad un fotoperiodo calante affinché si assista ad una regressione completa delle gonadi (Dawson and Sharp, 2007). Inoltre in queste specie, se nuovamente esposte a un fotoperiodo crescente si assiste ad un blocco nella regressione gonadica e conseguente recrudescenza. Ciò non si ha nelle specie con fotorefrattarietà assoluta, in cui, per avere nuovamente lo sviluppo del testicolo, è necessario attendere la stagione riproduttiva successiva (Vizcarra *et al*., 2015).

La disponibilità di alimento è un altro fattore fondamentale che determina l'inizio del periodo riproduttivo (Dawson and Sharp, 2007), e lo stato di nutrizione sembra influenzare il volume di seme, la sua qualità, la fertilità e la percentuale di schiusa negli avicoli domestici (Johnson, 1986). È stato notato nel Gheppio (*Falco tinnunculus*), che un buono stato di nutrizione e la supplementazione di alimento possono anticipare la deposizione e garantire nidiate più numerose (Meijer *et al*., 1990), mentre la restrizione alimentare può influire sui livelli di LH e corticosterone, mantenendoli a concentrazioni inferiori rispetto ad uccelli alimentati con un regime *ad libitum* (Dawson and Sharp, 2007; Meijer and Schwabl, 1989).
Murton e Westwood (1977) hanno cercato di capire se la temperatura influenzasse la ciclicità riproduttiva, agendo direttamente sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonade o, in modo indiretto, promuovendo una maggiore disponibilità di alimento.
La ciclicità riproduttiva è influenzata in modo variabile dalla temperatura, ma sembra che le temperature miti primaverili influenzino il periodo della prima deposizione. Tuttavia il reale ruolo della temperatura ambientale sullo sviluppo dell'apparato riproduttore sia nel maschio che nella femmina deve ancora essere chiarito (Dawson and Sharp, 2007), ma sicuramente agisce di concerto ad altri fattori nel determinare lo sviluppo delle gonadi.

In definitiva, temperatura, piovosità, abbondanza di risorse alimentari e interazioni sociali agiscono sul ciclo riproduttivo come segnali supplementari, concorrendo a regolare lo sviluppo delle gonadi e il periodo dell'accoppiamento, assieme al più importante segnale dato dal fotoperiodo (Coppack and Pulido, 2004; Young *et al*., 2009).

Dal momento che la riproduzione negli uccelli è legata a numerosi fattori esterni, il mutamento di uno di questi può comportare alterazioni della ciclicità riproduttiva più o meno rilevanti. La pressione antropica, l'inquinamento luminoso e i cambiamenti climatici, ad esempio, possono portare a una mancata sincronizzazione tra fotoperiodo e disponibilità di alimento (anticipando il periodo degli accoppiamenti in un momento in cui le risorse alimentari non sono ancora sufficienti). Talvolta questo può spingere gli uccelli verso nuovi siti riproduttivi, in cui a loro volta le condizioni ambientali sono differenti rispetto ai siti canonici, influendo in misura diversa sugli accoppiamenti, la deposizione e le nascite. (Coppack and Pulido, 2004).

2.3 Caratteristiche degli spermatozoi degli uccelli

Gran parte delle informazioni che attualmente possediamo riguardo la struttura degli spermatozoi degli uccelli risalgono ai primi studi effettuati da Ballowitz e Retzius tra la fine dell'800 e gli inizi del '900 (Jamieson, 2007), che ancora rivestono una notevole importanza nell'ambito della spermatologia aviaria, seguiti da uno studio più approfondito di McFarlane (1963).

Normalmente la dimensione degli spermatozoi negli uccelli rientra in un *range* compreso tra 30-300 μm (dall'apice della testa all'estremità distale del flagello) e non sembra correlata con la dimensione dell'animale (Blanco et al., 2009).
Generalmente presentano una forma allungata, la quale viene raggiunta al termine della spermiogenesi. Infatti, è in questa fase che si viene a formare un sistema di microtubuli attorno al nucleo che determinerà poi la forma definitiva dello spermatozoo maturo (Santiago-Moreno *et al*., 2016).
Benché gli spermatozoi aviari abbiano in comune tale caratteristica e possano essere suddivisi, come quelli dei mammiferi, in quattro regioni principali (acrosoma, testa, segmento intermedio e coda), già dagli studi di Ballowitz e Retzius è emersa un'enorme variabilità morfologica tra i gameti maschili delle diverse specie

(Jamieson, 2007). Tali differenze morfologiche, così come il diverso rapporto tra le varie strutture, sono poi diventate un efficace strumento tassonomico (Birkhead *et al*., 2006).

In base alla loro struttura le cellule spermatiche degli uccelli possono essere suddivise in due categorie (Gee *et al*., 2004): "*sauropsidi*" ed "*elicoidali*".
Gli spermatozoi di tipo sauropside (filogeneticamente più primitivi) sono tipici degli uccelli non passeriformi (che comprendono numerosi ordini, tra i quali *Galliformes*, *Anseriformes*, *Columbiformes*, *Psittaciformes*, *Falconiformes*, *Accipitriformes* e *Strigiformes*) e sono caratterizzati da una struttura relativamente semplice, simile a quella dei mammiferi, nonostante la testa si presenti maggiormente affusolata, con forma variabile, da cilindrica fino a falciforme (Gee *et al*., 2004; Aire, 2014) (Figura 2.3 e 2.4). Un'eccezione è rappresentata dal Gheppio americano (*Falco sparverius*), appartenente all'ordine dei *Falconiformes*, i cui spermatozoi presentano una caratteristica forma rotondeggiante (4-8 µm) (Gee *et al*., 1993).
Gli spermatozoi sauropsidi presentano un acrosoma, generalmente bottoniforme o conico, posto come una sorta di cappuccio all'estremità craniale della testa (Pollock and Orosz, 2002). Pertanto non la avvolge, come invece accade per l'acrosoma dei mammiferi (Pollock and Orosz, 2002). Al contrario, gli spermatozoi elicoidali, che si trovano nei passeriformi, possiedono una testa molto più allungata, con andamento spiralato, un acrosoma che segue tale andamento e un segmento intermedio anch'esso allungato (Birkhead *et al*., 2006) (Figura 2.3).

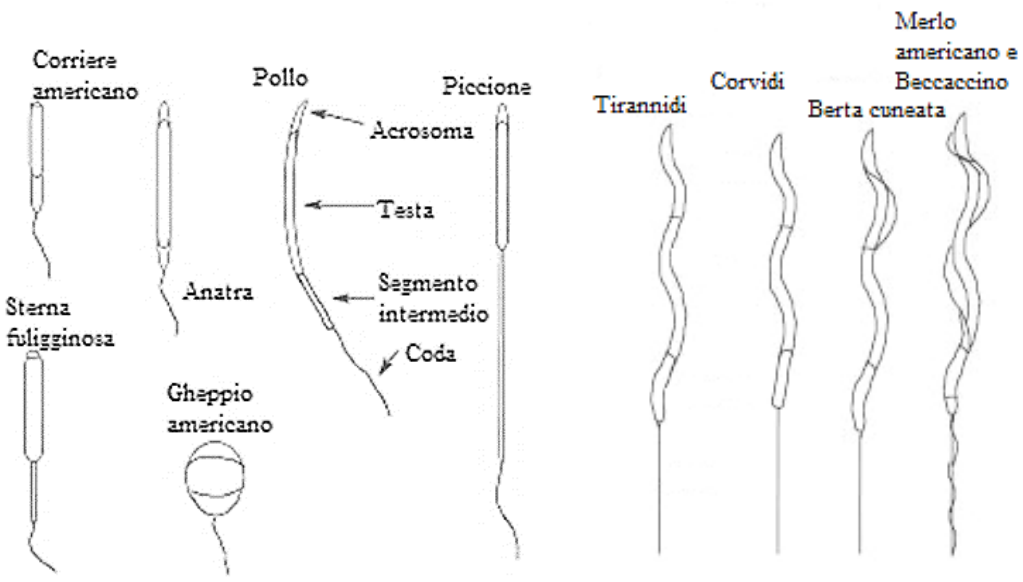


Figura 2.3: Tipologie spermatiche negli uccelli (Gee *et al*., 2004). A sinistra sono rappresentati gli spermatozoi di tipo sauropside. A destra gli spermatozoi di tipo elicoidale, tipici dei passeriformi.

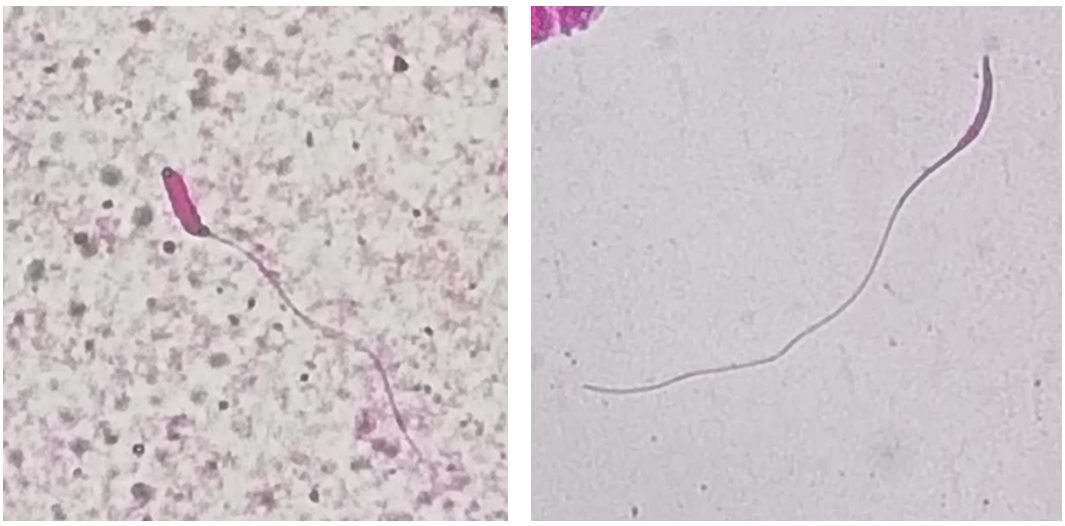


Figura 2.4: Esempi di spermatozoi di tipo sauropside. A sinistra Falco pellegrino (*F. peregrinus*), a destra Astore (*Accipiter gentilis*).
Microscopio ottico, ingrandimento 400X. Colorazione: Rosa Bengala.

Tale differenza fu confermata in studi successivi di microcopia elettronica, iniziati da Grigg and Hodge (1949) e Furieri (1961) (Jamieson, 2007) che permisero, inoltre, di distinguere gli spermatozoi dei passeriformi in due sottocategorie, quella degli "oscini" e dei "sub-oscini" (Aire, 2014). Gli oscini rappresentano i passeriformi in *sensu strictu*, caratterizzati da spermatozoi con testa elicoidale, acrosoma di grandi dimensioni anch'esso spiraliforme, che frequentemente presenta una evaginazione laterale chiamata membrana elicoidale (Aire, 2014). Mentre la struttura degli spermatozoi dei sub-oscini sembra avere caratteristiche intermedie tra i passeriformi e i non passeriformi, ma pochi studi sono stati fatti riguardo tali specie (Aire, 2014).

Nel punto di transizione tra testa e flagello è presente il collo dello spermatozoo, difficile da individuare al microscopio ottico. Esso è sede del complesso centriolare, che, nei non passeriformi e nei sub-oscini, è costituito da un centriolo prossimale e da uno distale (che funge da corpo basale per il flagello). Mentre negli oscini è presente solo il centriolo distale (Batocco, 2015).
Il flagello è costituito da un segmento intermedio, un tratto principale ed un tratto distale.
Come per la testa e l'acrosoma, anche il segmento intermedio mostra delle differenze tra le due categorie spermatiche e tra le diverse specie di una stessa categoria. Nei non passeriformi (compresi i rapaci) il tratto intermedio appare come un manicotto che avvolge l'apparato centriolare e la porzione prossimale dell'assonema (Batocco, 2015). Esso rappresenta la sede in cui sono distribuiti i mitocondri, che forniscono

energia per la motilità spermatica. Proprio il diverso numero di mitocondri nelle varie specie rende il segmento intermedio il componente dello spermatozoo più variabile (Blanco *et al*., 2009).
Questo suggerisce che l'energia richiesta per la motilità e la sopravvivenza dello spermatozoo all'interno dell'apparato riproduttore femminile è specie-specifica (Blanco *et al*., 2009).
Anche il tipo di movimento presenta delle differenze. Infatti nelle cellule sauropsidi la progressione dello spermatozoo è permessa da movimenti oscillanti della testa, mentre gli spermatozoi elicoidali ruotano rapidamente lungo il proprio asse longitudinale (Pollock and Orosz, 2002).

Indipendentemente dalla differenza morfologica tra gli spermatozoi dei passeriformi e dei non passeriformi, il seme degli uccelli è caratterizzato frequentemente da un elevato grado di pleomorfismo, in particolare nei rapaci. Questo è legato sia all'esistenza di forme immature, sia alla presenza di diverse sottopopolazioni di cellule mature o di anomalie morfologiche nelle stesse (Santiago-Moreno *et al*., 2016).
In particolare tali anomalie possono essere dovute ad inquinanti ambientali, i quali interferiscono con il rimodellamento della cromatina o danneggiano l'integrità dell'acrosoma (Santiago-Moreno *et al*., 2016). Tuttavia, gran parte delle anomalie sono reperti molto frequenti in alcune specie, anche in assenza di agenti causali esterni.
Sembra, infatti, che le abitudini riproduttive di una specie (monogamia vs poliginia/poliandria) influenzino le caratteristiche morfologiche e funzionali degli spermatozoi (Santiago-Moreno *et al*., 2016). Le specie tendenzialmente monogame (come i rapaci) presentano una più alta percentuale di anomalie spermatiche e forme immature (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Mentre le specie poligame, come i galliformi, presentano una maggiore omogeneità spermatica.
In condizioni di poligamia si assiste ad una intensa competizione spermatica che comporta la selezione post copulatoria degli spermatozoi più performanti. L'omogeneità morfologica, la presenza di teste molto allungate e la maggiore velocità di movimento garantiscono un vantaggio nella competizione spermatica che caratterizza le specie poligame (Santiago-Moreno *et al*., 2016).

3. RACCOLTA DEL SEME

La raccolta del seme da esemplari che si desidera far contribuire geneticamente alla popolazione diviene il punto chiave nel mantenimento della diversità genetica (Ballou, 1984), sia nell'ambito dei programmi di conservazione che nel contesto dell'allevamento.

La messa a punto di efficaci tecniche di raccolta del seme dagli uccelli ha come scopo l'utilizzo dell'eiaculato nell'inseminazione artificiale, la cui implementazione è pertanto progredita di pari passo.

Il primo ad ottenere materiale seminale da un uccello fu Ivanov nel 1913, che raccolse il seme direttamente dai deferenti di pollo domestico (*Gallus gallus*) dopo l'abbattimento dell'animale stesso (Burrows and Quinn, 1937). Negli anni successivi Payne (1914); Craft, McElroy and Penquite (1926) e Jull and Quinn (1931) raccolsero direttamente l'eiaculato dalla cloaca della femmina immediatamente dopo l'accoppiamento (Burrows and Quinn, 1937). Burrows e Quinn, nel 1935, idearono un'efficace tecnica di raccolta del seme nel pollo domestico, che prevedeva il massaggio della regione pubico-addominale del maschio (Burrows and Quinn, 1935).

Da allora, soprattutto nell'ambito degli avicoli domestici, le modalità di raccolta del seme e le tecniche di inseminazione artificiale si sono evolute per meglio adattarsi ai diversi contesti, alle differenti specie e alle dimensioni degli animali, diventando procedure consolidate (Samour, 2016a).

Inoltre, hanno trovato impiego nei programmi di riproduzione in cattività di specie selvatiche. Per queste ultime è stato necessario anche adattarsi alla stagionalità che le caratterizza, concentrando la raccolta durante la stagione riproduttiva, generalmente breve (30-120 giorni) (Blanco *et al*., 2009). Le tecniche di raccolta più utilizzate comprendono il metodo cooperativo, la tecnica del massaggio addominale manuale e la stimolazione elettrica (elettroeiaculazione) (Samour, 2016a).

Per quanto concerne i rapaci è assai frequente che gli esemplari siano imprintati con l'uomo e che, di conseguenza, accettino il falconiere come potenziale partner (Platt *et al*., 2007). In tale contesto, l'imprinting può risultare vantaggioso e viene sfruttato sia per facilitare la raccolta del seme che per rendere più agevole l'inseminazione artificiale, prediligendo così tecniche in cui il contenimento dell'animale è minimo.

Benché vantaggioso, per quanto riguarda l'inseminazione artificiale, è sconsigliato l'utilizzo di animali imprintati se gli obbiettivi sono la formazione di coppie per l'accoppiamento naturale (Platt *et al*., 2007) o la reintroduzione in natura della prole.

Il seme, quindi, può essere ottenuto praticamente da qualsiasi maschio sessualmente maturo, purché si rispetti il suo naturale ciclo riproduttivo e si minimizzi lo stress legato alla raccolta. In generale è difficile ottenere idonee quantità di eiaculato da maschi che si accoppiano abitualmente con la partner, dal momento che la porzione distale dei dotti deferenti, in cui viene stoccato il seme, viene continuamente svuotata (Lierz, 2008). Quindi è utile mantenere i maschi scelti come riproduttori separati dalle femmine, in modo da poter raccogliere quantità sufficienti di materiale da poter utilizzare anche su più femmine riproduttrici.

3.1 Metodo cooperativo

Il metodo cooperativo è stato sviluppato in falconeria, con lo scopo di raccogliere campioni di seme da diverse specie di rapaci mediante l'utilizzo di uccelli imprintati (Temple, 1972; Berry, 1972, Grier, 1973). Tali esemplari vengono allevati a mano in cattività, a stretto contatto con il falconiere, che interagisce costantemente con essi, soprattutto con stimoli vocali (fondamentali per instaurare un legame), presentando cibo e imitando con la mano i movimenti dell'animale (Boyd and Schwartz, 1991).
Negli uccelli selvatici l'utilizzo di stimoli comportamentali, per innescare la produzione di seme e la monta, risulta migliore rispetto alla manipolazione del fotoperiodo, dal momento che quest'ultimo può indurre un accorciamento del periodo riproduttivo (Boyd and Schwartz, 1991).
Con l'avvicinarsi della stagione riproduttiva le interazioni tra falco e falconiere diventano più intense, con lo scopo di sollecitare l'accoppiamento, simulando il corteggiamento (Samour, 2016a). L'uccello, quindi, monta volontariamente un particolare dispositivo (generalmente un cappello apposito indossato dal falconiere), dal quale poi è possibile raccogliere l'eiaculato che si incanala in una apposita scanalatura o nelle cavità a nido d'ape presenti sulla superficie del dispositivo stesso (Boyd and Schwartz, 1991; Enderson *et al*., 1998; Blanco *et al*., 2009) (Figura 3.1). Tali cappelli frequentemente hanno *design* diversi a seconda della specie con la quale vengono utilizzati e spesso sono realizzati *ad hoc* dai falconieri a seconda delle esigenze (Boyd and Schwartz, 1991). Nelle aquile e in altri rapaci di grandi dimensioni

l'eiaculazione non si verifica su dispositivi di questo tipo, ma spesso avviene direttamente sulla mano dell'operatore (Grier, 1973).

Figura 3.1: Cappello utilizzato per la raccolta del seme mediante metodo cooperativo nei rapaci (Samour, 2016). La peculiare struttura a nido d'ape facilita la raccolta del materiale seminale che vi si accumula.

Grazie a questa tecnica il contenimento dell'animale è assente, e ciò garantisce il minimo stress, permettendo di ottenere campioni di discreta qualità, con scarsa contaminazione da parte di feci e urati. Nonostante tali vantaggi è stato riportato che alcuni esemplari possono esprimere il comportamento di copula senza produrre eiaculato (Blanco *et al*., 2009). Inoltre, servirsi di tale tecnica richiede l'utilizzo di riproduttori imprintati e abituati a montare su questo tipo di dispositivi, è necessario quindi un *training* che richiede molto tempo (Lierz, 2008).

In altre specie di uccelli sono stati impiegati metodi differenti che si sono dimostrati altrettanto efficaci, ma che in alcuni contesti non si sono rivelati di semplice applicabilità. Nell'Anatra muta (*Cairina moschata*) sono state impiegate con successo cloache artificiali (Gvaryaku *et al*., 1984), mentre nel Diamante mandarino (*Taeniopygia guttata*) sono stati utilizzati dei manichini (Pellatt and Birkhead, 1994). Un metodo simile è stato ideato per la raccolta del seme nell'Ubara africana (*Chlamydotis undulata*), in cui i maschi sono stati abituati a montare manichini costituiti da una base di legno, su cui era stata montata la pelle conciata e le piume di Ubara (Saint Jalme *et al*., 1994). Manichini e femmine *teaser* sono state utilizzate anche nello Struzzo (*Struthio camelus*), ma l'efficacia nella raccolta del seme è largamente legata al temperamento del maschio e alla sua capacità di accettare l'operatore preposto alla raccolta stessa (Rybnik *et al*., 2007).

3.2 Tecnica del massaggio

La raccolta del seme mediante massaggio manuale è stata dapprima utilizzata negli avicoli domestici da Burrows e Quinn (1935). Tale metodica prevedeva il coinvolgimento di due operatori, uno che contenesse l'animale e uno che lo stimolasse mediante un massaggio manuale (Burrows and Quinn, 1935). Il massaggio prevedeva la leggera pressione delle dita lungo la carena e a livello dell'addome, fino a portarsi verso l'apertura cloacale dell'uccello. Questa stimolazione era in grado di indurre l'eiaculazione (Burrows and Quinn, 1935). Fu notato, inoltre, che l'emissione del seme avveniva subito dopo che l'uccello fletteva ventralmente la coda in risposta alla stimolazione manuale, così come avveniva nell'accoppiamento naturale, a dimostrazione del fatto che la metodica era in grado di innescare una risposta molto simile a quella fisiologica (Burrows and Quinn, 1935).

La tipologia di massaggio proposta da Burrows e Quinn, ha subito poche modifiche, vista la sua efficacia. Tuttavia, nel tempo sono state introdotte alcune varianti.

Infatti, un'altra pratica comune è quella di eseguire il massaggio partendo direttamente dalle regioni laterali dell'addome, portandosi verso la regione pelvica e la coda. Ai primi segni di risposta da parte dell'animale, l'operatore che esegue il massaggio utilizza la mano libera per flettere la coda dell'uccello per meglio esporre la cloaca, mentre l'altra mano insiste con la stimolazione in prossimità della cloaca stessa (Gee, 1983). L'animale, quindi, risponde con l'eversione cloacale e l'eiaculazione.

Per raccogliere le prime gocce di eiaculato è necessario avvolgere con pollice e indice l'apertura cloacale ed eseguire una leggera pressione a livello del suo margine dorsale (Gee *et al*., 2004).

La tecnica è stata applicata sistematicamente nell'ambito dell'allevamento avicolo, soprattutto del tacchino (Christensen and Bagley, 1989), ed è stata poi adattata anche alle specie non domestiche (Gee and Temple, 1978), con modifiche riguardanti soprattutto il contenimento dell'animale, il posizionamento dello stesso durante la procedura e il tipo di movimento eseguito per la stimolazione (Gee, 1983). Attualmente rimane uno dei metodi più versatili per la raccolta del seme nelle specie selvatiche non imprintate (Gee *et al*., 2004), richiedendo un *training* molto più breve rispetto al metodo cooperativo (Gee and Temple, 1978) e garantendo un minimo stress per l'animale. Infatti, benché l'esemplare venga immobilizzato durante la proceduta, il tempo necessario all'eiaculazione è estremamente ridotto, attorno ai 5-10 secondi

(Gee, 1983). Tuttavia l'efficacia della raccolta dipende molto dall'abilità dell'operatore che esegue la procedura.

La tecnica del massaggio addominale ha reso possibile la raccolta efficace del seme in molte specie selvatiche tra cui anatre (Penfold *et al*., 2001), fagiani (Saint Jalme *et al*., 2003), columbiformi (Owen, 1941; Cheng *et al*., 2002.; Sontakke *et al*., 2004), gru e cicogne (mantenute in stazione in virtù della loro dimensione e della peculiare anatomia) (Gee *et al*., 2004), Guan fischiatore gola blu (*Pipile cumanensis cumanensis)* (DeMatteo *et al*., 2004) e Pinguino saltarocce (*Eudyptes chrysocome*) (Waldoch *et al*., 2007; Waldoch *et al*., 2012).
Nei passeriformi è possibile ottenere il campione di seme esercitando una leggera pressione in corrispondenza del promontorio cloacale, dove viene stoccato il materiale seminale (Samour, 2016a). L'uccello viene immobilizzato con una sola mano e viene eseguita una stimolazione a livello dell'addome e in prossimità della coda (Gee *et al*., 2004). Con l'indice e il pollice della stessa mano si applica una lieve compressione a livello dell'apertura cloacale. In questo modo si ha l'eversione del proctodeo e l'esposizione dei glomeruli seminali e si può, quindi, procedere con la raccolta del campione (Wolfson, 1952; Gee *et al*., 2004; Kucera and Heidinger, 2018) (Figura 3.2).

Figura 3.2: Tecnica di contenimento e stimolazione del promontorio cloacale in passeriforme (Kucera and Heidinger, 2018).

Il massaggio addominale è stato utilizzato anche nei pappagalli (Stelzer *et al*., 2005) come Calopsita (*Nymphicus hollandicus*) (Neumann *et al*., 2013), Parrocchetto ondulato (*Melopsittacus undulatus*), nel quale sono presenti i glomeruli seminali e, pertanto, il seme può essere raccolto con la medesima tecnica applicata sui passeriformi (Samour *et al*., 1986b), Parrocchetto monaco (*Myiopsitta monachus*)

(Anderson *et al*., 2002), Amazzone di Hispaniola (*Amazona ventralis*) (Brock, 1991), Amazzone fronte blu (*Amazona aestiva aestiva*) (Della Volpe *et al*., 2011) e diverse altre specie di Psittaciformi (Lierz *et al*., 2013).
I pappagalli di grandi dimensioni sono difficili da manipolare e possono provocare gravi ferite con il forte becco. Ecco che in queste specie sono stati ideati dei sistemi di contenzione costituiti da tubi di plastica rigida (Gee *et al*., 2004), stretti abbastanza da impedire i movimenti dell'animale, senza però comprometterne la respirazione, e lunghi a sufficienza da lasciare esposta solo la coda e la cloaca, che risulterà quindi approcciabile durante la stimolazione manuale.

Nei ratiti, come negli uccelli acquatici, la presenza del fallo rende più complicata la raccolta dell'eiaculato. Durante l'eccitazione sessuale o la stimolazione data dal massaggio, il fallo si ingorga di linfa e va in erezione (Gee, 1983). Un operatore deve estroflettere manualmente il fallo dall'apertura cloacale e stimolarlo. Con l'eiaculazione il seme corre lungo il solco seminale o lungo le crenulazioni sulla sua superficie, pertanto può essere raccolto dalla punta del fallo stesso con un imbuto, una provetta o altri dispositivi (Gee, 1983). Proprio la presenza delle crenulazioni può, però, creare problemi durante la raccolta, soprattutto se il volume di eiaculato è esiguo. Si consiglia, quindi, di utilizzare dispositivi in grado di aspirare il seme insinuatosi negli anfratti della superficie peniena (Gee *et al*., 2004).

Nei rapaci la tecnica del massaggio viene frequentemente utilizzata poiché permette di ottenere campioni di seme anche da animali non imprintati.
Esistono diverse varianti della metodica, che differiscono a seconda della specie considerata e del contesto, e che possono coinvolgere uno o più operatori (Weaver, 1991).
Il falco viene dapprima incappucciato per isolarlo dagli stimoli circostanti e ridurre conseguentemente lo stress (Samour, 2016a; Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016). Quindi viene avvolto in un asciugamano morbido per facilitare l'operazione successiva, evitando che ferisca sé stesso o l'operatore che dovrà contenerlo (Cade *et al*., 1977; Weaver, 1991; Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016). Una volta immobilizzato, il falco viene sistemato in posizione sternale su un ripiano morbido (Cade *et al*., 1977; Weaver, 1991) oppure posto in decubito dorsale (Lierz, 2008). In quest'ultima modalità un operatore, seduto, pone il dorso dell'animale sulle proprie gambe, in modo da afferrare saldamente i tibiotarsi del falco ed evitare, così, che

l'animale utilizzi gli artigli come strumenti di offesa (Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016) (Figura 3.3). Inoltre gli arti dell'animale vengono divaricati per facilitare l'accesso all'addome. A questo punto un secondo operatore può iniziare la stimolazione. Essa prevede l'esecuzione di un massaggio, che inizia con la stimolazione del dorso dell'animale, per poi portarsi caudo-lateralmente verso la coda dell'uccello (Cade *et al*., 1977).

Contemporaneamente, con l'altra mano, si inizia il massaggio addominale, muovendo le dita dalla carena dello sterno ad entrambi i lati dell'addome, fino alle ossa pelviche, e da qui verso l'apertura cloacale. In prossimità della cloaca la pressione esercitata dalle dita aumenta gradatamente in modo da far protrudere la papilla esterna del dotto deferente (Weaver, 1991; Blanco *et al*., 2009; Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016). Con il pollice e l'indice si mantiene la pressione in prossimità della papilla fino a che non compaiono le prime gocce di seme. Quest'ultimo può essere raccolto, generalmente mediante l'utilizzo di capillari di vetro (Figura 3.4), facendo attenzione a non lesionare la delicata mucosa, provocandone il sanguinamento (Weaver, 1991).

La stessa metodica può essere eseguita anche da un singolo operatore che, una volta posizionato il dorso dell'animale sulle proprie gambe, afferra gli arti del falco con le dita della mano sinistra e con la destra può iniziare il massaggio addominale (Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016).

Figura 3.3: Raccolta del seme da Girfalco (*Falco rusticolus*) mediante massaggio addominale (Samour, 2016a).

Figura 3.4: Raccolta del campione seminale di Girfalco (*Falco rusticolus*) direttamente dalla cloaca mediante l'utilizzo di un capillare di vetro (Samour, 2016a).

Per i rapaci di piccole dimensioni, come il Gheppio, la tecnica per il prelievo del seme è differente, in gran parte dovuto alla taglia dell'animale (Samour, 2016a). L'operatore che esegue la procedura indossa un apposito guanto che lascia scoperti pollice e indice. Queste dita saranno coinvolte nel massaggio (Gee *et al*., 2004).
L'uccello viene afferrato per le cosce lasciando le ali libere di muoversi, come avverrebbe in una monta naturale. Quindi l'operatore pone la mano libera sul dorso dell'animale iniziando a massaggiare delicatamente l'area del pigostilo e l'addome laterale, portandosi verso la pelvi. Una volta che si ottiene la protrusione della papilla, la coda viene spostata dorsalmente per facilitare l'accesso allo sbocco cloacale e permettere una più agevole raccolta del seme (Bird *et al*., 1976).
La tecnica del massaggio è stata applicata anche nelle aquile e avvoltoi, i quali però richiedono una stimolazione più vigorosa per la presenza di un forte muscolo cloacale (Gee *et al*., 2004; Umapathy *et al*., 2005)

Il massaggio addominale è efficace e versatile, ma è stato notato che la percentuale di contaminazione da urati è maggiore (Blanco *et al*., 2002a). Tuttavia, prestando attenzione durante la raccolta, è possibile eliminare la porzione contaminata o sospendere la raccolta nel momento in cui si vede comparire il seme di colore biancastro, segno della presenza di urati.

3.3 Elettroeiaculazione

Il primo studio riguardante la raccolta del seme mediante stimolazione elettrica fu eseguito da Serebrovskii e Sokolovskaja nel 1934 (Samour, 2016a). Da allora gli studi riguardanti l'utilizzo dell'elettroeiaculazione nelle specie aviare sono stati pochi ed hanno riguardato soprattutto anatre e oche (Frediani *et al*., 2019). In queste ultime, però, sembra aver dato esiti molto soddisfacenti, dal momento che è stato riportato un più alto numero di spermatozoi e un volume maggiore di seme rispetto a quanto ottenuto mediante massaggio addominale (Gee, 1983). In virtù di questi risultati incoraggianti, la stimolazione elettrica è stata successivamente applicata nei piccioni e grandi pappagalli (Gee *et al*., 2004; Lierz *et al*., 2013). Proprio gli ultimi studi riguardo i pappagalli, portati avanti da Lierz e colleghi (2013), hanno riacceso l'interesse per tale metodica di prelievo.
Mentre il metodo cooperativo e il massaggio manuale richiedono il *training* dell'animale per poter ottenere un campione di buona qualità, la raccolta del seme tramite elettroeiaculazione non richiede nessun tipo di preparazione (Gee, 1983). Per tale motivo questo tipo di tecnica può essere utilizzata in quei contesti in cui si vuole ottenere materiale seminale da uccelli selvatici, difficili da contenere, permettendo una notevole riduzione dello stress dovuto alla manipolazione (Gee *et al*., 2004).

Per la sua esecuzione sono necessari dei dispositivi elettrici, di varia fattura. Le sonde cloacali contengono entrambi gli elettrodi e sono efficaci anche a basso amperaggio (Gee *et al*., 2004). Tali sonde vengono inserite all'interno della cloaca e poste a contatto con la superficie dorsale della stessa (Frediani *et al*., 2019). La stimolazione elettrica viene applicata per 1-2 secondi a diversi intervalli di tempo, distanziati l'uno dall'altro da 2-5 secondi in cui non si ha passaggio di corrente. Il voltaggio varia a seconda della specie e della dimensione dell'animale (1-14 volt) ed incrementa dopo ogni intervallo (Lierz *et al*., 2016). A seguito di tale stimolazione si assiste alla contrazione della muscolatura cloacale cui segue l'eiaculazione (Lierz *et al*., 2016), in cui il seme fluisce sulla superficie della sonda. In questo modo, però, una parte dell'eiaculato viene persa, dal momento che rimane adeso al dispositivo cloacale. Quindi, per evitare ciò, è possibile utilizzare delle sonde esterne (Gee *et al*., 2004).
Nonostante le enormi potenzialità, tale metodica è ancora poco utilizzata (Gee *et al*., 2004). Essa, infatti, presenta diversi svantaggi che ne hanno compromesso l'implementazione e l'applicazione sistematica.

Uno dei principali problemi risiete nella grande eterogeneità di taglia che caratterizza i diversi uccelli, e che rende necessaria la costruzione di sonde *ad hoc* per ogni singola specie. Frequentemente, poi, i campioni ottenuti possono presentarsi gravemente contaminati da parte di feci e urine (Frediani *et al*., 2019), rendendo il seme non idoneo per l'inseminazione (Samour, 2016a).
A questo si aggiunge il rischio, durante la procedura, di danno ai tessuti, fino all'ustione, dovuta generalmente a sonde troppo piccole rispetto alla taglia dell'animale o ad eccessivo amperaggio (Gee *et al*., 2004).
Inoltre, per poter essere eseguita, è necessaria la sedazione dell'esemplare (Frediani *et al*., 2019) e ciò fa sì che l'elettroeiaculazione non possa essere attuata sul campo. Questo comporta che l'animale debba essere trasportato ad una struttura veterinaria, e già solo il trasporto può rappresentare una fonte di stress.
Tuttavia, negli ultimi studi eseguiti sui pappagalli, è stato dimostrato che la metodica può essere applicata sugli animali anche senza sedazione (Lierz *et al*., 2013), ottenendo ottimi risultati.

Indipendentemente dal tipo di tecnica utilizzata per ottenere il materiale seminale, questo può essere raccolto mediante diversi dispositivi, come tubi capillari (Weaver, 1991), siringhe, pipette (Gee, 1983) e piastre di Petri (Saint Jalme *et al*., 1994), e deve essere fatto nel più breve tempo possibile per evitare che si disidrati, soprattutto se il volume di eiaculato è esiguo (Gee, 1983). In quest'ultimo caso può essere utile addizionare qualche goccia di *extender* per evitare il disseccamento.

4. VALUTAZIONE DELL'EIACULATO

L'eiaculato è costituito da due componenti: gli spermatozoi e il fluido seminale (World Health Organization, 2010), che negli uccelli deriva dai tubuli seminiferi e da secrezioni simil-linfatiche.

La presenza di un epididimo rudimentale e l'assenza di ghiandole genitali accessorie, fanno sì che la composizione e le caratteristiche fisiche dell'eiaculato negli uccelli, differiscano da quelle dei mammiferi (Johnson, 1986). Nonostante ciò, la composizione del fluido seminale e le caratteristiche spermatiche come vitalità, motilità e morfologia sono importanti per la funzione spermatica stessa (World Health Organization, 2010). Questi ultimi parametri riflettono lo stato riproduttivo del maschio e la sua fertilità (Allen and Champion, 1955). Ecco che diventa, quindi, indispensabile la loro valutazione, soprattutto quando si vogliono intraprendere attività di inseminazione artificiale e crioconservazione. Tuttavia, ciò può risultare complicato per l'assenza di informazioni in tal senso nelle diverse specie di uccelli.

A questo si aggiunge l'enorme differenza interspecifica ed individuale nelle caratteristiche spermatiche (Boyd and Schwartz, 1991). Tale variabilità è legata anche alla tecnica di raccolta, alle condizioni generali del maschio, allo stato di nutrizione e tipo di dieta, al clima e agli inquinanti (Blanco *et al*., 2007).

Ad esempio, nel Falco pellegrino, è stato riscontrato che il volume di eiaculato, la concentrazione spermatica, la motilità e la percentuale di spermatozoi vitali sono influenzati dalla frequenza con cui avviene la raccolta del seme. Infatti, aumentando tale frequenza da 2 a 3 volte al giorno, il volume totale di eiaculato aumenta, mentre diminuisce in modo significativo il valore di cellule/µl e cellule/eiaculato (Hoolihan and Burnham, 1985), ed è plausibile che ciò avvenga anche per altre specie.

Anche il periodo di produzione spermatica differisce tra specie, aggirandosi in media attorno 74-103 giorni nel Gheppio americano (*Falco sparverius*), 95 giorni nel Falco pellegrino (Hoolihan and Burnham, 1985; Blanco *et al*., 2007) e fino a 110 giorni nelle aquile (Blanco *et al*., 2007). Inoltre, le caratteristiche spermatiche cambiano a seconda del periodo della stagione riproduttiva in cui si effettua la raccolta. Infatti, all'inizio e al termine del periodo riproduttivo, è riportata una minore qualità del materiale seminale (Birkhead and Fletcher, 1995).

Proprio a causa di tale variabilità la valutazione spermatica può rivelarsi difficoltosa nella sua esecuzione, così come l'ideazione di un protocollo standard di analisi. Tuttavia, ciò diviene fondamentale al fine di ampliare le attuali conoscenze

nell'ambito della riproduzione in cattività, con la prospettiva di implementare l'utilizzo dell'inseminazione artificiale e della crioconservazione nelle specie di interesse.

Inoltre, diventa uno strumento indispensabile nei casi in cui si sospetta infertilità, la quale può essere dovuta ad infezioni (*Salmonella spp*., *Chlamydia spp*., *Mycoplasma spp*.), sostanze tossiche ambientali (impermeabilizzante per il legno, metalli pesanti, pesticidi, micotossine), farmaci (coccidiostatici), carenze di vitamine A ed E (Lierz, 2014).

L'analisi dei campioni spermatici diviene, quindi, parte integrante della valutazione del potenziale riproduttivo degli esemplari che si vuole scegliere come riproduttori, e dovrebbe essere eseguita su tutti i maschi che si decide di far partecipare ai programmi di riproduzione artificiale (Samour, 2016b).

Nelle realtà in cui si intende utilizzare l'inseminazione artificiale sarebbe poi auspicabile impiegare solo seme di buona qualità (Lierz *et al*., 2016). Infatti l'utilizzo di materiale seminale qualitativamente scadente crea un'inutile stress alla femmina, che dovrà essere manipolata per un intervento inseminativo dall'esito incerto (Lierz, 2008).

Inoltre, l'ideazione di un protocollo di valutazione rapido, relativamente poco costoso e di semplice applicabilità (Singh *et al*., 2012) anche sul campo, permetterebbe di individuare i campioni di qualità migliore, che possono essere divisi in aliquote, ed utilizzati per interventi inseminativi su più femmine, incrementando la possibilità di ottenere prole (Lierz *et al*., 2016).

Generalmente l'analisi spermatica negli uccelli ricalca quanto descritto per i mammiferi. Spesso, però, nei volatili la valutazione di tutti i parametri diventa difficoltosa a causa delle esigue quantità di materiale seminale che possono essere raccolte. Per far fronte a tale problema è possibile diluire il campione (Lierz *et al*., 2016), in modo da ottenere volumi maggiori che permettano la valutazione di quanti più parametri possibili. Ma la diluizione diviene fondamentale anche per disperdere l'eventuale materiale (come, ad esempio, i cosiddetti "*round bodies*") presente nell'eiaculato, che potrebbe rendere difficoltosa la visualizzazione degli spermatozoi.

Chiaramente i risultati ottenuti dovranno tener conto del fattore di diluizione utilizzato (Lierz *et al*., 2016).

I parametri valutati macroscopicamente immediatamente dopo la raccolta comprendono:

- Volume
- Colore
- Densità (raramente valutata)
- pH

(Samour, 2016b; Lierz *et al*., 2016)

Mentre vengono valutati microscopicamente:

- Concentrazione spermatica (cellule per unità di volume) e numero totale di spermatozoi (cell/eiaculato)
- Motilità spermatica
- Percentuale di spermatozoi vitali
- Percentuale di spermatozoi morfologicamente normali e la presenza di eventuali anomalie

(Oberlender *et al*., 2012; Samour, 2016b; Lierz *et al*., 2016)

L'utilizzo di un microscopio a contrasto di fase è raccomandato per la valutazione dei campioni non colorati (World Health Organization, 2010), ma, se non si dispone di tale strumentazione, è possibile eseguire le osservazioni anche con un normale microscopio ottico.

4.1 Volume

In generale gli uccelli producono volumi ridotti di eiaculato. Questo è dovuto al fatto che sono privi di ghiandole genitali accessorie, pertanto manca il loro contributo nella composizione finale del plasma seminale. Nonostante ciò un singolo eiaculato può essere sufficiente per l'inseminazione di più femmine (Enderson *et al*., 1998).
Lasciata la *rete testis*, le cellule spermatiche sono immerse nel fluido prodottosi nei tubuli seminiferi. La sua quantità e la composizione mutano durante il passaggio nei vasi efferenti e nell'epididimo, dove viene in gran parte riassorbito. Si ottiene, quindi, il plasma seminale, la cui composizione differisce da quella del plasma sanguigno in termini di concentrazione di glucosio, glutammato, K^+, Cl^-, Ca^{2+} (Vizcarra *et al*., 2015).

Il volume di eiaculato varia notevolmente a seconda della specie, dell'individuo e della modalità e frequenza di raccolta. In particolare la frequenza con cui avvengono gli accoppiamenti o le eiaculazioni incidono sul volume di eiaculato, così come sulla concentrazione (Hoolihan and Burnham, 1985; Johnson, 1986), comportando notevoli differenze quantitative anche considerando campioni raccolti in momenti diversi della stessa giornata.
Il volume spermatico non sembra esser correlato con la fertilità (Bird and Laguë, 1977), tuttavia, la sua valutazione, assieme all'acquisizione degli altri parametri, può fornire indicazioni utili a sancire il potenziale riproduttivo di un maschio.

Gran parte delle informazioni inerenti la quantità di seme raccolto interessano gli avicoli domestici, sui quali si sono concentrati i maggiori sforzi riguardanti la riproduzione artificiale.
Già tra le principali specie avicole di interesse zootecnico i volumi di eiaculato variano notevolmente. Infatti nel pollo domestico il volume di seme va da 0,50 a 1,00 ml (Lake, 1957), ma può variare a seconda della razza: 1,27 ml nella razza Wyandotte; 0,70 ml nella Leghorn e 0,56 ml nella New Hampshire (Allen and Champion, 1955). Mentre nel tacchino il volume di seme è inferiore e si aggira attorno 0,20 ml, ma la concentrazione spermatica è maggiore rispetto al seme del pollo domestico (Smyth, 1968; Johnson, 1986).
Il volume di eiaculato prelevato da diverse razze di anatre rientra in un *range* che va da 0,18 a 0,41 ml in media (Kamar, 1962). Anche Samour *et al*. (1985) riportano valori di 0,30 ± 0,10 ml nell'Anatra muta (*Cairina moschata*) e 0,15 ± 0,05 ml nel Germano reale (*Anas platyrhynchos*).
Nei fagiani il volume raccolto solitamente è pari a 0,10 ml (Shaklee and Knox, 1954), confermato in parte da Smyth (1968), che ha riportato volumi di 50-250 µl (Smyth, 1968), mentre Mantovani *et al*. (1993) hanno riscontrato quantità maggiori (0,39 ml).

Anche negli uccelli selvatici i volumi di seme risultano variabili a seconda della specie considerata, e possono apparire anche notevolmente inferiori rispetto a quanto viene riportato per gli avicoli domestici.
Nello Struzzo (*Struthio camelus*) (Rybnik *et al*., 2007) il quantitativo di seme si attesta su 1,09 ± 0,13 ml, mentre nel Pinguino saltarocce (*Eudyptes chrysocome chrysocome*) sono stati riscontrati valori pari a 0,30 ml (Waldoch *et al*., 2012). In queste specie i volumi di eiaculato si avvicinano molto ai valori riscontrati nelle

specie avicole di interesse zootecnico. Inferiori sono, invece, i quantitativi ritrovati in altri uccelli, con valori che vanno da 0,08 ± 0,05 ml nell'Ubara africana (*Chlamydotis undulata undulata*) (Saint Jalme *et al*., 1994) a 10,50 ± 2,60 µl nel Piccione selvatico (*Columba livia*) (Sontakke, *et al*., 2004); da 3,50 - 13,00 µl nel Parrocchetto ondulato (*Melopsittacus undulatus*) (Samour *et al*., 1986b) a 1,96 ± 0,26 µl (1,02 - 2,78 µl) nel Parrocchetto monaco (*Myiopsitta monachus*) (Anderson *et al*., 2002).

Nel Gheppio americano (*Falco sparverius*) il volume raccolto si aggira attorno i 3,00 - 14,60 µl (Blanco *et al*., 2007), che conferma quanto riportato in altri studi, in cui sono stati riscontrati valori di 12,00 ± 2,00 µl (Bird and Laguë, 1977) e 10,00 - 15,00 µl (Gee *et al*., 2004).
Nel Falco pellegrino Blanco *et al*. (2007) riportano volumi di eiaculato medi pari a 95,00 µl, similmente a quanto segnalato da Parks e colleghi (1986), che ottennero una media di 95,40 ± 51,70 µl (27,00 - 208,00 µl) di seme.
In questo rapace il volume di seme è circa 8 volte maggiore rispetto a quanto viene riportato per il Gheppio, ciò probabilmente è dovuto alla differenza di taglia tra le due specie (Parks *et al*., 1986).
In altri rapaci il quantitativo di seme varia da 0,20 ml nell'Aquila reale (*Aquila chrysaetos*) (Grier, 1973) a 0,10 ml nella Poiana codarossa (*Buteo jamaicensis*) (Gee and Temple, 1978); da 50,00 - 100,00 µl nel Falco della prateria (*Falco mexicanus*) (Boyd, 1978), a 20,00 - 30,00 µl nell'Astore (*Accipiter gentilis*) (Berry, 1972).

Solitamente il volume di seme viene misurato immediatamente dopo la raccolta. Mediante l'utilizzo di capillari graduati (Stelzer *et al*., 2005; Lierz *et al*., 2016) è possibile ricavare in modo rapido e semplice il quantitativo di materiale prelevato. In alternativa possono essere utilizzate pipette a spostamento positivo calibrate (Umapathy *et al*., 2005).
Nel caso in cui si utilizzino per la raccolta capillari non graduati, è possibile ricavare il valore del volume avendo noti la lunghezza del capillare e il volume totale di materiale che esso è in grado di contenere. Se questi due parametri coincidono numericamente (ad esempio: lunghezza del capillare = 100 mm, capacità = 100 µl) è possibile ottenere il volume semplicemente servendosi di un righello. Infatti, in questo caso, ogni millimetro (mm) di capillare misurato con il righello corrisponde ad 1 µl di seme (Hoolihan and Burnham, 1985).

Nel caso in cui la lunghezza del capillare e la sua capacità non coincidessero numericamente, è comunque possibile calcolare il volume di seme. Conoscendo il diametro interno del capillare (fornito dalla ditta produttrice) e la lunghezza in millimetri di capillare occupata dal materiale seminale, è possibile utilizzare la formula del volume di un cilindro (Brock and Bird, 1991).

$$V_{cilindro} = A\ x\ h$$

Dove "*A*" corrisponde all'area della base del cilindro, calcolabile conoscendo il diametro interno "*d*" del capillare ($A = \pi d^2/4$), e "*h*" corrisponde alla lunghezza in millimetri di capillare occupata da seme.

4.2 Colore

Il colore dell'eiaculato può fornire diverse informazioni. Infatti esso sembra essere direttamente legato alla concentrazione spermatica e alla quantità di plasma seminale del campione in esame (Samour, 2016b). Inoltre, un'alterazione nella normale colorazione, può essere indice di una pesante contaminazione, che si rende quindi macroscopicamente evidente.

Anche per tale parametro esistono differenze di specie. Nel pollo domestico il colore dell'eiaculato generalmente è biancastro e opaco, ma può assumere un aspetto più trasparente specialmente quando la concentrazione spermatica è bassa (Johnson, 1986). Dello stesso colore appare il seme del tacchino, tuttavia il 14-16% della popolazione produce un seme giallastro (Słowińska *et al*., 2018). La reale causa di questa cosiddetta "*yellow semen syndrome*" è ancora poco chiara, ma sembra che sia collegata ad una maggiore concentrazione di proteine e colesterolo nel plasma seminale (Słowińska *et al*., 2018). Inoltre, Marquez e Ogasawara (1975) osservarono che il seme caratterizzato da tale colorazione si associava ad una minore fertilità. Esso, infatti, è caratterizzato anche da un maggior numero di anomalie spermatiche, spermatidi e cellule infiammatorie (Słowińska *et al*., 2018).
Nei rapaci generalmente il colore del seme va dal biancastro pallido al giallastro, con torbidità variabile (Weaver, 1991). La presenza di urati, invece, fa apparire il seme di un colore bianco intenso con viscosità aumentata (Weaver, 1991).

Bird e Laguë (1977) hanno classificando i campioni di seme di Gheppio americano stabilendo delle categorie di colore, ciascuna delle quali associata ad uno punteggio numerico (0 = opaco, 1 = chiaro, 2 = ambrato molto pallido, 3 = ambrato pallido, 4 = ambrato, e 5 = ambrato scuro).
Nei campioni di colore ambrato è stata riscontrata una maggiore presenza di detriti cellulari ed una motilità spermatica inferiore, mentre i campioni opachi e viscosi hanno presentato un elevato grado di contaminazione da urati (Bird and Laguë, 1977).

In generale un campione di seme dall'aspetto opaco è predittivo di un'elevata concentrazione spermatica, come è stato osservato nel pollo (Johnson, 1986) e nel Parrocchetto monaco (Anderson *et al*., 2002).
Pertanto l'osservazione macroscopica dell'eiaculato rappresenta un parametro non trascurabile, poiché permette di acquisire in pochi secondi informazioni importanti che, se ben interpretate, possono orientare verso una particolare problematica (alterazioni della concentrazione spermatica, possibile contaminazione nonché grado e natura della stessa) ancora prima dell'osservazione microscopica. Naturalmente la sola osservazione macroscopica non è sufficiente, ma diviene importante se associato a tutte le osservazioni successive.

4.3 Contaminazione

È frequente che nell'eiaculato sia presente anche materiale non spermatico, talvolta anche molto abbondante, tanto da impedire l'utilizzo sistematico di metodi di analisi computerizzata. Spesso possono essere presenti strutture rotondeggianti di varia natura, cellule, cristalli di urati, feci, batteri ed altri organismi.
La percentuale di contaminazione può differire tra specie e tra un individuo e l'altro. Fattori anatomici e comportamentali, così come la risposta individuale, la dieta e l'esperienza di chi raccoglie l'eiaculato, possono influire sul livello di contaminazione del seme (Blanco *et al*., 2002a).

Il seme dei rapaci contiene frequentemente strutture rotondeggianti, non presenti in gran parte delle altre specie di uccelli. Si tratta dei cosiddetti "*round bodies*", la cui presenza è considerata normale e la cui concentrazione può variare (Lierz, 2014) a seconda della specie, dell'individuo e del campione di uno stesso individuo. La loro reale funzione non è ancora conosciuta (Lierz, 2014).

Altre strutture rotondeggianti sono rappresentate da lieviti (la cui presenza è comune e non dannosa) (Fox, 2013), dagli spermatozoi immaturi o da altre cellule, come i macrofagi. Questi ultimi, in particolare, possono essere riscontrati comunemente nel seme di alcune specie di uccelli (Breucker, 1978) soprattutto al termine della stagione riproduttiva. Infatti i macrofagi coadiuvano le cellule del Sertoli nell'eliminare le cellule germinali degenerate durante la regressione testicolare che avviene proprio con il finire del periodo riproduttivo (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017).

In alcune specie, come il Gheppio americano, è stata riscontrata la presenza di un'elevata concentrazione di materiale amorfo, rappresentato da detriti cellulari di origine epiteliale, che però non sembra avere alcuna rilevanza clinica (Bird and Laguë, 1977).

È possibile rilevare anche la presenza di globuli rossi, i quali non creano danno alla funzione spermatica. Tuttavia sono indice di un potenziale danno ai tessuti del maschio (Gee, 1983), legato ad una tecnica di raccolta del seme non appropriata (Fox, 2013).

La presenza di urati, se massiccia, può essere individuata macroscopicamente per la caratteristica colorazione bianca intensa assunta dal campione. Tuttavia non sempre tale contaminazione può essere rilevata così facilmente, pertanto si rende necessaria la valutazione microscopica, grazie alla quale è possibile individuare i cristalli di acido urico. La contaminazione del seme da parte delle urine è comune soprattutto quando la raccolta dell'eiaculato avviene con la tecnica del massaggio (Blanco *et al*., 2007). Infatti, questa metodica, può portare alla fuoriuscita di materiale dagli ureteri mediante azione meccanica o tramite la stimolazione dei nervi pudendi (Blanco *et al*., 2002a). Tale contaminazione può alterare viscosità e pH dello sperma, con conseguente danno agli spermatozoi (Blanco *et al*., 2007). Infatti "le urine provocano un'acidificazione dell'eiaculato, causando una marcata diminuzione della motilità e vitalità spermatica" (Blanco *et al*., 2002a). Infatti, Blanco *et al*. (2002a), hanno individuato che il pH del seme contaminato si aggirava attorno i 6,48 ± 0,30 nel Falco pellegrino e 6,62 ± 0,10 nell'Aquila reale (*Aquila chrysaetos*), contro i 7,56 ± 0,10 (Pellegrino) e 7,24 ± 0,10 (Aquila reale) del seme non contaminato, con sensibile calo dei parametri spermatici sopracitati.

Ecco perché vi è un crescente interesse nella ricerca di nuovi *extenders*, con lo scopo di limitare eventuali variazioni di pH e limitare i danni al materiale seminale dovuti alla contaminazione, al fine di conservare nel lungo periodo lo sperma senza che se ne alteri la qualità (Blanco *et al*., 2007). Blanco *et al*. (2002a) hanno riportato, inoltre, che

un immediato lavaggio dell'eiaculato con il *Lake's diluent* permetterebbe l'utilizzo di un materiale seminale anche intensamente contaminato, senza una compromissione significativa della funzione spermatica. Tuttavia, non tutti gli *extenders* sono efficaci e si prestano allo scopo in tutte le specie.
Anche la contaminazione fecale può risultare un problema. Benché sia riportato che l'eventuale presenza di feci non sembri incidere sulla fertilità, se l'inseminazione artificiale viene eseguita immediatamente dopo la raccolta (Smyth, 1968; Bird and Laguë, 1977), vi è comunque il rischio di trasmettere alla femmina microorganismi, come ciliati o batteri (soprattutto *E. Coli*), di derivazione fecale (Blanco *et al*., 2007), con conseguente sviluppo di infezioni ascendenti dell'ovidotto.

4.4 pH

La valutazione del pH solitamente andrebbe eseguita sul plasma seminale, ottenuto centrifugando il campione (Samour, 2016b). Tuttavia, visti gli esigui quantitativi di seme ottenuti dalle specie non domestiche, tale valore può essere ricavato anche sul materiale seminale intero.
Per la valutazione del pH generalmente vengono utilizzate cartine reattive commerciali che virano di colore a seconda del pH del mezzo con cui vengono a contatto, permettendo di ottenere una stima abbastanza accurata del pH stesso.
Si pone una goccia di seme sulla striscia reattiva e si attende qualche secondo affinché venga impregnata in modo omogeneo e il colore risulti uniforme (World Health Organization, 2010). Quindi si compara il colore ottenuto a seguito del viraggio, con la scala di colore calibrata. Questo permette di ottenere valori verosimili seppur puramente indicativi (Anderson *et al*., 2002). Tuttavia, può essere considerato un metodo accettabile, dal momento che permette di ricavare il pH con piccolissime quantità di materiale.

Il pH nel seme di pollo domestico si aggira attorno a 7,0 - 7,6 a seconda della quantità di fluido presente nell'eiaculato (Lake, 1971). Mentre ha un valore di 6,8 ± 0,2 nel Piccione selvatico (*Columba livia*) (Sontakke *et al*., 2004).
Nei rapaci, come l'Aquila reale e Falco pellegrino il pH si attesta a 7,24 e 7,56 rispettivamente (Blanco *et al*., 2002a). Mentre nel Grifone dorsobianco del Bengala (*Gyps bengalensis*) il pH si aggira attorno a 7,10 ± 0,21 (Umapathy *et al*., 2005).

Sembra essere più alcalino il seme prodotto da diverse specie di pappagalli. Infatti sono stati riportati valori di 8,20 ± 0,05 nel Parrocchetto ondulato (*Melopsittacus undulatus*) (Samour *et al*.,1986a); 8,05 - 8,50 nel Parrocchetto monaco (Anderson *et al*., 2002); 8,90 nel Conuro testa dorata (*Aratinga auricapilla*), fino a 9,50 nel Pappagallo nucazzurra (*Tanygnathus lucionensis*) (Stelzer *et al*., 2005).

La determinazione del pH diventa fondamentale nella scelta e nella preparazione del medium che si vuole usare come diluente. Questo dovrà possedere un pH idoneo al mantenimento della vitalità e della motilità degli spermatozoi, e non dovrà inficiarne la capacità di fecondazione.
Samour *et al*. (1986a) notarono che con medium dal pH inferiore a 7,80 la motilità nel seme di Parrocchetto ondulato era calata sensibilmente, mentre era rimasta elevata tra 7,80 e 8,20.
Presumibilmente anche per le altre specie, compresi i rapaci, esistono dei range di pH entro cui la motilità e la vitalità spermatica rimangono elevati. Di conseguenza la scelta dell'*extender* dovrà tenere conto anche di tale parametro.

4.5 Concentrazione

Per concentrazione spermatica si intende il numero di spermatozoi presenti per unità di volume.
Essa non è solo indice specifico dell'output testicolare, ma fornisce indicazioni anche riguardo le altre strutture che fanno parte dell'apparato riproduttivo (World Health Organization, 2010), infatti è influenzata anche dalla quantità di fluido seminale prodotto.
La concentrazione sembra fortemente correlata alla fertilità. Infatti, negli avicoli domestici, l'utilizzo di materiale seminale con bassa concentrazione spermatica esita frequentemente nella produzione di uova non fertili (Allen and Champion, 1955).
Stimare la concentrazione spermatica diviene fondamentale per stabilire la quantità di *extender* da addizionare al seme per la diluizione dello stesso e per sancire la minima concentrazione inseminante in grado di dare prole.
Questo risulta utile nell'ambiente avicolo zootecnico, in cui potenzialmente, con un singolo campione diluito è possibile inseminare più femmine. Tuttavia ciò richiede elevate concentrazioni spermatiche e volumi di seme sufficientemente elevati.

Negli uccelli selvatici l'acquisizione dei dati inerenti la concentrazione spermatica diventano importanti anche a semplice scopo conoscitivo, dal momento che spesso le informazioni relative alle caratteristiche del seme nelle varie specie sono carenti.
I metodi utilizzati per la valutazione della concentrazione spermatica sono numerosi. Essa può essere ottenuta manualmente o mediante l'utilizzo di sistemi di analisi computerizzati (Samour, 2016c). La valutazione manuale si avvale dell'utilizzo di camere di conta o emocitometri, cui si può associare o meno l'utilizzo del microscopio a contrasto di fase (Hoolihan and Burnham, 1985) per meglio visualizzare gli spermatozoi.
Molto utilizzata è la camera di Neubauer (Lierz *et al*., 2016). Questa è costituita da uno spesso vetrino con una concavità centrale in cui è posta la griglia per la conta. Questo tipo di emocitometro è stato utilizzato per la conta delle cellule spermatiche nel Falco pellegrino (Parks *et al*., 1986), nel Gheppio americano (Bird and Laguë, 1977) e nel Parrocchetto ondulato (Samour *et al*., 1986a).
Altre camere di conta normalmente utilizzate per tale scopo sono la camera di Makler (Batocco, 2015) e la camera di Burker, mentre più raramente possono venire utilizzate le camere di Fuchs-Rosenthal, di Petroff-Hausser e di Thomas (Samour, 2016c).
Nonostante le piccole differenze, tutte le camere di conta si basano sul medesimo metodo di stima della concentrazione spermatica. Osservando il numero di elementi cellulari presenti all'interno della griglia di conta e conoscendo il volume di materiale contenuto nella griglia stessa, è possibile ricavare la concentrazione applicando la formula sotto riportata (Allen and Champion, 1955):

$$Concentrazione = \frac{N° \; spz \; \text{x} \; Fattore \; di \; diluizione}{N° \; celle \; considerate \; \text{x} \; Area \; della \; cella \; x \; profondità \; della \; cella}$$

Una volta ricavata la concentrazione è poi possibile calcolare la conta spermatica totale, che si riferisce al numero totale di spermatozoi nell'intero eiaculato, e che si ottiene moltiplicando la concentrazione spermatica per il volume totale del campione (World Health Organization, 2010).

Il numero di spermatozoi per unità di volume può variare sensibilmente a seconda della specie considerata, presentando valori elevati soprattutto nei galliformi domestici. Infatti, nel pollo domestico la concentrazione spermatica si aggira attorno 3,80 - 7,50 x 10^9 cell/ml (Chalov,1970), mentre nel tacchino la concentrazione va da

6,30 a 7,02 x 10^9 cell/ml, con variabilità a seconda della razza e della linea genetica (Kotłowska *et al*., 2005).

Nelle anatre la concentrazione si aggira attorno 2,10 - 5,85 x 10^6 cell/µl (Kamar, 1962), ma in alcune specie sono state riscontrate concentrazioni maggiori. In particolare nel Germano reale si attesta su 6,80 x 10^6 cell/µl, mentre nell' Anatra muta arriva a 7,50 x 10^6 cell/µl (Samour *et al*., 1985).

Anche nelle specie non domestiche la concentrazione spermatica è estremamente variabile. Nello Struzzo è elevata (4,21 ± 0,27 x 10^9 cell/ml) e si avvicina maggiormente ai valori riscontrati nel pollo e nel tacchino (Rybnik *et al*., 2007).

Mentre in altre specie è sensibilmente inferiore, come nel Parrocchetto monaco, nel quale la concentrazione riscontrata da Anderson *et al*. (2002) è stata di 346,6 ± 64,6 x 10^3 cell/µl (74,8 - 579,3 x 10^3 cell/µl).

Nei rapaci la concentrazione spermatica varia a seconda del periodo della stagione riproduttiva in cui si raccoglie il seme, raggiungendo il picco a metà stagione, per poi diminuire da quel momento in poi (Blanco *et al*., 2007).

Così come per il volume, la frequenza di raccolta dell'eiaculato incide anche sul numero di cellule per microlitro e sul numero di cellule per eiaculato. Infatti aumentando il numero di prelievi al giorno diminuiscono significativamente entrambi i parametri (Hoolihan and Burnham, 1985).

Il periodo della giornata in cui viene effettuata la raccolta, invece, non sembra incidere sulla concentrazione spermatica (Hoolihan and Burnham, 1985)

Nel Gheppio americano la concentrazione si aggira attorno 31,0 - 40,0 x 10^3 cell/µl (Blanco *et al*., 2007), che conferma il dato riscontrato in un precedente studio in cui furono segnalati valori di 31,0 ± 0,5 x 10^3 cell/µl (8,0 ± 2,0 - 53,0 ± 7,0 × 10^3 cell/µl) e 416 ± 109 x 10^3 cell/eiaculato (Bird and Laguë, 1977). Mentre nel Pellegrino la concentrazione è pari a 26,25 - 81,12 x 10^3 cell/µl e 1,27 - 5,84 x 10^6 cell/eiaculato (Hoolihan and Burnham, 1985), confermato da Parks *et al*. (1986), che riscontrarono un valore di 47,40 x 10^3 cell/µl (29,0 - 81,0 x 10^3 cell/µl). Un altro studio, invece, ha rilevato una concentrazione di 55,30 x 10^3 cell/µl nel Pellegrino, 41,30 x 10^3 cell/µl nel Girfalco e 44,50 x 10^3 cell/µl nel Falco sacro (Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016).

4.6 Motilità

La motilità è uno dei parametri maggiormente considerati nella valutazione della qualità del seme (Singh *et al*., 2012). Benché in alcuni studi risulti positivamente correlata alla fertilità (Wishart and Palmer, 1986), da sola non sembra rappresentare un indice totalmente affidabile della capacità di fecondazione degli spermatozoi (Vizcarra *et al*., 2015). Tuttavia, diviene un parametro importante da valutare se considerato assieme alla vitalità degli spermatozoi stessi, dal momento che entrambe dipendono dalla loro integrità strutturale e funzionale (Wishart and Palmer,1986).

Solitamente per la sua esecuzione ci si affida all'utilizzo della microscopia ottica, poiché rappresenta una tecnica semplice, poco costosa e permette di stimare la motilità spermatica sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo (Singh *et al*., 2012). Tuttavia si tratta di una metodica che risente della soggettività legata all'operatore, dell'esperienza dello stesso e dell'influenza dell'ambiente esterno.
Frequentemente la valutazione della motilità spermatica viene effettuata soggettivamente in gran parte dei laboratori (Graham, 2001), e mira a stimare la percentuale delle cellule motili sul totale delle cellule osservate. Per facilitare tale valutazione ci si può affidare a scale numeriche, come quella proposta da Anderson e colleghi (2002), i quali hanno utilizzato uno score da 1 a 5, in cui 1 corrisponde a motilità assente, 2 a <50% di spermatozoi motili, 3 indica >50% di spermatozoi motili ma non progressivi, 4 corrisponde a >50% di spermatozoi motili e progressivi, 5 a > 80% di spermatozoi motili e progressivi.
In alcuni studi sono stati proposti anche sistemi di valutazione dell'intensità del moto progressivo, sempre basato sull'attribuzione di un punteggio numerico (0-5), dove 0 indica motilità assente, 1 indica motilità non progressiva, 2 sta per motilità progressiva lenta, 3 indica movimenti laterali della testa accompagnati da motilità progressiva, 4 sta per motilità progressiva rapida e 5 per motilità progressiva molto rapida (Sontakke *et al*., 2007).

Per incrementare l'accuratezza sono state introdotte tecniche più oggettive, (Chenoweth, 2002) che sfruttano software per l'analisi computerizzata del seme, i quali hanno permesso di ottenere una stima più precisa delle proprietà cinetiche dell'eiaculato, misurando la motilità totale percentuale, le caratteristiche dei movimenti delle singole cellule (come l'ampiezza del movimento della testa durante il

moto), la velocità progressiva (μm/sec) (Brinsko *et al*., 2011), ma anche la viscosità del mezzo (Singh *et al*., 2012). Infatti questi sistemi sono in grado di catturare sequenze di immagini degli spermatozoi, individuando così il tragitto e le caratteristiche di moto delle singole cellule (Sayed *et al*., 2017).
Attualmente l'analisi del seme computerizzata (CASA) è considerato il sistema più affidabile per la valutazione della motilità spermatica (Hernández-Avilés *et al*., 2019) nell'uomo e nei mammiferi. Tuttavia si tratta di sistemi sofisticati e costosi, di scarso utilizzo in campo.
Un ulteriore svantaggio risiede nel fatto che il software deve essere calibrato per adattarsi alle differenze di specie, come forma e dimensione degli spermatozoi, che negli uccelli presentano una morfologia estremamente eterogenea (Lierz *et al*., 2016). Inoltre, nei rapaci, la presenza di materiale non spermatico può interferire con il sistema computerizzato, che considererà erroneamente come spermatozoi tale materiale (Lierz *et al*., 2016).

La valutazione in microscopia ottica può essere eseguita sia sul seme tal quale che diluito (Chenoweth, 2002).
Una volta depositata la goccia di seme su vetrino porta oggetto vi si pone sopra il vetrino copri oggetto (World Health Organization, 2010). Si viene, quindi, a formare un film in cui gli spermatozoi possono muoversi limitatamente al piano orizzontale, dal momento che la ridotta profondità creatasi allestendo il vetrino impedisce loro di muoversi verticalmente. Questo facilita la visualizzazione del tipo di moto espresso dalle singole cellule spermatiche.
L'osservazione generalmente viene eseguita al microscopio ottico con contrasto di fase ad ingrandimento 200X o 400X, contando approssimativamente 200 spermatozoi al fine di ricavare la percentuale delle varie categorie di motilità (motilità totale, motilità progressiva, motilità non progressiva e immobilità). Solitamente vengono valutati almeno 5 campi random (è opportuno non scegliere i campi in funzione della numerosità spermatica) (World Health Organization, 2010).
La procedura può essere eseguita con campione e vetrini mantenuti a temperatura ambiente (World Health Organization, 2010) o pre-riscaldati a 37°C almeno 30 minuti prima dell'inizio della valutazione (Hoolihan and Burnham, 1985; Parks *et al*., 1986; World Health Organization, 2010). In quest'ultimo caso si rende inoltre necessario l'utilizzo di un microscopio ottico con piano riscaldato.

Come accennato poc'anzi, è prevista la valutazione della motilità progressiva (PR), ossia il numero di spermatozoi che si muovono attivamente in maniera rettilinea o in ampi cerchi; della motilità non progressiva (NP), che si riferisce a tutti gli altri tipi di motilità con assenza di progressione (come il movimento in piccoli cerchi, forti movimenti del flagello con movimenti laterali della testa o solo lievi movimenti del flagello); dell'immobilità (IM), ossia l'assenza completa di movimento, e della motilità totale (PR + NP), che corrisponde all'insieme degli spermatozoi che esprimono un qualsiasi tipo di motilità, sia essa progressiva o non progressiva (World Health Organization, 2010).
In tale valutazione devono essere considerati solo gli spermatozoi integri e non i cosiddetti spermatozoi "a capocchia di spillo", caratterizzati da code prive di teste (ma comunque motili) (World Health Organization, 2010).

I dati relativi alla motilità spermatica negli uccelli sono stati ricavati solo in alcune specie e sono spesso il risultato di una valutazione soggettiva. Inoltre non vi è un'omogeneità di dati in letteratura, dal momento che spesso viene considerato solo uno dei parametri che caratterizzano la motilità, prediligendo la motilità progressiva. La motilità nel pollo è stata stimata attorno l'84,0%; 82,0% nel fagiano e 67,0% nella Poiana codarossa (Herrera *et al*., 2005). Nei cacatua sono stati riscontrati valori di motilità totale pari al 77,9 %; 75,8% negli *Ara spp.* e 80,0% nei pappagalli del genere *Amazona*. Mentre la motilità progressiva riscontrata è stata del 71,5%; 70,0% e 75,0% rispettivamente nei cacatua, *Ara spp.* e *Amazona spp*. (Lierz *et al*., 2013). Nel Falco pellegrino, la motilità progressiva stimata soggettivamente a 37°C si attesta sul 70,1% (60,0 - 85,0%) (Parks *et al*., 1986), mentre in altri studi è stata stimata approssimativamente tra l'80 e il 100% (Hoolihan and Burnham, 1985). Nel Girfalco, invece, la motilità progressiva si aggira attorno a 75,0 ± 12,0% (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Leggermente inferiore è il dato stimato da Al-Daraji and Al-Shemmary (2016), i quali riportano una percentuale di motilità pari a 68,8% nel Girfalco e 74,2% nel Falco sacro, mentre la motilità nel Pellegrino rientra nei valori stimati negli studi precedenti (83,9%).

Numerosi fattori possono influenzare la motilità e la loro conoscenza può risultare utile per comprendere meglio il meccanismo che sta alla base della funzione spermatica.

La motilità dello spermatozoo è garantita dall'azione del flagello, ed è la principale attività richiedente energia, la quale viene fornita dall'idrolisi dell'ATP. Perciò la concentrazione di ATP nel seme può essere correlata al numero di spermatozoi motili e vitali. La valutazione di tale concentrazione, infatti, può rappresentare un metodo efficace per stimare la vitalità degli spermatozoi, tuttavia i dati relativi alla correlazione tra fertilità e concentrazione di ATP sono contraddittori (Singh *et al*., 2012) e l'applicabilità del test è scarsamente fattibile in campo.

Inoltre, sembra che la composizione del plasma seminale possa avere un qualche effetto sulla motilità degli spermatozoi. Tuttavia non è ancora chiaro in che modo e con quale entità ciò possa incidere sulla motilità degli stessi (Vizcarra *et al*., 2015).

Anche l'ambiente esterno può agire sulla capacità motile delle cellule spermatiche. Infatti, nei dotti efferenti, nell'epididimo e nel deferente (dove vengono stoccati) gli spermatozoi non sono motili. Ciò che innesca la motilità al momento dell'eiaculazione è ancora poco chiaro. È stato ipotizzato che il cambio di temperatura al momento della eiaculazione possa fungere da innesco nel pollo domestico (Ashizawa and Sano, 1990).

Inoltre sembra che Ca^{2+} e HCO^{3-} agiscano favorendo la motilità spermatica *in vitro* (Vizcarra *et al*., 2015). La loro concentrazione può essere pertanto tenuta in considerazione nella realizzazione di diluitori il cui scopo è la conservazione del materiale seminale, mantenendo la motilità degli spermatozoi senza esaurire precocemente le riserve energetiche degli stessi.

4.7 Vitalità

La membrana citoplasmatica dello spermatozoo è il primo sito che subisce maggiormente il danno dovuto al congelamento del seme (Hammerstedt *et al*., 1990).

Dal momento che una membrana intatta è essenziale per sostenere il metabolismo della cellula spermatica e per garantire la reazione acrosomiale (Singh *et al*., 2012), la valutazione di tale integrità, e quindi della vitalità spermatica, è divenuta una pratica di routine soprattutto nell'ambiente zootecnico, in cui si utilizzano abitualmente inseminazione artificiale e crioconservazione. Questo perché permette di sancire la qualità dell'eiaculato e la capacità di fecondazione degli spermatozoi. Inoltre fornisce informazioni fondamentali soprattutto in quei campioni in cui la motilità spermatica è esigua (Björndahl *et al*., 2003).

Questo diventa particolarmente interessante quando tale valutazione viene eseguita sullo sperma di uccelli selvatici, in particolare rapaci, in cui la motilità spermatica può anche essere ridotta, nonostante gli esemplari mantengano una buona fertilità. Quindi possedere un metodo che permetta di quantificare la percentuale di spermatozoi vitali diventa fondamentale per avere un quadro completo della qualità spermatica.

Nel tempo sono state messe a punto diverse metodiche per poter discernere le cellule danneggiate da quelle integre. Gran parte di queste si basano sul concetto che nelle cellule danneggiate la membrana citoplasmatica ha perso sia l'integrità fisica che funzionale, con conseguenti alterazioni a carico dei meccanismi di trasporto membranale ed incapacità nel mantenere l'equilibrio intracellulare (Singh *et al*., 2012). Sfruttando ciò, mediante l'utilizzo di specifiche colorazioni differenziali, è possibile distinguere, mediante osservazione al microscopio ottico, le cellule vitali e quelle non vitali l'una rispetto all'altra e rispetto al *background* (Dott and Foster, 1972). Inoltre, associando tale dato alla motilità dello stesso campione, si possono differenziare gli spermatozoi non motili morti, da quelli non motili vivi (Björndahl *et al*., 2003).

Una delle più utilizzate è la colorazione Eosina-Nigrosina, il cui impiego è ampiamente documentato a partire dagli anni '50 (Björndahl *et al*., 2003), ed è stata utilizzata in numerose specie di mammiferi tra cui toro, stallone, verro (Oberlender *et al*., 2012), ariete (Campbell *et al*., 1956) e coniglio (Beatty, 1957).
Si tratta di un metodo semplice, che richiede un singolo passaggio per la colorazione. Il campione solitamente viene allestito facendo incubare (30 secondi) a temperatura ambiente una goccia di seme con una goccia di colorante (World Health Organization, 2010), poi si procede con l'esecuzione dello striscio su vetrino (World Health Organization, 2010).
Per individuare la percentuale di cellule vive è necessario valutare 200 cellule osservando il vetrino ad ingrandimento 1000X in olio immersione (Björndahl *et al*., 2003) o a 400X (Samour, 2016c).
L'eosina presente all'interno della colorazione permette di marcare gli spermatozoi morti. Questi ultimi, infatti, presentano una membrana permeabile, che consente all'eosina di penetrare all'interno, colorando la testa dello spermatozoo di rosa o rosso (Dott and Foster, 1972; Singh *et al*., 2012). Pertanto gli spermatozoi che presentano tale colorazione vengono classificati come morti. Le cellule vive sono, invece, caratterizzate dall'integrità della membrana che impedisce all'eosina di penetrare

all'interno (Cheng *et al*., 2002). Verranno classificati come vivi gli spermatozoi che presenteranno testa incolore o con colorazione rosata relegata soltanto alla regione del collo (Björndahl *et al*., 2003).
La nigrosina, invece, funge da colorazione di *background*, incrementando il contrasto tra il fondo e la testa dello spermatozoo, facilitandone la visualizzazione (Björndahl *et al*., 2003). Questo fa sì che con tale colorazione non sia necessario l'utilizzo di un microscopio con contrasto di fase (Björndahl *et al*., 2003) e ciò rende possibile l'esecuzione della valutazione della vitalità anche in contesti in cui si ha a disposizione un semplice microscopio ottico.
Per identificare le cellule spermatiche morte negli uccelli è stata utilizzata anche l'eosina B al 2%, con buoni risultati (Stelzer *et al*., 2005; Lierz *et al*., 2013).
La percentuale di spermatozoi vitali riscontrata nel pollo è pari al 98%; nel fagiano al 97%; nella Poiana codarossa al 89% (Herrera *et al*., 2005) e nel Piccione domestico tra 58% e 86% (Cheng *et al*., 2002). 87,1% è la vitalità media osservata in diverse specie di *Ara spp.*; 90,3% nei cacatua; 87,9% nelle *Amazona spp.*; 94,6 % nell'*Eclettus spp*. (Lierz *et al*., 2013). Mentre inferiore è la percentuale di spermatozoi vivi riscontrata nell'Ara di Spix (*Cyanopsitta spixii*), nella quale è pari al 51,9% (Fischer *et al*., 2014). Nell'Aquila reale è stata segnalata una percentuale di cellule vive pari 75,6 ± 7,8%, mentre nel Falco pellegrino è stato riportato un valore di 93,8 ± 4,7%, (Blanco *et al*., 2002a). Al-Daraji and Al-Shemmary (2016) hanno riportato, invece, un valore inferiore nel Pellegrino (78,1%), ed hanno valutato la vitalità anche nel Girfalco (69,1%) e nel Falco sacro (71,5%).

Le diverse colorazioni solitamente vengono utilizzate per l'analisi della vitalità sul seme fresco, poiché il glicerolo, uno dei principali crioprotettori utilizzati nella crioconservazione del materiale seminale, sembra interferire con la colorazione stessa (Singh *et al*., 2012). Ma l'utilizzo di crioprotettori diversi dal glicerolo potrebbe rendere fattibile il loro utilizzo anche sul seme congelato-scongelato. Tuttavia è stato notato che, l'utilizzo di tale colorazione sul seme di Gheppio americano con aggiunta di DMSO, non ha permesso di distinguere le cellule vive da quelle morte perché nessuna delle due tipologie aveva assunto il colorante (Gee *et al*., 1993).
Inoltre anche nel seme fresco possono esserci delle difficoltà. Hoolihan and Burnham (1985), infatti, hanno riscontrato che la colorazione Eosina-Nigrosina, comunemente utilizzata anche negli avicoli domestici, nel Falco pellegrino non permette di avere informazioni precise riguardo la vitalità e, di conseguenza, la capacità di fecondazione

degli spermatozoi stessi. Sembra, infatti, che l'eosina possa penetrare all'interno sia delle cellule non vitali che in quelle vitali, colorando tutte le teste degli spermatozoi di rosa intenso e non permettendo di discernere le due popolazioni presenti.

Per ovviare a tali problemi è stato introdotto l'utilizzo di tecniche peculiari che prevedono l'impiego di sostanze intercalanti il DNA ad attività fluorofora (Chen *et al*., 2016) come il SYBR-14 (dalla fluorescenza verde) associato allo ioduro di propidio (PI) che conferisce una fluorescenza rossa (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Grazie all'associazione di queste due sostanze gli spermatozoi vitali sono riconoscibili per la fluorescenza verde mela, poiché essi risultano impermeabili al PI. Al contrario, le cellule spermatiche che mostrano colorazione rossa, o rossa e verde, presentano un danno alla membrana che, perdendo la propria funzione, è risultata permeabile al PI (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017).
Questa metodica necessita dell'utilizzo di microscopi a fluorescenza o della citometria a flusso per poter discernere le cellule vive da quelle danneggiate (Chen *et al*., 2016; Villaverde-Morcillo *et al*., 2017), ed è stata impiegata con successo in mammiferi, avicoli domestici (Chen *et al*., 2016), psittaciformi e rapaci (Blanco *et al*., 2002a; Lierz *et al*., 2016), come il Girfalco (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Tuttavia il suo utilizzo e la sua efficacia in altre specie di uccelli selvatici è poco documentato (Lierz *et al*., 2016).

4.8 Morfologia e valutazione morfometrica

Lo studio della morfologia e della morfometria spermatica riveste un ruolo essenziale nella valutazione della capacità fecondante degli spermatozoi di un individuo, come è stato dimostrato nel toro, nello stallone (Ball and Mohammed, 1995), nel verro (Kondracki *et al*., 2005), nel fagiano (Ball and Mohammed, 1995) ed in alcuni passeriformi (Lüpold *et al*., 2009).
Inoltre, la valutazione di tali parametri rappresenta un utile strumento anche per prevedere la potenziale risposta degli spermatozoi al congelamento (Yániz *et al*., 2016). Il confronto, poi, dei dati morfometrici e della percentuale di anomalie spermatiche tra il seme fresco e il seme dopo il processo di congelamento-scongelamento rappresenta un ottimo indicatore della qualità del metodo di crioconservazione.

Diversi fattori esterni possono influenzare la morfologia spermatica. Ad esempio, pesticidi e sostanze tossiche possono interferire con la spermatogenesi, così come lo stress da calore e i recenti cambiamenti ambientali, che hanno condizionato anche la normale ecologia riproduttiva (Santiago-Moreno *et al*., 2016).
Anche la manipolazione del seme in laboratorio può condizionare la morfologia delle cellule spermatiche. L'utilizzo di soluzioni ipo o iperosmotiche può provocare rispettivamente il rigonfiamento e la disidratazione della cellula (Santiago- Moreno *et al*., 2016). Allo stesso modo il processo di congelamento-scongelamento può influenzare la forma e la dimensione spermatica anche nei rapaci (Santiago-Moreno *et al*., 2016).

Le strutture che costituiscono gli spermatozoi permettono loro di trasmettere il materiale genetico mediante il processo di fecondazione, pertanto è plausibile che anomalie nelle strutture stesse possano compromettere la fertilità (Kondracki *et al*., 2017). Per questo motivo diventa fondamentale individuare e quantificare la tipologia di tali difetti morfologici. Per fare ciò si rende necessario l'utilizzo di colorazioni che permettano di mettere in evidenza la morfologia spermatica e le sue alterazioni (Kondracki *et al*., 2017).
Le colorazioni utilizzate a tale scopo sono numerose. La colorazione Papanicolaou (Papanicolaou, 1942) rappresenta la metodica maggiormente utilizzata nell'analisi spermatica umana, tuttavia necessita di tempistiche estremamente lunghe, dal momento che prevede più di venti passaggi successivi.
L'Eosina-Nigrosina prevede, invece, una procedura semplice e permette una rapida valutazione morfologica (Van der Horst and Maree, 2009) oltre a dare informazioni riguardanti la vitalità (Björndahl *et al*., 2003). Tale colorazione, tuttavia, non garantisce la chiara distinzione delle varie strutture dello spermatozoo e le eventuali alterazioni (Van der Horst and Maree, 2009).
Altri esempi di colorazioni impiegate a tale scopo comprendono l'Eosina-Violetto di genziana, Trypan blue, (Kondracki *et al*., 2017), Giemsa, Diff-Quick, Hemacolor, SpermBlue (Van der Horst and Maree, 2009) e Rosa Bengala (Oberlender *et al*., 2012).
In particolare la colorazione Rosa Bengala (3%) è stata utilizzata per la valutazione morfologica e morfometrica del seme di verro (Oberlender *et al*., 2012), Pecari dal collare (*Pecari tajacu*) (Sousa *et al*., 2013), ariete, toro, gatto, persino pesci (Oberlender *et al*., 2012). L'utilizzo del Rosa Bengala risulta essere una tecnica di

colorazione efficiente dal momento che permette di distinguere alla perfezione le diverse strutture (Sousa *et al*., 2013), incluso l'acrosoma (Oberlender *et al*., 2012). Inoltre la presenza di artefatti solitamente è ridotta (Oberlender *et al*., 2012).
Il vetrino viene allestito miscelando una goccia di seme ad una goccia di colorante e viene poi osservato a microscopio ottico ad ingrandimento 400X (Oberlender *et al*., 2012), che permette di individuare e stimare la percentuale di anomalie spermatiche (Oberlender *et al*., 2012) e di misurare separatamente i vari componenti (testa, segmento intermedio e coda) (Sousa *et al*., 2013).
È necessario ricordare, però, che la differente procedura di preparazione e le sostanze utilizzate possono alterare la dimensione e la forma della testa o della coda dello spermatozoo (Kondracki *et al*., 2017), comportando lievi differenze nei parametri morfometrici a seconda della colorazione utilizzata.

La valutazione morfometrica si basa sulla misurazione di una serie di parametri che comprendono la lunghezza della testa dello spermatozoo, la larghezza della testa, l'area della testa e il suo perimetro, la lunghezza della coda e la lunghezza totale dello spermatozoo (Kondracki *et al*., 2017).
Ciò è reso possibile tramite l'acquisizione di immagini microscopiche e l'utilizzo di sistemi di analisi computerizzata (Kondracki *et al*., 2017), come ImageJ e CASA-Morph (Santolaria *et al*., 2016). Tali sistemi di analisi sono commercialmente disponibili sin dalla metà degli anni '80 ed hanno avuto un impatto notevole nel campo della ricerca e della pratica clinica in medicina umana e veterinaria (Maggavi *et al*., 2016). Tuttavia i software convenzionalmente utilizzati (es. CASA-Morph) presentano delle limitazioni, dal momento che le cellule spermatiche, a seconda della specie, rispondono in modo differente ai vari metodi di fissazione e colorazione, facendo sì che il programma debba essere calibrato di volta in volta (Yániz *et al*., 2016).
Ciò risulta essere un problema soprattutto quando l'analisi viene effettuata sul seme di uccelli. Infatti, tra le diverse specie esiste una considerevole differenza nella morfologia degli spermatozoi maturi (Johnson, 1986) e questo può rendere difficoltoso il settaggio dei software per l'indagine morfometrica.
A ciò si aggiunge il pleomorfismo che caratterizza il materiale seminale aviario. Infatti, in un campione di seme, è frequente riscontrare diverse sottopopolazioni tra gli spermatozoi maturi (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017) o la presenza di cellule a vari gradi di maturità (Santiago-Moreno *et al*., 2016).

Si rende, quindi, indispensabile la conoscenza approfondita della morfologia spermatica della specie con cui si decide di lavorare, prima di tentare un qualsiasi tipo di valutazione.

In particolare, nei falchi, gli spermatozoi maturi si presentano più piccoli rispetto a quelli dei galliformi, mostrando una testa più corta ed ampia. Nel pollo, infatti, la testa raggiunge una lunghezza di 11-21 µm, mentre nei falchi ha una dimensione che si aggira attorno 6-7 µm (Santiago-Moreno *et al*., 2016). Inoltre, nel seme dei rapaci è frequente trovare spermatociti e spermatidi, solitamente caratterizzati da teste sferiche o dalla presenza di residui di citoplasma in cui è incluso il flagello (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Un'elevata percentuale di forme immature è stata riscontrata nel Girfalco (64,7 ± 20,3%) e nel Pellegrino (65,5 ± 31,0%) (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Tale percentuale sembra poi variare a seconda del periodo. Infatti, all'inizio della stagione riproduttiva, così come alla fine, si assiste non solo ad una bassa concentrazione spermatica, ma anche ad un minor numero di spermatozoi maturi. Nei due periodi citati il numero di spermatogoni, spermatidi e spermatozoi immaturi è superiore, mentre nel pieno della stagione riproduttiva la qualità spermatica è massima (Blanco *et al*., 2007). In tal modo l'emissione di uno sperma di migliore qualità coincide con il periodo in cui gli accoppiamenti sono più frequenti, massimizzando la possibilità di fecondazione (Blanco *et al*., 2007).

L'eterogeneità spermatica sembra essere una caratteristica tipica dei rapaci (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017) e, più in generale, delle specie monogame. Infatti il pleomorfismo sembra essere correlato al grado di competizione spermatica. Ciò sembra essere confermato dal fatto che specie comunemente poliandriche, come il pollo domestico, in cui quindi la competizione spermatica è elevata, si ha una maggiore omogeneità nella morfologia degli spermatozoi e una minore percentuale di anomalie (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017).

Perciò la presenza di forme immature e pleomorfismo spermatico plausibilmente ha un ruolo fisiologico nella riproduzione dei rapaci.

La forma della testa dello spermatozoo sembra essere legata ai cambiamenti a carico della cromatina che si verificano nel corso della spermatogenesi. Durante tale processo di rimodellamento qualsiasi interferenza genetica o ambientale può esitare in alterazioni della struttura della cromatina con conseguenti anomalie morfologiche (Singh *et al*., 2012; Kondracki *et al*., 2017). La loro valutazione e quantificazione

diviene essenziale, dal momento che un elevato numero di spermatozoi con anomalie morfologiche può condizionare fortemente la fertilità.
Diverse tipologie di anomalie spermatiche sono state identificate e descritte nei mammiferi. Lo stesso è avvenuto per gli spermatozoi di diversi uccelli come pollo domestico (Allen and Champion, 1955), tacchino, anatre, oche, ratiti (Du Plessis and Soley, 2011) e rapaci (Umapathy *et al*., 2005). Nonostante l'importanza che riveste l'individuazione di tali anomalie, spesso non sono presenti criteri classificativi univoci (Batocco, 2015). Questo accade soprattutto con gli uccelli, in cui non vi è uniformità nella descrizione morfologica delle anomalie, che spesso vengono descritte con termini così diversi da risultare estremamente difficile attuare dei confronti significativi (Du Plessis and Soley, 2011).

Generalmente ci si basa sulla stima della percentuale di spermatozoi normali e la valutazione della percentuale delle varie anomalie rilevate (Hernández-Avilés *et al*., 2019). Du Plessis and Soley (2011) hanno cercato di proporre un sistema classificativo basato sui dati ottenuti osservando il seme di Emù (*Dromaius novaehollandiae*) e su quanto riportato in letteratura, suddividendo le anomalie spermatiche in anomalie della testa ed anomalie della coda.

Le anomalie della testa includono:

1. Anomalie dell'acrosoma, che può risultare:
    - Mancante
    - Deformato (che include tutte le forme inusuali)

2. Anomalie del nucleo:
    - Testa piegata (diversi gradi di curvatura)
    - Testa arrotondata
    - Macrocefalo (dimensioni superiori alla norma)
    - Microcefalo (dimensioni inferiori alla norma)
    - Acefalo (segmento intermedio e coda normali, ma assenza di testa, non associato a teste staccate)
    - Testa staccata (completo distacco della testa dalla coda, associato alla presenza di code staccate)

Mentre le alterazioni della coda comprendono:

1. Anomalie del segmento intermedio:
   - Disgiunto (nucleo posizionato parallelamente al pezzo intermedio e distaccato da quest'ultimo)
   - Deforme (forma diversa rispetto al normale, rigonfiamento dell'area, vacuolizzazioni, aplasia)
   - Ripiegato (diversi gradi di curvatura)

2. Anomalie del segmento principale:
   - Ridotto (coda più corta rispetto la norma)
   - Code multiple (presenza di due o più flagelli)
   - Arrotolato
   - Coda staccata (totale distacco della coda dalla testa, associato alla presenza di teste staccate nel campione)

È possibile riscontrare anche gocciole citoplasmatiche, alla base della testa o a livello di segmento intermedio, o anomalie multiple (Du Plessis and Soley, 2011).

Inoltre le singole anomalie possono essere classificate, considerando la loro origine, in "primarie" (originate nel testicolo durante la spermatogenesi) e "secondarie" (originate secondariamente, durante il passaggio degli spermatozoi nel sistema extragonadale o durante la preparazione del vetrino) (Freshman, 2002). Un altro sistema le suddivide in anomalie "maggiori", associate ad alterazioni della fertilità, e anomalie "minori", che non sono necessariamente associate ad una anomalia della spermatogenesi, ma possono dare una minore fertilità se presenti in elevata concentrazione nell'eiaculato (Enciso *et al.*, 2011); e ancora in "compensabili" e "non compensabili" (Chenoweth, 2002).
Quindi, a seconda del tipo e della natura del difetto, si ha un diverso livello di compromissione della funzione spermatica e quindi della fertilità. Infatti, difetti della coda incidono sulla velocità e motilità, mentre di difetti della testa possono interferire con la capacità di penetrare l'oocita (Fischer *et al.*, 2014).

5. INSEMINAZIONE ARTIFICIALE

5.1 Ruolo dell'inseminazione artificiale negli uccelli selvatici

L'inseminazione artificiale (IA) è stata la prima tecnologia riproduttiva ad aver fornito un enorme contributo al miglioramento genetico nelle specie domestiche da reddito (Singh *et al*., 2012), comprese le specie avicole.

Essa per la prima volta fu utilizzata negli uccelli da Ivanov più di un secolo fa. (Blanco *et al*., 2009). Ma l'attuale tecnica di inseminazione artificiale utilizzata negli avicoli domestici fu messa a punto da Quinn e Burrows nel 1936 (Quinn and Burrows, 1936). Da allora è diventata parte integrante del sistema di allevamento industriale del tacchino, ma ha mostrato le proprie potenzialità anche in altri contesti, come la propagazione in cattività di specie selvatiche (Gee, 1983). Considerando il numero sempre maggiore di specie minacciate, l'inseminazione artificiale può essere efficacemente impiegata per risolvere le problematiche legate alla gestione riproduttiva di tali specie in pericolo (Blanco *et al*., 2009), sia impiegando seme fresco tal quale che diluito (Blanco *et al*., 2007). Frequentemente l'esistenza di popolazioni piccole e isolate incrementa il rischio di consanguineità. Selezionando i riproduttori e programmando gli interventi inseminativi si limita al minimo tale eventualità, salvaguardando la diversità genetica. In più garantisce di ottenere prole da esemplari geograficamente distanti o incompatibili per motivi comportamentali. In particolare, nei rapaci non è infrequente che la femmina (di maggiori dimensioni rispetto al maschio), aggredisca il partner, ferendolo o talvolta causandone la morte, come avviene spesso nell'Astore. L'IA garantirebbe, quindi, di evitare tale problematica (Lierz, 2008). Permetterebbe, inoltre, di sfruttare il valore genetico di esemplari che normalmente non avrebbero modo di riprodursi in natura, come gli uccelli affetti da disabilità a seguito, ad esempio, di traumi.

Apportando modifiche a seconda delle differenze nella taglia dell'animale, nell'anatomia e fisiologia riproduttiva e nel comportamento riproduttivo (Gee *et al*., 2004) l'IA è stata impiegata con successo nell'Ubara africana (*Chlamydotis undulata*) (Saint Jalme *et al*., 1994), gru, Anseriformi, Passeriformi, Psittaciformi e diverse specie di rapaci (Parks *et al*., 1986; Blanco *et al*., 2009). In particolare "le tecniche di raccolta del seme e inseminazione artificiale messe a punto dai falconieri […] sono usate attualmente per riprodurre falchi ibridi a scopo commerciale" (Samour, 2016a), ma sono state sfruttate anche in molti programmi di salvaguardia di specie in pericolo.

Ne è un esempio il programma di riproduzione in cattività del Falco pellegrino, messa in atto dalla *The Peregrine Fund* agli inizi degli anni ’70 (Weaver, 1991), che ha permesso di salvare la specie in Nord America. O ancora il programma portato avanti dalla *International Crane Foundation* e dalla *Patuxent Wildlife Research Center*, sempre negli Stati Uniti, per la salvaguardia di diverse specie di gru. (Samour, 2016a).

Nonostante la versatilità e l’efficacia di tale tecnica sono ancora numerose le sfide che ne rallentano l’implementazione.
Tra le principali problematiche vi è la capacità di ottenere materiale seminale di buona qualità. Questo può rivelarsi difficoltoso nelle specie non domestiche, dal momento che producono ridotti volumi di eiaculato e frequentemente questo può presentarsi contaminato per la presenza di feci ed urati (Blanco *et al*., 2009), la cui presenza è influenzata anche dalla tecnica di raccolta utilizzata.
Inoltre gli uccelli selvatici presentano una stagione riproduttiva molto breve, al contrario di quanto avviene con gli avicoli domestici. Il tempo utile per la raccolta, processazione, stoccaggio e utilizzo del seme è pertanto ridotto, e questo condiziona fortemente l’applicabilità della riproduzione artificiale in cattività. (Blanco *et al*., 2009).

5.2 *Handling* dell’animale durante la procedura di IA

La difficoltà nell’eseguire IA in specie selvatiche non risiede solo nella tecnica ma anche nella cattura, gestione e contenimento corretto. Si tratta di un lavoro laborioso che richiede grande cura, onde evitare stress e possibili danni all’animale (Gee *et al*., 2004).

Per garantire, quindi, il benessere e la sicurezza dell’uccello durante la procedura, vengono utilizzate diverse tecniche che ricalcano quelle descritte per la raccolta del seme.
In falconeria, il metodo cooperativo, utilizzato per la raccolta dell’eiaculato, è stato adattato per l’inseminazione di femmine sessualmente imprintate. La femmina risponde alle stimolazioni del falconiere assumendo la postura dell’accoppiamento e portando spontaneamente all’eversione della cloaca, con conseguente esposizione dell’ovidotto (Weaver, 1991; Gee *et al*., 2004). Spesso anche solo toccando lievemente il dorso dell’animale si ottiene il riflesso dell’accoppiamento (Blanco *et al*., 2009).

Questo permette l'inseminazione senza la necessità di contenere l'animale, facilitando notevolmente la procedura. Inoltre questa metodica sembra stimolare l'ovodeposizione in alcuni rapaci, come il Falco pellegrino e l'Aquila reale (Blanco *et al*., 2009).
In uccelli non imprintati è, invece, necessario immobilizzare la femmina. L'intervento inseminativo avviene a seguito della stimolazione mediante massaggio addominale (Gee, 1983). Lo scopo di tale massaggio è quello di preparare l'animale alla procedura inseminativa, analogamente a quanto avviene nella raccolta del seme. Grazie alla stimolazione manuale, l'animale si rilassa, rendendo possibile l'esposizione dell'apertura cloacale. Una volta che la cloaca è accessibile, il seme può essere deposto direttamente nella cloaca stessa o nella porzione più distale dell'ovidotto (vagina).
Per individuare l'ovidotto è necessario indurne l'eversione, apportando una leggera ma costante pressione addominale (Cade *et al*., 1977) e manipolando l'area pericloacale (Blanco *et al*., 2009). La pressione applicata a livello addominale, e di conseguenza sui visceri, spinge la porzione distale dell'ovidotto verso l'esterno. Tale pressione deve essere mantenuta per tutta la durata dell'intervento inseminativo (Cade *et al*., 1977). L'ovidotto si presenterà come una leggera depressione posta al centro della massa di tessuto rossastro fatta protrudere (Weaver, 1991). Terminata l'IA, rimuovendo la pressione addominale, l'ovidotto deve tornare in sede (Cade *et al*., 1977).
Benché possa sembrare una metodica relativamente semplice, l'eversione può, in realtà, risultare difficoltosa in alcuni uccelli selvatici (soprattutto se di grandi dimensioni), perciò è possibile localizzare la vagina mediante palpazione o grazie all'utilizzo di uno *speculum* di dimensioni idonee (Gee *et al*., 2004; Blanco *et al*., 2009).

5.3 Caratteristiche riproduttive femminili di interesse

Chi esegue l'IA deve essere a conoscenza dell'anatomia dell'apparato riproduttore femminile e delle eventuali differenze esistenti tra le diverse specie.
L'apparato riproduttore femminile, infatti, è la sede dello stoccaggio degli spermatozoi, il luogo in cui avviene la fecondazione e la formazione delle uova, ed è costituito dalle gonadi e dall'ovidotto.

L'ovaio è un organo soggetto a forti modificazioni e, durante la stagione riproduttiva, è in grado di portare avanti lo sviluppo di una o più uova, prima di andare incontro ad

una quasi completa regressione durante la stagione non riproduttiva (Madeddu, 2008). Allo stadio embrionale si assiste allo sviluppo di entrambe le ovaie e ovidotti. Nell'ordine dei *Galliformes*, tuttavia, si assiste alla regressione dell'ovaio e dell'ovidotto destro, mentre nei *Falconiformes* ed *Accipitriformes* entrambe le ovaie, e i relativi ovidotti, rimangono funzionali, benché permanga una certa asimmetria tra le due gonadi (Blanco *et al*., 2007; Johnson, 2015).

Durante il periodo di ovideposizione, le ovaie sono in piena attività e sono caratterizzate dalla presenza di follicoli a tutti gli stadi di sviluppo, da quelli primordiali quiescenti fino ai follicoli preovulatori. Di conseguenza, la selezione sequenziale dei follicoli indifferenziati e il loro rapido accrescimento, garantisce la presenza di un follicolo maturo ad intervalli stabili e specie-specifici (Madeddu, 2008), i quali dovranno essere tenuti in considerazione nella pratica di IA.

L'ovidotto è composto da cinque regioni morfologicamente distinguibili: infundibolo, magnum, istmo, camera calcigena e vagina. (Blanco *et al*., 2009). L'infundibolo è la regione dell'ovidotto dove avviene la fecondazione dell'oocita e dove viene prodotto il primo strato di albume (Madeddu, 2008). Esso rappresenta, inoltre, la seconda sede di stoccaggio per gli spermatozoi (Johnson, 2015).

La porzione successiva è rappresentata dal magnum, la regione più lunga dell'ovidotto, in cui viene depositato gran parte dell'albume (Johnson, 2015). Segue poi l'istmo, chiaramente distinguibile dal magnum per la presenza di uno spesso strato di muscolatura circolare e per il minor sviluppo del tessuto ghiandolare (Johnson, 2015). Nell'istmo si assiste alla formazione delle membrane testacee (Madeddu, 2008).

La formazione del guscio, invece, avviene nella camera calcidena (utero) (Johnson, 2015).

La vagina costituisce l'ultimo tratto dell'ovidotto. Prossimalmente, a livello della giunzione utero-vaginale, uno sfintere muscolare la separa dall'utero, mentre distalmente si apre nell'urodeo. La vagina non ha alcun ruolo nella formazione dell'uovo, ma, assieme alla camera calcigena, partecipa alla sua espulsione.

A livello della giunzione utero-vaginale sono presenti gli *sperm storage tubules* (SSTs) che, come descritto precedentemente (Capitolo 2, sezione 2.1: Anatomia e fisiologia), rappresentano un sito di stoccaggio spermatico e un luogo immuno-privilegiato (Johnson, 2015).

Durante la stagione riproduttiva, in risposta ai cambiamenti ormonali, ovaie e ovidotti aumentano di dimensioni, aumenta la loro vascolarizzazione ed incrementano le secrezioni vaginali, si assiste ad una distensione addominale e alla maggiore elasticità delle ossa pubiche (Blanco *et al*., 2009). Inoltre, con la maturazione dei follicoli aumenta sensibilmente il peso corporeo della femmina (Blanco *et al*., 2007). Tutti questi elementi possono essere considerati per individuare il momento più idoneo per l'IA.

A seguito della fecondazione si assiste alla deposizione delle uova. Generalmente i falchi depongono in media 2-4 uova (Lierz, 2014) e il tempo di incubazione si aggira attorno i 31-33 giorni (in Falco pellegrino, Girsacro e Falco sacro) (Lierz, 2008). L'intervallo tra la deposizione di un uovo e il successivo differisce nelle diverse specie. Negli avicoli domestici (polli, tacchini) il ciclo di ovideposizione può variare dalle 24 alle 30 ore (Boz *et al*., 2014). Mentre negli uccelli selvatici tale intervallo generalmente è più lungo e variabile. Ad esempio, nei falchi l'intervallo di deposizione delle uova è di circa 52 ore (Weaver, 1991). Nei programmi di riproduzione artificiale diventa fondamentale conoscere tali intervalli, al fine di coordinare gli interventi inseminativi e massimizzare la produzione di uova fertili.

5.4 Inseminazione con seme fresco

Come precedentemente accennato, l'IA può essere eseguita collocando il seme in cloaca o più profondamente, posizionandolo in vagina (Weaver, 1991) o a livello di magnum (Blanco *et al*., 2002a), e solitamente, negli uccelli selvatici, i dispositivi utilizzati per la deposizione dello sperma sono monouso. Questi, inoltre, vengono frequentemente modificati per meglio adattarsi alle caratteristiche anatomiche della specie. Spesso comprendono cateteri di vari diametri (fino a cateteri endovenosi per le specie più piccole), siringhe o lo stesso capillare (Gee *et al*., 2004) utilizzato per la raccolta, connesso ad una siringa da inseminazione costruita *ad hoc* (Weaver, 1991). Sarebbe, però, meglio evitare strumenti di vetro, perché potrebbero ledere la mucosa dell'ovidotto (Weaver, 1991).
La deposizione del seme intravaginale è una pratica comune che permette di avere una buona fertilità, facilmente applicabile soprattutto negli uccelli di medio-piccole dimensioni. Tuttavia vi è il rischio che il seme deposto in tale sede defluisca in cloaca. Per evitare ciò è necessario collocare il materiale seminale alla idonea profondità (Gee

et al., 2004), senza però superare la giunzione utero-vaginale, sede degli SSTs (Blanco *et al*., 2009).

Un'eccellente fertilità è stata ottenuta inseminando a 1-2 cm di profondità nel Gheppio americano (Bird *et al*., 1976) e a circa 2-3 cm di profondità nei rapaci di maggiori dimensioni, come il Falco pellegrino (Weaver, 1991), così come nell'Aquila di Bonelli (*Hieraaetus fasciatus*) e nell'Aquila reale (Blanco *et al*., 2009).

Nei casi in cui non è possibile individuare la vagina, si può raggiungere un buon risultato con l'inseminazione cloacale, purché eseguita correttamente, con la giusta frequenza e con un'idonea concentrazione spermatica (Gee *et al*., 2004).

In quest'ultimo caso la frequenza degli interventi inseminativi dipende, oltre che dalla concentrazione spermatica, anche dalla durata della fertilità degli spermatozoi stessi (Gee *et al*., 2004), che si attesta attorno ai 9 giorni nell'Aquila reale (*Aquila chrysaetos*) (Grier, 1973), 6-8 giorni nel Falco della prateria (*Falco mexicanus*) (Boyd, 1978), 6 giorni nella Poiana codarossa (*Buteo jamaicensis*) (Gee and Temple, 1978). Minore è la durata della fertilità spermatica, maggiore dovrà essere la frequenza degli interventi inseminativi (Gee *et al*., 2004).

Se l'inseminazione in cloaca non viene eseguita nel modo idoneo, può esitare in una fertilità inferiore (circa il 10% in confronto al 75% riscontrato con l'inseminazione vaginale) (Weaver, 1991).

Blanco *et al*. (2002a) hanno ideato una nuova metodica di inseminazione, sperimentata nell'aquila e nel Falco pellegrino, in cui il seme viene depositato nel magnum, quindi superando utero e istmo.

Si tratta di una procedura eseguita in endoscopia, con animale sedato posto in decubito dorsale, servendosi di un catetere (0,2 mm) che permette di raggiungere il magnum, superando vagina, giunzione utero-vaginale e istmo. La lunghezza del catetere da inserire è specie-specifica (Blanco *et al*., 2002a).

Questa tecnica riduce notevolmente il numero di spermatozoi necessari e permette di avere deposizione di uova anche quando la qualità spermatica è scarsa. Tuttavia, rispetto alle altre tecniche sopracitate, richiede più tempo per la sua esecuzione e risulta in maggiore stress per l'animale (Blanco *et al*., 2009). Inoltre impedisce la selezione degli spermatozoi, che normalmente si verifica a livello vaginale, permettendo anche a cellule spermatiche solitamente eliminate di popolare le porzioni più prossimali dell'ovidotto (Blanco *et al*., 2009).

Generalmente gli interventi inseminativi vengono eseguiti da due a tre volte a settimana a partire da 10 giorni prima dell'inizio dell'ovideposizione, poi dopo ogni ovideposizione stessa (Temple, 1972; Blanco *et al*., 2009).
L'introduzione del seme non deve avvenire troppo precocemente, poiché dopo la deposizione, le contrazioni oviduttali persistono per più di 30 minuti, compromettendo la risalita passiva degli spermatozoi appena depositati (Blanco *et al*., 2009). Mentre, se l'IA avvenisse poco prima dell'ovideposizione, si assisterebbe all'espulsione di gran parte dell'eiaculato assieme all'uovo, con conseguente calo della fertilità (Blanco *et al*., 2009). Quindi si preferisce attendere qualche ora dall'emissione dell'uovo prima di procedere con l'inseminazione.
In particolare, nei falchi, l'inseminazione dovrebbe avvenire entro le 3-6 ore da ogni deposizione (Weaver, 1991) o comunque non oltre le 12 ore (Cade *et al*., 1977), in modo da garantire la fecondazione dell'uovo successivo.
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.

Affinchè l'intervento inseminativo vada a buon fine, anche il quantitativo di eiaculato utilizzato deve essere idoneo.
Il volume di seme introdotto dipende dalla concentrazione del campione e dalla capacità dell'apparato riproduttore femminile di trattenerlo (Gee, 1983). Idealmente, infatti, la dose per l'inseminazione dovrebbe essere caratterizzata da un'elevata concentrazione spermatica e da un volume ridotto, per minimizzare il deflusso di seme (Blanco *et al*., 2009).
Tuttavia, individuare la dose inseminante e la concentrazione più idonea spesso rappresenta una vera e propria sfida, dal momento che nelle specie selvatiche queste informazioni sono in gran parte sconosciute (Gee, 1983). Nei passeriformi è consigliato utilizzare per l'IA un volume di seme pari a 5-10 µl; da 33 a 150 µl negli uccelli di medie dimensioni come i falchi (Blanco *et al*., 2009); 100-200 µl nelle gru (Gee and Temple, 1978). Volumi maggiori potrebbero eccedere la capacità dell'ovidotto e defluire all'esterno, con la conseguente perdita del prezioso materiale seminale.
In alcuni studi è stata indagata la minima concentrazione spermatica in grado di dare uova fertili. Un quantitativo di 10×10^6 cell/eiaculato nell'Ubara africana (Saint Jalme *et al*., 1994); $250\text{-}300 \times 10^6$ cell/eiaculato nel Piccione domestico (Sontakke *et al*., 2004) e 8×10^6 cell/eiaculato nei falchi (Blanco *et al*., 2009) sembrano dare buoni

risultati, ma è plausibile che lo stesso si ottenga anche con concentrazioni inferiori, in virtù della presenza degli SSTs. Infatti, è stato riportato che un numero di spermatozoi pari a 0,9 x 10^6 cell/eiaculato sia sufficiente per ottenere uova fertili nei falchi (Lierz *et al*., 2016).

5.5 Diluizione e conservazione del seme

Normalmente, per l'IA negli uccelli, si predilige l'utilizzo del seme fresco (Boyd and Schwartz, 1991). Tuttavia ciò non è sempre possibile, soprattutto se la riproduzione artificiale coinvolge specie non domestiche, in cui spesso può non esserci una perfetta sincronia riproduttiva tra i maschi e le femmine. Si rende quindi necessario poter conservare il materiale seminale fino al momento più idoneo per l'intervento inseminativo. Questo poi diventa indispensabile se si lavora con specie rare, in cui la conservazione del seme permette anche di custodire materiale genetico prezioso, al fine del mantenimento della biodiversità.

Lo stoccaggio del seme a breve termine prevede di conservare il materiale seminale all'interno di tubi capillari o provette mantenuti a temperatura ambiente o a temperatura di refrigerazione (2-4 °C), la quale permette di mantenere la funzionalità spermatica anche per 12-24 ore ed oltre (Gee *et al*., 2004; Lierz *et al*., 2016). Affinché ciò sia possibile è necessario che il campione venga protetto dalla contaminazione e dalla disidratazione (Gee, 1983). Inoltre il plasma seminale fornisce agli spermatozoi tutti i nutrienti indispensabili per la loro intensa attività metabolica, la quale, però, può essere mantenuta solo per un periodo limitato di tempo (Gadea, 2003). Se si vuole prolungare tale attività si rende necessario l'utilizzo di *extenders*, o diluitori. Si tratta di soluzioni saline tamponate biocompatibili con il seme, che forniscono le sostanze necessarie al mantenimento nel tempo delle caratteristiche funzionali degli spermatozoi (Donoghuea and Wishart, 2000); Gadea, 2003). Per espletare tale funzione gli *extenders* devono possedere determinati requisiti. Devono contenere sostanze nutritive (glucosio, fruttosio), che permettano il mantenimento del metabolismo spermatico necessario a garantire la motilità, e sostanze che consentano il controllo della pressione osmotica (NaCl, KCl) e del pH (bicarbonato, Tris, HEPES, acido citrico) (Gadea, 2003). Infatti, durante lo stoccaggio *in vitro* si assiste all'incremento della concentrazione di acido lattico in conseguenza al metabolismo spermatico (Donoghuea and Wishart, 2000). Ciò provoca una diminuzione del pH, che comporta un danno cellulare e la compromissione della vitalità e motilità degli

spermatozoi stessi (Donoghuea and Wishart, 2000). L'*extender*, perciò, deve poter ridurre il più possibile tali fluttuazioni del pH seminale. Inoltre possono essere presenti principi attivi in grado di limitare la crescita microbica (streptomicina, penicillina, polimixina B) (Gadea, 2003; Rehman *et al*., 2013). In particolare questi devono essere inclusi se l'*extender* contiene glucosio e se il seme diluito viene conservato a temperatura ambiente, onde evitare la proliferazione di batteri come *E. coli* e *Salmonella spp.* (Gadea, 2003).

La diluizione del seme permette anche di prevenire la disidratazione del campione o di ottenere un maggiore volume di materiale, consentendo l'inseminazione di più femmine con un singolo eiaculato, se la concentrazione spermatica è sufficientemente elevata (Gee, 1983). Inoltre consente di ridurre gli effetti negativi nella contaminazione del seme da parte degli urati (Blanco *et al*., 2002a), salvaguardando la fertilità.

L'identificazione di un idoneo *extender* rappresenta, inoltre, il primo *step* per l'ideazione di protocolli di crioconservazione (Lierz *et al*., 2016). Infatti, l'aggiunta di un crioprotettore al diluitore garantisce il mantenimento dell'integrità della membrana spermatica, proteggendo le cellule dai potenziali danni morfo-funzionali generati dalla procedura di congelamento-scongelamento.

5.6 Principali *extenders* usati negli uccelli

Come accennato poc'anzi la diluizione del seme può essere effettuata per prevenire la disidratazione (soprattutto se il volume di materiale è esiguo), se si ha un eiaculato particolarmente viscoso e concentrato o se non si vuole utilizzare immediatamente il materiale raccolto (Blanco *et al*., 2009). In quest'ultimo caso la scelta dell'*extender* dipenderà dal tipo di stoccaggio che si intende utilizzare e dalla durata dello stesso. Infatti, in base a quanto tempo si intende mantenere la funzione spermatica, il diluitore dovrà avere caratteristiche peculiari (Gadea, 2003).

Vista la grande variabilità nelle caratteristiche spermatiche, idealmente sarebbe opportuno considerare tali differenze, scegliendo *extenders* specie-specifici (Blanco *et al*., 2009). Tuttavia, benché molti ricercatori stiano investendo sullo studio del diluitore più adatto ad ogni singola specie di uccello selvatico, in sua assenza è possibile utilizzare la soluzione Ringer (Owen, 1941; Boyd and Schwartz, 1991) o i prodotti impiegati in avicoltura (Blanco *et al*., 2009).

Gran parte degli *extenders*, infatti, mima le caratteristiche biochimiche del seme degli avicoli domestici (Donoghuea and Wishart, 2000) (pollo e tacchino), in virtù del fatto che gran parte delle ricerche hanno riguardato lo studio delle caratteristiche spermatiche proprio in queste specie, per le quali vi era l'interesse di implementare le tecniche di riproduzione artificiale dal punto di vista commerciale.

I diluitori più utilizzati in avicoltura comprendono il *Beltsville Poultry Semen Extender* (BPSE) (Sexton, 1977) e il *Lake's diluent*. (Lake and Stewart, 1978). Questi, chiaramente, hanno trovato impiego anche negli uccelli selvatici. Il BPSE e stato, infatti, sperimentato in fagiani (Herrera *et al*., 2005), Codone (*Anas acuta*) (Penfold *et al*., 2001), Oca delle Aleutine (*Branta canadensis leucopareia*) (Gee and Sexton, 1990), Gru canadese (*Grus canadensis*) (Gee *et al*., 1985), Piccione domestico (Cheng *et al*., 2002), Gheppio americano (Gee *et al*., 1993), Aquila reale (Knowles-Brown and Wishart, 2001) e Poiana di Harris (Herrera *et al*., 2017). Mentre il *Lake's diluent* è stato utilizzato in molte specie di rapaci come Falco pellegrino (Parks *et al*., 1986; Boyd and Schwartz, 1991), Gheppio americano (Brock *et al*., 1984), Poiana di Harris (Herrera *et al*., 2017), Aquila reale ed Aquila di Bonelli (Blanco *et al*., 2000) e alcuni pappagalli (Schneider *et al*., 2017). In altre specie, come Piccione selvatico (Sontakke *et al*., 2004), Grifone dorsobianco del Bengala (Umapathy *et al*., 2005) e Grifone (*Gyps fulvus*) (Madeddu, 2008), è stato invece sperimentato l'utilizzo del *Tyrode's medium* supplementato di albumina, lattato, e piruvato (TALP). Quest'ultimo *extender* in particolare si è rivelato efficace nel mantenimento della vitalità e motilità spermatica nel Grifone dorsobianco del Bengala, dimostrando un'efficacia maggiore rispetto al BPSE e al *Lake's diluent* nello stoccaggio del seme a breve termine (Umapathy *et al*., 2005). Lo stesso era stato notato da Sontakke *et al*. (2004), i quali stabilirono che la motilità spermatica nel Piccione domestico era mantenuta per un tempo maggiore rispetto a quando il seme era diluito con gli *extenders* normalmente utilizzati in avicoltura, dimostrando che un diluitore può dare risultati differenti a seconda della specie.

L'effetto dell'*extender* dipende anche dalla diluizione. La diluizione 1:1 (seme:*extender*), oltre ad essere consigliata al fine di mantenere una concentrazione sufficiente a garantire il successo dell'intervento di IA (Blanco *et al*., 2009), ha permesso di mantenere una motilità spermatica del 50% per più di due ore nel Grifone dorsobianco del Bengala (Umapathy *et al*., 2005). Mentre nel Piccione selvatico la percentuale di spermatozoi motili è risultata significativamente maggiore

alla diluizione 1:100 con TALP rispetto alla diluizione 1:5, 1:10 e 1:50 (Sontakke *et al*., 2004).
Quindi il mantenimento della funzionalità spermatica nel tempo dipende dall'effetto combinato della specie, dell'*extender* utilizzato, della diluizione, nonché della temperatura di stoccaggio.

5.7 Crioconservazione

L'utilizzo dell'inseminazione artificiale nell'ambito di progetti di riproduzione in cattività ha fatto sorgere molte domande riguardo l'applicabilità di tecniche di conservazione del seme nel lungo periodo, visto il crescente numero di specie a rischio. Infatti, una delle principali problematiche della riproduzione artificiale è il possedere materiale seminale nel momento più opportuno e nel luogo richiesto (Parks *et al*., 1986).
Per poter conservare il seme nel lungo periodo diventa fondamentale ridurre il tasso metabolico spermatico. Questo obbiettivo viene raggiunto abbassando la temperatura del campione in modo progressivo, onde evitare uno shock da freddo (Blesbois and Brillard, 2007). La scelta della temperatura di stoccaggio segue il principio secondo cui "maggiore è il tempo della conservazione, più bassa deve essere la temperatura" (Blesbois and Brillard, 2007).
Per tale motivo la crioconservazione è attualmente l'ultima frontiera della riproduzione artificiale nell'ambito degli uccelli selvatici. Tale tecnica, infatti, non solo consentirebbe di facilitare e implementare la riproduzione in cattività, ma permetterebbe anche di stoccare materiale seminale di specie rare o in pericolo (Parks *et al*., 1986), o di elevato valore genetico nonché commerciale, per un periodo di tempo anche molto lungo, coprendo così più stagioni riproduttive. In tal modo verrebbe mantenuto anche un adeguato livello di diversità genetica (Ballou, 1992; Blanco *et al*., 2009), fondamentale nel momento in cui si lavora con popolazioni piccole ed isolate.

Potenzialmente potrebbero essere crioconservati i gameti (spermatozoi e oociti) o gli embrioni (Madeddu, 2008). Tuttavia l'applicazione sugli oociti e gli embrioni non è possibile negli uccelli a causa della caratteristica dell'uovo megalecitico (Blesbois *et al*., 2007), pertanto la crioconservazione del materiale seminale rappresenta l'unico modo per conservare a lungo termine il potenziale genetico di un esemplare.

La fattibilità e l'efficacia della tecnica hanno, quindi, risvolti importanti non solo nell'ambito della bioconservazione, ma potenzialmente anche economici.
Tuttavia la crioconservazione può esprimere al massimo le proprie potenzialità solo attraverso l'applicazione sistematica della stessa in un numero sufficiente di esemplari (Ballou, 1992). Ciò, però, è limitato dalle ancora scarse conoscenze riguardanti la fisiologia riproduttiva e le caratteristiche spermatiche di molte specie selvatiche.
La crioconservazione del seme negli uccelli è stata oggetto di interesse all'interno della comunità scientifica per quasi un secolo (Blesbois and Brillard, 2007). Benché alcune osservazioni fossero state effettuate già agli inizi del '900, i primi ad ottenere uova fertili da una gallina inseminata con seme congelato furono Shaffner e colleghi nel 1941, i quali tuttavia non ottennero la nascita di pulcini vivi (Blesbois, 2006). Nel 1949 Polge e colleghi scoprirono che il glicerolo era in grado di proteggere gli spermatozoi durante il congelamento (Blesbois, 2006). Da allora sono stati condotti numerosi studi con lo scopo di migliorare e standardizzare la metodica di crioconservazione del seme negli uccelli, cercando di ampliare il campo di applicazione anche in altre specie, come tacchino, anatre (Tselutin *et al*., 1995), oche, faraone (Blesbois, 2006) e alcune specie selvatiche.

Il congelamento e lo scongelamento del seme costituiscono processi non-fisiologici che richiedono un'elevata capacità di adattamento degli spermatozoi allo shock termico ed osmotico (Blesbois, 2006).
In particolare gli spermatozoi degli uccelli, rispetto a quelli dei mammiferi, sono caratterizzati da un ridotto volume citoplasmatico e da una ampia superficie di membrana, e questo li rende molto più suscettibili ai cambiamenti del micro-ambiente (Blesbois, 2006). Inoltre posseggono una coda in proporzione molto più lunga rispetto a quella degli spermatozoi dei mammiferi, e questo li rende maggiormente soggetti ai danni dovuti al congelamento o alla processazione del campione precedente alla procedura di crioconservazione (Blesbois, 2006). L'abbassamento drastico della temperatura comporta un'alterazione strutturale e funzionale delle glicoproteine di membrana (fondamentali per il trasposto degli spermatozoi lungo l'ovidotto, lo stoccaggio nei SSTs e l'interazione con l'uovo) (Long, 2006) e provoca un danno anche al citoscheletro, al flagello e al nucleo, oltre che alterare il metabolismo dello spermatozoo (Singh *et al*., 2012). Ciò compromette la vitalità e la motilità spermatica (Blesbois and Brillard, 2007) e porta ad una diminuzione della capacità degli spermatozoi di sopravvivere all'interno degli SSTs. Inoltre il danno causato dal

processo di congelamento e scongelamento provoca un aumento della quota di spermatozoi eliminata prima che questi raggiungano i siti di stoccaggio (Long, 2006), con conseguente calo della possibilità di fecondazione. Tuttavia è stato notato che, usando seme congelato, la mortalità embrionale appare ridotta in confronto a quando si usa il seme fresco. Questo probabilmente accade proprio perché la crioconservazione enfatizza il naturale processo di selezione spermatica che avviene nell'ovidotto, prima dello stoccaggio negli SSTs (Blesbois and Brillard, 2007).

Perciò, sin dalla prima applicazione della crioconservazione, si è reso necessario l'utilizzo di sostanze che, aggiunte all'*extender*, fossero in grado di proteggere gli spermatozoi durante il processo di congelamento (Herrera *et al*., 2005), senza essere esse stesse causa di un potenziale danno cellulare.
Tra i crioprotettori più utilizzati in avicoltura vi sono il glicerolo, il dimetil-solfossido (DMSO), la dimetil-acetammide (DMA), il glicole etilenico, il glicole propilenico e la dimetil-formammide (Herrera *et al*., 2005). Tutti questi agiscono penetrando all'interno della cellula, limitando la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare e proteggendo lo spermatozoo dal danno derivante dall'eccessiva concentrazione di soluti intra ed extracellulare (Herrera *et al*., 2005).
Al contrario, il polivinilpirrolidone (PVP), espleta la propria funzione rimanendo all'esterno della cellula (Herrera *et al*., 2005).

Vista la grande specie-specificità sia dal punto di vista della morfologia che del metabolismo spermatico, la crioconservazione negli uccelli rappresenta una vera e propria sfida.
Il successo di tale metodica dipende dalla combinazione di diversi fattori, tra cui la specie, il tipo di *extender* e crioprotettore utilizzato, il tipo di interazione tra spermatozoo e crioprotettore (avendo un ridotto volume citoplasmatico gli spermatozoi degli uccelli hanno una minore capacità di far penetrare il crioprotettore e quindi di sopravvivere al processo di congelamento), la temperatura e la velocità di congelamento-scongelamento e il sistema di packaging utilizzato per lo stoccaggio del seme (Blesbois and Brillard, 2007). Pertanto, per garantire l'utilizzo della crioconservazione nelle specie selvatiche, diventa fondamentale poter gestire tali fattori, al fine di mantenere ottimale la capacità fecondante dello sperma conservato.

Nonostante le evidenti criticità, la crioconservazione è stata sperimentata in diverse specie di uccelli selvatici (Tabella 5.1), nelle quali si è cercato di individuare il più idoneo crioprotettore e il migliore protocollo di congelamento e scongelamento.

Tabella 5.1: Specie di uccelli selvatici nelle quali è stata sperimentata con successo la crioconservazione del seme.

Specie	***Nome scientifico***	***Crioprotettore***	***Riferimento***
Gru canadese	*Grus canadensis tabida*	6% DMSO	Gee, *et al.*, 1985
Oca delle Aleutine	*Branta canadensis leucopareia*	6-7% DMSO	Gee and Sexton, 1990
Falco pellegrino	*Falco peregrinus*	13,6% Glicerolo	Parks *et al.*, 1986
Pappagallino ondulato	*Melopsittacus undulatus*	13,6% Glicerolo	Samour *et al.*, 1988
Gheppio americano	*Falco sparverius*	13,6% Glicerolo 12,3% DMA 6-8-10% DMSO	Brock *et al.*, 1984 Brock and Bird, 1991 Gee, et al., 1993
Ubara africana	*Chlamydotis undulata*	8% DMA	Hartley *et al.*, 1999
Pinguino di Magellano	*Spheniscus magellanicus*	16% DMSO 16% EG	O'Brien *et al.*, 1999
Piccione selvatico	*Columba livia*	8% DMSO	Sontakke et al., 2004
Grifone dorsobianco del Bengala	*Gyps bengalensis*	8% DMSO	Umapathy et al., 2005
Gallo cedrone	*Tetrao urogallus L.*	6% DMA	Kowalczyk et al., 2012

DMSO = Dimetil-solfossido
DMA = Dimetil-acetamide
EG = Etilen-glicole

Parks *et al*. (1986) per primi sperimentarono la crioconservazione sul seme di Falco pellegrino, utilizzando come crioprotettore il glicerolo (1,48 M). Raffreddando il seme con i vapori di azoto a 6°C/min fino a -180°C, poi immergendo il campione nell'azoto stesso, riuscirono a conservare il seme per 1-2 mesi.

Sebbene il glicerolo sembri essere il crioprotettore più efficace, se inserito nell'ovidotto provoca una totale assenza di fertilità in virtù delle sue proprietà contraccettive (Blesbois and Brillard, 2007). Per tale motivo si rende necessario rimuoverlo prima dell'inseminazione (Parks *et al*., 1986).

Negli uccelli l'effetto contraccettivo del glicerolo è massimo se l'IA avviene a livello vaginale o in prossimità della giunzione utero-vaginale, mentre tale effetto è nullo se il seme viene deposto più prossimalmente. È probabile quindi che, a seconda della posizione lungo l'ovidotto, il glicerolo stimoli un qualche fattore sconosciuto che limita il reclutamento degli spermatozoi dagli SSTs. (Blesbois and Brillard, 2007).

Per specie in cui si hanno elevati volumi di seme ed elevate concentrazioni (come il pollo), l'ulteriore perdita di spermatozoi a seguito del processo di centrifugazione per eliminazione del glicerolo è irrilevante. Diverso se si ha a che fare con specie che producono quantità di eiaculato estremamente ridotte come i rapaci (Brock and Bird, 1991). Per tale motivo Parks *et al*. (1986) idearono una metodica di rimozione del glicerolo che meglio potesse adattarsi al Falco pellegrino. Attraverso un sistema di micro-dialisi fu possibile ridurre la concentrazione di glicerolo fino a livelli inferiori all'1%, necessari ad annullare l'effetto contraccettivo e garantire una buona fertilità. Tuttavia fu notato che la fertilità era fortemente influenzata dalla velocità con cui era stato eseguito il processo di dialisi, dalla composizione e dal pH del dializzato (Parks *et al*., 1986).

Benché la micro-dialisi si sia dimostrata un efficiente mezzo di rimozione del crioprotettore, essa comporta che la preparazione del seme richieda circa 1,5 ore prima di poter eseguire l'IA (Parks and Hardaswic, 1987).

Oltre ad allungare i tempi di attesa per l'utilizzo del seme, il che può rivelarsi problematico in alcune realtà, il processo di rimozione del glicerolo può comunque compromettere ulteriormente la vitalità degli spermatozoi. Pertanto si rende necessario l'utilizzo di crioprotettori, come DMA e DMSO, che non necessitino della rimozione prima dell'utilizzo del seme. Il DMA ha dato ottimi risultati del Gheppio americano (Brock and Bird, 1991), mentre nel seme di Girfalco ha comportato una totale perdita della motilità progressiva dopo scongelamento (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Pertanto un crioprotettore può risultare efficace in una specie e totalmente inadeguato in un'altra, a dimostrazione della specie-specificità della risposta degli spermatozoi al processo.

Non solo la tipologia di crioprotettore ma anche la velocità del processo di congelamento può esitare in risposte differenti nelle varie specie di rapaci.
Infatti, Blanco *et al*. (2002b) hanno notato che il protocollo di raffreddamento rapido (50°C/min), rispetto al raffreddamento lento (1°C/min da 4°C a – 20°C), diminuisce la motilità spermatica nel Falco pellegrino, ma anche in altre specie di rapaci come nell'Aquila reale (*Aquila chrisaetos*), Aquila di Bonelli (*Hieraaetus fasciatus*) e Aquila minore (*Hieraaetus pennatus*), ma non nell'Aquila iberica (*Aquila adalberti*).
Inoltre, nel Falco pellegrino, hanno evidenziato una differenza individuale alla resistenza degli spermatozoi ai diversi protocolli, con esemplari il cui sperma era in grado di resistere anche al protocollo di raffreddamento rapido. Nello sperma dei maschi che maggiormente tolleravano il processo di congelamento e scongelamento è stata poi individuata una maggiore percentuale di colesterolo e domini lipidici a livello di membrana (Blanco *et al*., 2002b).

Un'altra problematica legata alle caratteristiche spermatiche del seme dei rapaci risiede nella presenza di una elevata percentuale di forme immature (spermatociti e spermatidi), la quale può compromettere l'efficacia dell'intero processo (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Ad esempio, sempre nel Falco pellegrino la concentrazione di spermatogoni nel seme è molto elevata (268 ± 10,4 cell/µl) (Blanco *et al*., 2002b). Ciò può condizionare l'efficacia della crioconservazione dal momento che spermatozoi e spermatogoni sopportano in modo diverso i differenti *cooling rate*, così come i diversi crioprotettori.
Gli spermatogoni, infatti, sopportano meglio un raffreddamento lento e la loro percentuale di sopravvivenza è maggiore in presenza di DMA, mentre per gli spermatozoi il DMSO sembra dare migliori risultati (Blanco *et al*., 2002b).
Inoltre gli elementi immaturi, avendo un maggiore quantitativo di citoplasma, sono responsabili della produzione di un elevato quantitativo di ROS durante il processo di congelamento (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Ciò costituisce un potenziale pericolo per gli spermatozoi, che potrebbero venir danneggiati.

Quindi le differenze di specie ed individuali acquistano una grande importanza dal momento che possono condizionare fortemente il processo di crioconservazione, pertanto devono essere tenute in considerazione nel momento in cui si intende intraprendere questo tipo di metodica, la quale dovrà essere adattata di volta in volta. Purtroppo sono proprio queste differenze a limitare l'applicazione della

crioconservazione nei rapaci. A questo si aggiunge il maggiore costo dell'utilizzo del seme congelato in confronto al seme fresco, fattore che ne limita perciò l'impiego in allevamento (Blesbois and Brillard, 2007).

6. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente studio è comprendere quali siano le caratteristiche spermatiche del seme tal quale di Falco pellegrino (*Falco peregrinus*) e di Girsacro (*F. rusticolus* x *F. cherrug*) (ibrido usato in falconeria), in particolare in termini di motilità, vitalità, morfologia e morfometria, e quali siano le potenziali alterazioni dei parametri menzionati nel seme diluito con un *extender* contenente tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris), rispetto al seme tal quale.

I dati così ricavati potranno essere utilizzati per comprendere se tale *extender*, impiegato per la prima volta nei rapaci, si possa prestare allo scopo di mantenere ottimali le caratteristiche spermatiche nel breve periodo, senza comprometterne la fertilità.

Inoltre si vuole testare l'efficacia della colorazione Rosa Bengala nel mettere in evidenza le diverse strutture dello spermatozoo, con lo scopo di individuare eventuali anomalie morfologiche e di attuare un'attenta valutazione morfometrica, grazie anche all'ausilio di ImageJ. Tale colorazione è stata impiegata solo in poche specie di uccelli e, nel presente studio, è stata usata per la prima volta per la valutazione della morfologia spermatica dei falchi.

La prospettiva futura sarà quella di congelare il seme e utilizzare i dati inerenti la morfologia, la motilità e la vitalità a fresco per compararli con i rilievi post-scongelamento, al fine di individuare eventuali cambiamenti incorsi a carico degli spermatozoi durante il processo.

L'obbiettivo è anche quello di poter attuare un'analisi dello sperma con metodi semplici, che richiedono apparecchiature poco costose, con la speranza che possa essere eseguita agevolmente anche in campo e che diano risultati soddisfacenti su più specie.

Questo potrebbe portare un beneficio là dove si intendano attuare programmi di riproduzione in cattività, mediante inseminazione artificiale, di specie di uccelli a rischio critico, per le quali spesso sono disponibili pochi dati riguardanti le caratteristiche spermatiche.

7. MATERIALI E METODI

7.1 Animali inclusi nello studio

La raccolta dei campioni e una parte della valutazione degli stessi sono avvenuti presso l'Azienda agricola El Gambinel, sita a Nave San Rocco (TN). Nell'azienda sono allevate per la falconeria diverse specie di rapaci tra cui Falco pellegrino (*Falco peregrinus*), Smeriglio (*Falco columbarius*), Astore (*Accipiter gentilis*), Poiana di Harris (*Parabuteo unicinctus*) e ibridi come Girsacro (*Falco rusticolus* x *Falco cherrug*) e Girpellegrino (*Falco rusticolus* x *Falco peregrinus*), tutti inanellati e provvisti di certificazione comunitaria CITES.

In allevamento, su tutte le specie sopracitate, viene routinariamente impiegata l'inseminazione artificiale e il materiale seminale impiegato viene raccolto, con diverse tecniche, dai maschi stabulati in loco.

Nel presente studio sono stati inclusi alcuni tra i donatori di seme presenti nell'allevamento: un Girsacro bianco (falco ibrido comunemente usato in falconeria) di nove anni allevato a mano (Figura 7.1) e un Falco pellegrino di undici anni, entrambi sessualmente maturi e di provata fertilità.

Figura 7.1: Girsacro bianco maschio (*F. rusticolus* x *F. cherrug*) impiegato come donatore di seme nel presente studio.

Al momento del prelievo del seme i riproduttori inclusi nello studio si sono mostrati in buono stato di salute e in buono stato di nutrizione.
Durante la stagione riproduttiva i maschi vengono normalmente tenuti al trespolo o in voliera separati dalle femmine, per evitare accoppiamenti indesiderati o aggressioni da parte delle femmine stesse. Le voliere (3m x 2m x 2,5m) sono site all'esterno e sono costituite da pareti in legno impermeabilizzato, mentre porta e tetto sono in rete a maglie metalliche. Gli animali si trovano sempre liberi all'interno di tali strutture ed hanno a disposizione diversi posatoi.
Sul fondo della voliera viene distribuita della ghiaia drenante, sostituita periodicamente in modo da evitare ristagni di acqua e garantire una facile pulizia.
La disinfezione completa delle voliere viene eseguita tre volte l'anno mediante l'utilizzo di steramina.
Non è permesso il contatto visivo tra gli esemplari, mentre è garantito il contatto sonoro. Tutti gli uccelli sono mantenuti in condizioni di fotoperiodo naturale.

I riproduttori vengono alimentati una volta al giorno con quaglie, pulcini di un giorno o piccioni, congelati a -22°C e decongelati, a cui vengono aggiunti integratori di minerali e vitamine. Viene inoltre fornita acqua fresca *ad libitum*.
I maschi impiegati nello studio vengono utilizzati quasi esclusivamente per l'attività di riproduzione, pertanto sono avvezzi alle procedure impiegate per la raccolta del materiale seminale.

7.2 Raccolta del seme

Come all'inizio di ogni stagione riproduttiva il falconiere ha incrementato la frequenza di interazione con i riproduttori, con lo scopo di valutare la responsività degli stessi. Una volta che i falchi si dimostrano pronti ha inizio il periodo della raccolta del seme.
Durante tale consueta raccolta, che avviene solitamente da due fino a cinque volte a settimana, alcuni campioni non sono stati impiegati nelle inseminazioni artificiali e, pertanto, sono stati inclusi nello studio. Raccolta e valutazione sono state effettuate nel corso di due stagioni riproduttive consecutive, in particolare, durante i mesi di Aprile e Maggio 2018 e 2019 per il Girsacro, e Maggio 2018 e 2019 per il Falco pellegrino.
La raccolta del seme è stata effettuata mediante la tecnica del massaggio addominale.
Prima di procedere con la raccolta gli esemplari sono stati incappucciati, al fine di isolarli dagli stimoli ambientali e ridurre i fattori stressanti. Quindi sono stati spostati

dalla voliera ad un luogo isolato, dove sono stati lasciati il tempo necessario affinché potessero ambientarsi e tranquillizzarsi.

Una volta che il donatore si è mostrato rilassato il falconiere lo ha afferrato saldamente, immobilizzando le ali e gli arti, impedendo al falco di compiere movimenti repentini nel tentativo di fuggire o di difendersi, con il potenziale rischio di ferire sé stesso o il falconiere.

Nel frattempo, su di un tavolo, è stato posizionato un asciugamano, piegato in modo tale che l'altezza dello stesso fosse in grado di coprire il petto dell'animale fino a parte della testa.

L'uccello è stato poggiato in posizione sternale sull'asciugamano preparato *ad hoc*, il quale è stato poi strettamente avvolto al corpo dell'animale al fine di immobilizzare definitivamente le ali. Questo ha permesso di mettere in sicurezza il falco e gli operatori, ed ha garantito le manipolazioni successive, dal momento che l'addome e gli arti posteriori sono rimasti liberi, mentre la testa si è trovata parzialmente protetta dall'asciugamano, limitando la possibilità che l'animale potesse ferire con il forte becco.

Il falco è stato, quindi, sistemato in posizione supina sulle gambe di un secondo operatore seduto. La testa dell'animale è stata rivolta verso il ventre dell'operatore stesso, mentre gli arti e la coda verso l'esterno, per facilitare il falconiere nella stimolazione.

L'operatore seduto ha afferrato saldamente i tibiotarsi del falco, traendoli verso sé e divaricandoli leggermente, per esporre completamente l'addome ventrale, mentre con i polsi ha bloccato ulteriormente il corpo dell'animale in modo che esso non potesse compiere movimenti di rotazione.

A questo punto il falconiere ha iniziato la stimolazione per ottenere l'eiaculazione. La tecnica utilizzata nel caso specifico è stata un massaggio addominale. Il massaggio ha ricalcato la tecnica descritta da Weaver (1991), nella quale viene applicata una stimolazione manuale a livello addominale, dirigendo poi le dita verso la regione pelvica fino all'apertura cloacale. A questo si è aggiunta una particolare stimolazione del pigostilo e della coda, similmente a quanto descritto da Bird *et al*. (1976). L'operatore che esegue il massaggio deve essere sufficientemente sensibile per percepire con il tatto le differenze nella tensione dei tessuti che sta stimolando, poiché solo quando è stato raggiunto l'idoneo grado di rilassamento si ottiene l'eiaculazione.

Nel momento in cui è stata percepita la risposta da parte dell'animale alla stimolazione, è stata applicata una leggera pressione a livello cloacale per favorirne

l'eversione. Con una mano sono state spostate le piume che impedivano la visualizzazione diretta dello sbocco cloacale e la coda è stata flessa verso il dorso dell'animale. Alla comparsa delle prime gocce di eiaculato si è proceduto con la raccolta.

La raccolta del seme è stata effettuata mediante l'utilizzo di capillari di vetro da microematocrito non eparinizzati (VITREX Medical A/S), della lunghezza di 75,0 ± 0,5 mm e dal diametro interno di 1,15 ± 0,05 mm, in grado di contenere un volume totale di 75 µl (Figura 7.2), mantenuti a temperatura ambiente.
Per capillarità l'eiaculato è risalito lungo il capillare di vetro permettendo, quindi, il suo agevole prelievo. La viscosità del seme stesso non ha compromesso la raccolta con capillari del diametro utilizzato nel presente studio. Il prelievo del materiale seminale è stato rapido, ma è stata necessaria cautela dal momento che ci sarebbe potuto essere il rischio di ledere la mucosa cloacale con l'estremità del capillare stesso.

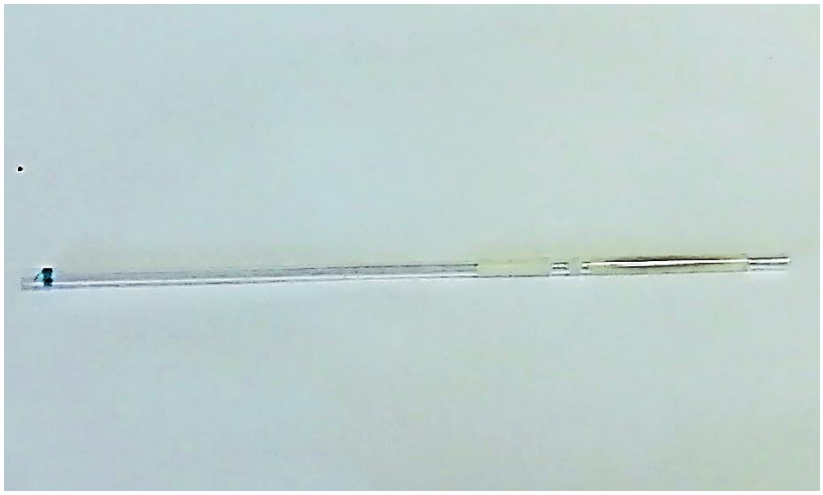


Figura 7.2: Capillare da microematocrito non eparinizzato utilizzato nel presente studio (lunghezza: 75,0 ± 0,5 mm; diametro interno: 1,15 ± 0,05 mm; capacità massima: 75 µl).
È possibile notare il frazionamento della colonna di seme all'interno del capillare.

Il seme è stato emesso una goccia alla volta, in risposta alla pressione applicata in prossimità della cloaca. Si è resa, quindi, necessaria la raccolta delle varie gocce singolarmente, comportando un frazionamento della colonna di seme all'interno del capillare, in cui alle varie gocce di eiaculato si sono interposti spazi occupati da aria (Figura 7.2). Per tale motivo, per garantire la completa raccolta del campione, è stato necessario utilizzare una media di due capillari, che non sono mai stati riempiti completamente per tutta la loro lunghezza.

7.3 Valutazione campione di seme

Immediatamente dopo la raccolta l'eiaculato, di entrambi i donatori, è stato valutato in termini di volume, colore e pH.
Successivamente, in un piccolo laboratorio allestito nell'allevamento, si è proceduto con l'analisi microscopica del seme, in cui sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- concentrazione spermatica (cell/µl) e numero totale di spermatozoi (cell/eiaculato)
- motilità sul seme fresco tal quale e diluito
- vitalità sul seme fresco tal quale e diluito
- percentuale di anomalie spermatiche

La valutazione morfometrica, invece, ha richiesto l'osservazione del campione presso il Laboratorio di Ostetricia, Dipartimento MAPS, dell'Università degli Studi di Padova, pertanto è stata eseguita in un secondo momento.

7.3.1 Volume

Una volta all'interno dei capillari è stato valutato il volume del materiale raccolto.
Servendosi di un righello è stato misurato in millimetri (mm) quanto della lunghezza del capillare è stata occupata dal seme.
Dal momento che il capillare presentava una lunghezza totale di 75,0 mm, con capacità massima di 75 µl, ogni millimetro (mm) di capillare misurato corrispondeva ad un microlitro (µl). Di conseguenza, il valore in millimetri che si è ottenuto misurando la porzione di capillare occupata dallo sperma, è stato corrispondente al volume in microlitri del materiale seminale raccolto. Questo ha permesso di ricavare in modo semplice e rapido il quantitativo di seme del campione, così come descrivono Hoolihan and Burnham (1985).
In alternativa è possibile ricavare tale quantitativo di eiaculato calcolando il volume del cilindro (Anderson *et al*., 2002; Frediani *et al*., 2019) avente come altezza la lunghezza del capillare occupata dal seme e come base il cerchio avente come diametro il diametro interno del capillare, ossia 1,15 ± 0,05 mm. In tal modo si ha un valore più preciso, ma è un metodo meno immediato.

Il campione di seme è stato poi trasferito all'interno di una provetta da 0,2 ml (Eppendorf AG), mantenuta a temperatura ambiente, mediante l'utilizzo di una siringa da inseminazione.

Tale siringa è stata realizzata *ad hoc*, similmente a quanto indicato da Weaver (1991). Nel caso specifico è stata utilizzata una siringa da 5 ml priva di ago. La punta è stata adattata allo scopo applicando un piccolo pezzo di catetere di gomma, che funge da prolunga e che ha permesso di assicurare il capillare alla siringa. A circa metà della lunghezza della siringa è stato praticato un foro in modo che, traendo lo stantuffo, non si avesse l'aspirazione del materiale all'interno della siringa stessa (Figura 7.3).

Il seme posto all'interno della Eppendorf è stato mantenuto a temperatura ambiente.

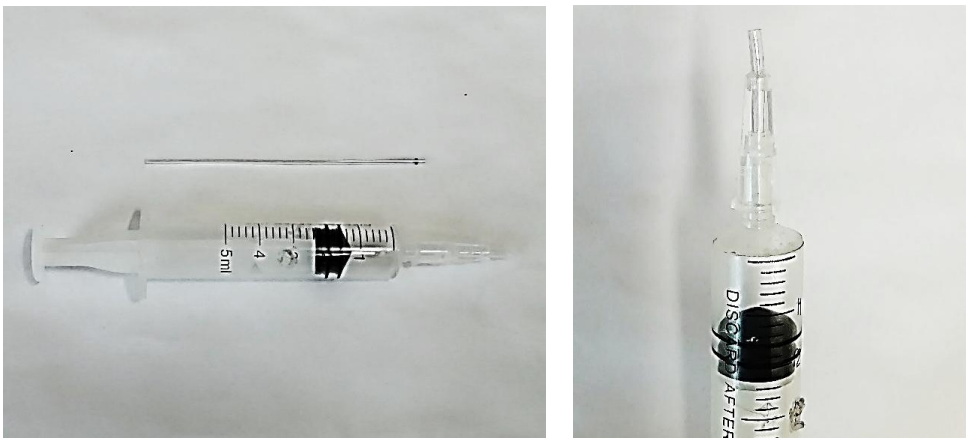


Figura 7.3: Siringa da inseminazione. A destra dettaglio della punta con adattamento per l'inserimento del capillare.

7.3.2 Colore e pH

Una volta trasferito tutto il materiale seminale all'interno della Eppendorf, è stata fatta una prima valutazione macroscopica, con particolare attenzione al colore e alla presenza di eventuale contaminazione.

È stato deciso di non includere nello studio i campioni macroscopicamente contaminati da feci e urati. Fortunatamente soltanto un campione ha subito una sensibile contaminazione, la quale ha interessato soltanto una delle frazioni isolate contenute all'interno di uno solo dei due capillari, corrispondente ad una singola goccia di seme. Per tale motivo è stato sufficiente escludere la goccia contaminata dalla totalità del campione, preservando lo stesso e permettendo la sua inclusione nello studio.

Per apprezzare più chiaramente il colore e le relative gradazioni la Eppendorf è stata poggiata su un foglio di carta bianco (Figura 7.4). Mentre per valutare la torbidità del campione è stato sufficiente tenere la provetta controluce.
Questo ha permesso di stabilire per ciascun campione un valore numerico corrispondente al colore e al grado di torbidità (Tabella 7.1).

Tabella 7.1: Punteggio corrispondente al colore e alla torbidità dell'eiaculato raccolto.

Score	Colore e torbidità del campione
0	Biancastro torbido
1	Biancastro semitrasparente
2	Bianco-giallastro semitrasparente
3	Giallastro torbido

Figura 7.4: Due diversi campioni di seme di Girsacro, caratterizzati da diversa colorazione e torbidità.
A sinistra colorazione biancastra torbida (score = 0), a destra colorazione bianco-giallastra semitrasparente (score = 2).

Contestualmente al trasferimento del seme nella Eppendorf, una piccola goccia di campione tal quale è stata posta su una cartina indicatrice di pH, con scala di graduazione a codice di colori (VELP Scientifica, intervallo pH: 1-11). Nel momento in cui la goccia di seme è stata poggiata sulla cartina si è assistito ad un rapido viraggio di colore, dall'ocra al colore corrispondente al pH del seme (solitamente compreso tra 7 e 8). Prima di comparare il colore ottenuto con la scala graduata, ricavando così il valore di pH, è stato necessario attendere qualche secondo, affinché la cartina si impregnasse completamente di seme e il colore risultasse uniforme.
Questo ha permesso di ottenere in modo rapido e semplice il valore di pH del seme raccolto, utilizzando una minima quantità di materiale.

7.3.3 Concentrazione

Per la valutazione della concentrazione spermatica sono stati prelevati 5 µl di seme fresco tal quale e sono stati posti in una provetta da 1,5 ml (Eppendorf AG). A questi sono stati aggiunti 195 µl di acqua di rubinetto con lo scopo di ottenere una diluizione finale 1:40 (v/v).
L'utilizzo dell'acqua di rubinetto ha facilitato l'osservazione durante la conta poiché ha portato a morte gli spermatozoi, azzerandone la motilità e impedendo quindi il loro spostamento da un punto all'altro della camera di conta.
L'impiego di una diluizione 1:40, invece, ha permesso di disperdere il più possibile l'eventuale materiale non cellulare presente nell'eiaculato, come i *round bodies*, che possono sovrapporsi agli spermatozoi e rendere difficoltosa la conta degli elementi spermatici stessi.
L'inconveniente legato all'utilizzo di tale diluizione è quello di una potenziale sottostima dell'effettiva concentrazione di spermatozoi del campione. Tuttavia, includendo il fattore di diluizione (40) nella formula per il calcolo della concentrazione è stato possibile ricavare una buona stima della concentrazione spermatica stessa.

Lavorando con volumi esigui di materiale, si è deciso di utilizzare la camera di conta Vetriplast® (Vacutest Kima s.r.l. 35020 Arzergrande (PD), Italy, Via dell'Industria, n.2), normalmente utilizzata per la conta degli elementi nelle urine.
Il Vetriplast® è un vetrino in plastica costituito da 10 cellette per vetrino. Questo è estremamente vantaggioso perché permette di valutare più campioni contemporaneamente. Ogni celletta presenta una griglia che definisce lo spazio entro cui si esegue la conta delle cellule presenti nel campione.
Il volume di campione che occupa la griglia è predeterminato e costante in ogni celletta, e questo consente di calcolare il numero di spermatozoi presente per unità di volume (cell/µl). Pertanto la conta degli elementi cellulari si basa sullo stesso principio delle camere di conta in vetro presenti in commercio (Bürker, Neubauer) (http://www.kima.it/files/Plastic%20Counting%20Chambers.pdf, 2019).
Generalmente le camere per liquidi biologici in plastica attualmente sul mercato, presentano sul piano di lettura una griglia di conteggio in rilievo, con altezza pari al 10% dell'altezza totale della camera di conta (http://www.kima.it/files/Plastic%20Counting%20Chambers.pdf, 2019). Questo

comporta che si formino delle turbolenze in prossimità di tali linee e che gli elementi dispersi nel campione vengano deviati da queste, e talvolta esclusi dal conteggio (http://www.enrico-bruno.it/media/upload/prodotti/05211710%20Vetrini%20sedimenti%20urinari%20Vetriplast.pdf, 2019). Il Vetriplast® ha il vantaggio di possedere la marcatura della griglia costituita da linee prive di spessore, e questo garantisce una distribuzione omogenea degli elementi cellulari (http://www.enrico-bruno.it/media/upload/prodotti/05211710%20Vetrini%20sedimenti%20urinari%20Vetriplast.pdf, 2019).

Ogni griglia di conta ha forma quadrangolare, di 3 mm x 3 mm di lato, ed è in grado di contenere 0,9 µl di campione.

Questa è suddivisa in nove quadrati (*squares*) da 1 mm x 1 mm di lato, delimitati da una doppia linea, in grado di contenere 0,1 µl di campione ciascuno (https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpbnxjZWxsYmlvc2NpZW5jZXNhdXxneDoyODE1ODVlZTE0YWEzMmI0, 2019).

Ciascun quadrato da 1 mm di lato è a sua volta suddiviso in 9 quadratini da 0,333 mm x 0,333 mm di lato (*small squares*) delimitati da una linea singola, che possono contenere 0,0111 µl di materiale ciascuno.

Quindi ogni griglia di conta è suddivisa in 81 *small squares* di 0,333 mm di lato (http://www.kima.it/files/Plastic%20Counting%20Chambers.pdf, 2019).

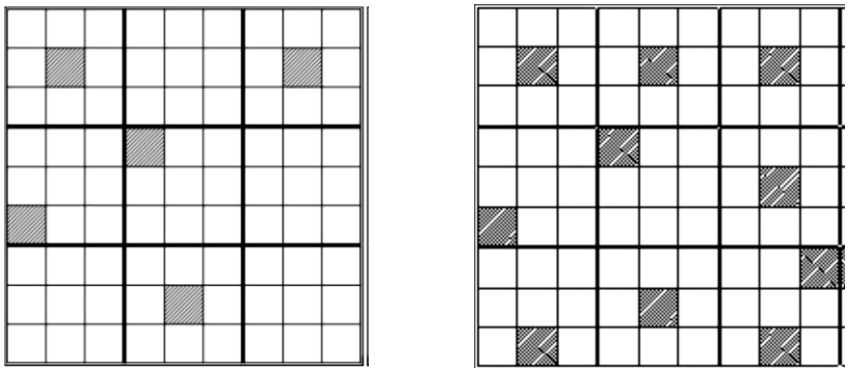
La valutazione della concentrazione degli elementi dispersi viene effettuata osservando il vetrino al microscopio ottico e contando gli elementi cellulari presenti all'interno di un dato numero di *small squares*.

Il Vetriplast®, potenzialmente, è in grado di fornire una stima accurata della concentrazione spermatica, tuttavia è possibile avere una certa percentuale di errore dovuta alla distribuzione random degli spermatozoi all'interno della griglia (https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpbnxjZWxsYmlvc2NpZW5jZXNhdXxneDoyODE1ODVlZTE0YWEzMmI0, 2019). Tale errore si riduce maggiore è il numero totale di elementi cellulari presenti nel campione, ma nel caso in cui tale numero fosse ridotto, si rende necessario contare gli elementi presenti in un numero maggiore di *small squares*.

Perciò, se il campione presenta un elevato numero di elementi cellulari è sufficiente considerare 5 *small squares* differenti e contare le cellule incluse al loro interno.

Se, invece, il campione presenta un basso numero di elementi è consigliato considerare 10 *small squares*.

In entrambi i casi è necessario prestare attenzione a non considerare due volte lo stesso *small squares.* Per evitare un eventuale errore di questo tipo è possibile seguire le indicazioni riportate dalla ditta produttrice, che fornisce un esempio di schema per la scelta degli *small squares* da considerare nella conta degli elementi cellulari presenti al loro interno (Figura 7.5).



Esempio 1 Esempio 2

Figura 7.5: Esempi di schema per la scelta degli *small squares* da includere per la valutazione della concentrazione.
Esempio 1: elevato numero di elementi cellulari. Considerare 5 *small squares*.
Esempio 2: basso numero di elementi cellulari. Considerare 10 *small squares*.
(https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpbnxjZWxsYmlvc2NpZW5jZXNhdXxneDoyODE1ODVlZTE0YWEzMmI0, 2019)

Per effettuare la conta sono stati prelevati 5 µl di campione alla diluizione 1:40.
Questi 5 µl sono stati introdotti all'interno della camera di conta Vetriplast® attraverso il lato aperto della celletta, facendo attenzione che il campione introdotto occupasse completamente la superficie della griglia.
Il Vetriplast® è stato quindi posizionato sul microscopio ottico e la conta è stata effettuata ad ingrandimenti 200X, in modo che ciascuno *small square* venisse incluso completamente nel campo.
Si è deciso di contare gli elementi spermatici maturi presenti all'interno di 5 *small squares,* non includendo nella conta gli spermatozoi che si trovavano sovrapposti alla linea di demarcazione di due *small squares* adiacenti.
Nei casi in cui sono stati contati meno di 10 elementi spermatici, in un numero uguale o superiore a 3 *small squares* su 5, si è deciso di contare gli spermatozoi presenti all'interno di altri 5 quadratini, per un totale di 10 *small squares* considerati. Questo è stato fatto per ridurre la percentuale di errore in campioni la cui numerosità spermatica era bassa, permettendo di avere una stima più accurata della concentrazione.

Chiaramente, in questi casi, il diverso numero di *small squares* considerati è stato tenuto in considerazione nella formula per il calcolo della concentrazione spermatica.

Ad ingrandimento 200X gli elementi spermatici appaiono di piccole dimensioni, pertanto può essere facile confonderli con materiale di altra natura. Gli spermatozoi però sono facilmente riconoscibili poiché, cambiando leggermente la messa a fuoco, appaiono rifrangenti. Mentre gli altri elementi non mantengono tale caratteristica. Inoltre sono stati presi in considerazione solo gli spermatozoi maturi e non gli altri elementi rifrangenti talvolta riscontrati. Questi ultimi elementi sono probabilmente forme ancora immature, caratterizzati da un elemento rifrangente assimilabile per forma alla testa dello spermatozoo, incluso in una struttura rotondeggiante debolmente rifrangente e traslucida. Tali elementi sono stati riscontrati anche durante la valutazione della motilità, sia nel seme tal quale che diluito, in entrambe le specie, ma non nei campioni per la valutazione della vitalità e della morfologia spermatica. Pertanto è probabile che le colorazioni utilizzate non li abbiano messi in evidenza.

Una volta contati gli elementi presenti in ciascuno quadratino, questi sono stati sommati, ottenendo il numero totale di elementi presenti in 5 (o 10) *small squares*.
Per ottenere il numero di elementi presenti in un microlitro la ditta produttrice il Vetriplast® fornisce una formula apposita, la quale però include un fattore di concentrazione (*CF*). Tale fattore viene preso in considerazione nella formula poiché solitamente la camera di conta Vetriplast® viene utilizzata per la valutazione del sedimento urinario, in cui le urine vengono centrifugate al fine di concentrare il sedimento stesso.
Di seguito è stata riportata la formula suggerita dalla ditta produttrice per il calcolo della concentrazione degli elementi dispersi in un microlitro di materiale (http://www.kima.it/files/Plastic%20Counting%20Chambers.pdf, 2019).

$$\frac{n}{k \text{ x } N \text{ x } CF} = T_{\mu l}$$

Dove:

n = numero totale di cellule contate

k = 0,01111

N = numero di *small squares* osservati

CF = fattore di concentrazione

$\boldsymbol{T_{\mu l}}$ = totale di cellule presenti in 1 µl

Nel presente studio la formula è stata modificata escludendo il fattore di concentrazione (*CF*), mentre è stato necessario considerare il fattore di diluizione (*DF*), dal momento che il campione è stato diluito fino ad ottenere una diluizione finale di 1:40.
La formula utilizzata è stata quindi la seguente:

$$\frac{n \text{ x } DF}{k \text{ x } N} = T_{\mu l}$$

Sapendo che in un singolo quadratino di 0,333 mm di lato sono contenuti 0,0111 µl (*k*), in 5 *small squares* (*N*) sono contenuti 0,0555 µl (*k x N*) di campione. È stato chiamato "*n*" il numero totale di spermatozoi contati in 5 (10) *small squares*, e quindi contenuti in 0,0555 µl. Per ottenere in numero di spermatozoi presenti in 1µl ($T_{\mu l}$) è stato necessario moltiplicare *"n"* per il fattore di diluizione (*DF*), che nel caso specifico è stato 40, e dividere il tutto per 0,0555, ossia il volume contenuto nelle 5 *small squares*.

$$\frac{n\ (spz)\ x\ 40}{0{,}0555\ (\mu l)} = T_{\mu l}(spz/\mu l)$$

Nei casi in cui sono stati contati gli elementi in 10 *small squares*, il denominatore è risultato essere 0,111, ossia il volume di seme contenuto in 10 *small squares*.

$$\frac{n\ (spz)\ x\ 40}{0{,}111\ (\mu l)} = T_{\mu L}(spz/\mu l)$$

Per ottenere, invece, il numero di spermatozoi presenti nell'eiaculato (*E*) è bastato moltiplicare $T_{\mu l}$ per il volume totale di eiaculato del campione raccolto ($Vol\ tot$).

$$T\mu l(spz/\mu l) \text{ x } Vol\ tot(\mu l) = E(spz/eiaculato)$$

7.3.4 Motilità

Tra gli obbiettivi del presente studio vi è la valutazione della motilità del campione tal quale e diluito, in entrambe le specie. Per fare ciò, dalla provetta contenente il seme appena raccolto sono stati prelevati 15 µl, poi posti in una Eppendorf da 0,2 ml. A questi sono stati addizionati 15 µl di *extender* contenente

tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris) (Tabella 7.2) (Laboratorio di Ostetricia, Dipartimento MAPS, Università degli Studi di Padova), così da ottenere una diluizione 1:1 (seme:*extender*), che è stata poi miscelata delicatamente e mantenuta a temperatura ambiente.

Per semplificazione l'*extender* verrà chiamato d'ora innanzi "Tris", la cui composizione ricalca quanto indicato da Linde-Forsberg (2001) e Hermansson and Linde-Forsberg (2006) per la costituzione dell'*Uppsala Equex-2 freezing extenders* (UE-2/1). A differenza di quest'ultimo, però, nella costituzione dell'*extender* utilizzato in questo studio, non sono stati inclusi il glicerolo e il tuorlo d'uovo.

Tabella 7.2: Composizione *extender* "Tris" (Laboratorio di Ostetricia, Dipartimento MAPS, Università degli Studi di Padova).

Componente	**Concentrazione (per 100 mL di soluzione)**
Tris	3,025 g
Ac. citrico	1,7 g
Fruttosio	1,25 g
Streptomicina	0,1 g
Acqua distillata	77 mL
Benzil pennicillina	0,06 g (in 0,3 mL di acqua distillata)

La motilità è stata stimata sul seme fresco non diluito (Tq) e sul seme diluito con Tris in tre intervalli di tempo: al tempo zero (T0) (ossia immediatamente dopo la raccolta), dopo venti minuti (T20) e dopo 40 minuti (T40) dalla raccolta.

Per la sua valutazione 5 µl sono stati prelevati dalla provetta contenente il seme tal quale. Questi sono stati posti su di un vetrino porta oggetto, mantenuto a temperatura ambiente. Sulla goccia di seme è poi stato posto un vetrino copri oggetto (18 mm x 18 mm) anch'esso mantenuto a temperatura ambiente, evitando il più possibile la formazione di bolle d'aria. Lo stesso è stato fatto con il campione diluito con il Tris e la procedura è stata ripetuta ad ogni osservazione, quindi a T0, T20 e T40, per entrambi i campioni.

Quindi ogni vetrino è stato osservato al microscopio ottico ad ingrandimento 200X.

Grazie all'impiego di una fotocamera (Nikon D3200) e di un adattatore per microscopio è stato possibile acquisire dei video, realizzati includendo almeno 5 campi per ciascuno dei due campioni a T0, T20 e T40. Questo ha reso possibile contare il numero di spermatozoi totali osservati per ogni campo e di valutare la percentuale di spermatozoi motili sul totale degli spermatozoi presenti, la percentuale di motilità progressiva sul totale, la percentuale di motilità non progressiva sul totale, e

la percentuale di spermatozoi progressivi sul totale degli spermatozoi motili, sia per il campione tal quale che per il campione diluito al variare del tempo.
Lo scopo è stato quello di verificare una eventuale variazione nei parametri sopracitati in presenza dell'*extender* e allo scorrere del tempo.

L'intensità del movimento è stata valutata soggettivamente utilizzando uno score numerico (0-5), dove 0 indica motilità assente, 1 indica motilità non progressiva, 2 sta per motilità progressiva lenta, 3 indica movimenti laterali della testa accompagnati da motilità progressiva, 4 sta per motilità progressiva rapida e 5 per motilità progressiva molto rapida (Sontakke *et al*., 2004).

Tutte le osservazioni sono state eseguite sul campo con campione, vetrini e microscopio a temperatura ambiente, poiché non disponibile alcun dispositivo per il l'incubazione dei campioni a 37°C né microscopio con pianale riscaldato.
È pertanto plausibile che i dati relativi alla percentuale di motilità risultino inferiori rispetto a quanto riportato in bibliografia, in cui solitamente seme e materiale vengono preriscaldati.

Sugli stessi vetrini è stato stimato microscopicamente anche il grado di contaminazione mediante uno score numerico da 0 a 3 (0 = nessuna contaminazione, 1 = lieve contaminazione, 2 = contaminazione moderata, 3 = massiccia contaminazione), specificando poi la tipologia di elementi non spermatici presenti (*round bodies*, feci, urati, eritrociti, cellule, batteri, ciliati, lieviti).

7.3.5 Vitalità

La valutazione della vitalità spermatica è stata eseguita dopo 15 minuti dalla raccolta, sul campione diluito con Tris e sul campione tal quale, sia nell'ibrido che nel Pellegrino.
Per l'allestimento del vetrino sono stati prelevati 5 µl di seme diluito con Tris (1:1) e sono stati posti in una Eppendorf già contenente 6,5 µl di colorante Eosina-Nigrosina. Il colorante, contenente 0,67% di eosina Y (CI 45380), 10% di nigrosina (CI 50420), disciolti in una soluzione acquosa allo 0,9% di NaCl (Björndahl *et al*., 2003), è stato fornito dal Laboratorio di Ostetricia, Dipartimento MAPS dell'Università degli Studi di Padova.

La stessa procedura è stata ripetuta per il seme tal quale.

Le sospensioni ottenute miscelando delicatamente il seme (diluito e tal quale) con il colorante sono state lasciate ad incubare per 30 secondi a temperatura ambiente.

Successivamente sono stati prelevati 5 µl da ciascuna delle due sospensioni colorate e sono stati posti rispettivamente su un vetrino. È stato quindi eseguito uno striscio, che è stato lasciato ad asciugare all'aria per qualche minuto (Figura 7.6).

Figura 7.6: Vetrino allestito per la valutazione della vitalità spermatica. Una goccia di seme colorata con Eosina-Nigrosina è stata posta su vetrino ed è stato eseguito lo striscio.

Una volta completamente asciutti, i due vetrini ottenuti sono stati osservati al microscopio ottico ad ingrandimento 400X (Oberlender *et al*., 2012).

Per ogni vetrino sono stati contati un totale 200 spermatozoi. È stato poi conteggiato il numero di spermatozoi vivi (non colorati) e il numero di quelli in cui il colorante era penetrato all'interno della cellula, tingendo la testa di rosa, indice di perdita di vitalità. Sono, inoltre, stati considerati come non vitali gli spermatozoi "esplosi", ossia quelli presumibilmente lisati a seguito di un danno alla membrana tale da alterare l'equilibrio osmotico della cellula. Questi in particolare sono caratterizzati da flagello, segmento intermedio e acrosoma intatti e da un'ombra violacea che rappresenta la testa, enormemente inturgiditasi prima della lisi (Figura 7.7).

Per la lettura è stato scelto di non utilizzare l'ingrandimento 1000X in olio immersione, poiché la nigrosina ha fornito un sufficiente contrasto per la distinzione degli spermatozoi. Inoltre l'ingrandimento 400X ha comunque garantito la perfetta visualizzazione delle diverse colorazioni delle teste degli spermatozoi in funzione della loro vitalità. L'utilizzo di un ingrandimento inferiore rispetto a quello riportato normalmente in bibliografia ha permesso di attuare una valutazione più rapida del campione, mantenendo la medesima efficacia nell'individuazione delle cellule non vitali.

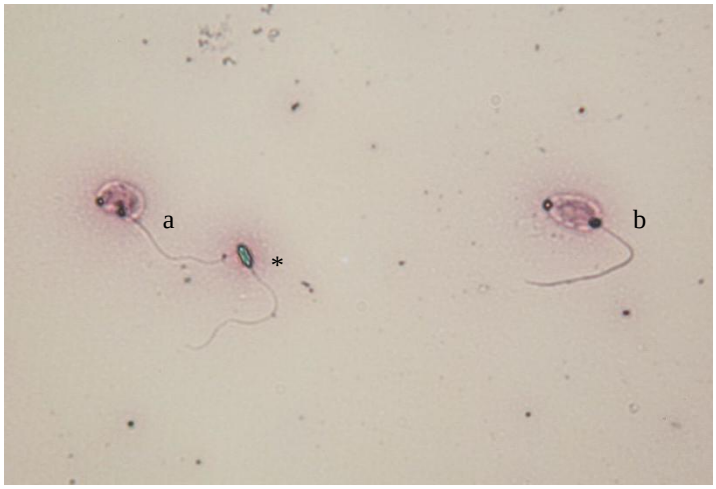


Figura 7.7: Immagine microscopica di spermatozoi di Girsacro, colorazione Eosina-Nigrosina, ingrandimento 400X.
È possibile distinguere uno spermatozoo vitale (*), in cui il colorante non è penetrato all'interno della cellula, e la presenza di due spermatozoi lisati (a, b) e considerati come non vitali nel presente studio.

7.3.6 Morfologia e morfometria

Per ognuno dei campioni appartenenti a ciascuno dei due donatori è stata eseguita anche la valutazione morfologica delle cellule spermatiche. Per fare ciò 45 µl di Tris sono stati posti in una Eppendorf. A questi sono stati addizionati 5 µl di seme fresco tal quale, ottenendo una diluizione 1:10 (seme:*extender*). Dalla sospensione così ottenuta sono stati prelevati 5 µl, poi depositati su di un vetrino mantenuto a temperatura ambiente.
Alla goccia di seme diluito sono stati aggiunti sul vetrino 5 µl di colorazione Rosa Bengala (Tabella 7.3) (Laboratorio di Ostetricia, Dipartimento MAPS dell'Università degli studi di Padova). Le due gocce sono state delicatamente miscelate in modo che il colorante si distribuisse uniformemente, e tutto il seme venisse a contatto con esso. Sul campione colorato è stato poi posizionato un vetrino copri oggetto (18 mm x 18 mm), cercando di evitare il più possibile la formazione di bolle di aria (Figura 7.8).

Per l'allestimento del vetrino è stato deciso di eseguire tale metodica, per ridurre al minimo la possibilità di avere anomalie artefattuali della coda (coda staccata, spezzata o piegata), solitamente legate alla preparazione del vetrino mediante striscio, come è stato riscontrato da Oberlender *et al*. (2012).
Il vetrino è stato lasciato riposare per qualche minuto e successivamente sigillato.

Tabella 7.3: Composizione della colorazione con Rosa Bengala

Componente	Concentrazione (per 100 mL)
Rosa Bengala	3 g
Formalina 30-40%	1 mL

Tutti i componenti sono stati addizionati a 100 ml di acqua distillata, fino a raggiungimento di una soluzione dal colore omogeneo, con pH = 6,9.

Figura 7.8: Allestimento del vetrino per la valutazione delle anomalie morfologiche e per l'indagine morfometrica; colorazione Rosa Bengala.

Il campione colorato è stato osservato *in loco* a microscopio ottico (400X). Sono state contate un totale di 100 cellule spermatiche. Di queste sono state conteggiate quelle presentanti anomalie morfologiche, ricavando successivamente, per ciascuna di esse, il valore in percentuale.

Le anomalie morfologiche rilevate nel presente studio comprendono:

Anomalie della testa:

- Testa amorfa
- Testa staccata
- Testa piegata
- Testa "*Banana shaped*" (particolare forma riscontrata diverse volte durante l'analisi dei campioni)
- Macrocefalia

Anomalie della coda:

- Code multiple

- Coda piegata
- Coda arrotolata
- Coda spezzata
- Coda staccata

Il vetrino allestito per la valutazione delle anomalie spermatiche è stato successivamente trasportato presso il Laboratorio di Ostetricia, Dipartimento MAPS, dell'Università degli Studi di Padova per l'indagine morfometrica, la quale è stata svolta il giorno successivo le valutazioni sul campo dei campioni di seme.

Nel laboratorio dell'università è stato osservato nuovamente il preparato al microscopio ottico, ad ingrandimento 400X, ed è stato possibile ottenere le immagini dei singoli spermatozoi al medesimo ingrandimento. Sono state acquisite le immagini di 50 spermatozoi per ogni vetrino, scegliendo le cellule in modo casuale, facendo però attenzione che non presentassero sovrapposizione con detriti o con altri spermatozoi, in modo che fossero chiaramente apprezzabili in tutte le loro parti.
L'acquisizione delle immagini è stata realizzata grazie all'utilizzo di uno Smartphone (Honor 9 lite), con fotocamera da 13 MP, e di un adattatore per microscopio.
Le fotografie degli spermatozoi sono state eseguire impostando la fotocamera dello Smartphone in modalità "Pro foto" (ISO: 50, S: 1/13, EV: 0,7) e ponendo al massimo lo zoom.

Mediante l'utilizzo di un programma informatico di elaborazione digitale delle immagini (ImageJ), da tali fotografie è stato possibile misurare diversi parametri morfometrici, tra cui la lunghezza della testa dello spermatozoo incluso l'acrosoma, la lunghezza della testa escluso l'acrosoma, la larghezza della testa, il perimetro della stessa incluso l'acrosoma, il perimetro della testa escludendo l'acrosoma, la lunghezza della coda (escludendo il segmento intermedio). Mentre l'area della testa dello spermatozoo (incluso ed escluso l'acrosoma) è stata ricavata successivamente, utilizzando la formula per il calcolo dell'area di una figura ovale ($a \times b \times \pi$), in cui "a" corrisponde a metà della lunghezza della testa e "b" a metà della larghezza della stessa.

ImageJ è un software *open source* di elaborazione digitale delle immagini, sviluppato dalla *National Institutes of Health* (NIH) (Ferreira and Rasband, 2012; Collins, 2007).

Per ottenere la misurazione dei parametri sopraelencati è stato necessario scaricare il programma da http://imagej.nih.gov/ij/download.html (Ferreira and Rasband, 2012) ed avviare il software, avendo così accesso alla finestra con la barra dei menu e la barra degli strumenti.

Prima di poter procedere con le misurazioni è stato necessario impostare l'unità di misura desiderata (µm).
Per fare ciò, con le medesime impostazioni utilizzate per l'acquisizione delle immagini degli spermatozoi e mantenendo l'ingrandimento 400X, è stata realizzata la fotografia della scala graduata di un vetrino micrometrico. Questo ha permesso di ottenere un riferimento dimensionale, fondamentale per calibrare il software.
Selezionando sulla barra del menu "*File" >> "Open"* è stato possibile aprire sul software l'immagine del vetrino micrometrico. Quindi, con lo strumento "linea retta" si è potuto ottenere il valore in pixel corrispondente ai 50,0 µm della scala micrometrica del vetrino.

Per settare l'unità di misura è stato sufficiente selezionare "*Analise" >> "Set Scale"* ed impostare le diverse voci come di seguito:

"Distance pixel" = 1013,5442 (valore in pixel ottenuto nel presente studio e corrispondente alla lunghezza di 50,0 µm)

"Known distance" = 50,0 (distanza misurata sulla scala micrometrica dell'immagine)

"Unit on lenght" = µm (unità di misura con la quale si desidera siano espressi i valori relativi ai parametri morfometrici degli spermatozoi).

Affinché l'unità di misura in µm rimanesse impostata su tutte le successive immagini analizzate, è stato selezionato *"Global" >> "OK".*
Fatto ciò, è stato possibile procedere con l'analisi di tutte le immagini di spermatozoi acquisite per i campioni di Girsacro e Pellegrino
La lunghezza della testa dello spermatozoo (incluso l'acrosoma) è stata misurata utilizzando lo strumento "linea retta" (*Straight line selection tool*). Tale linea è stata tracciata con andamento longitudinale, considerando la distanza tra il punto medio all'apice della testa (dove si trova l'acrosoma), fino al punto medio alla sua base

(Maggavi *et al*., 2016; Kondracki *et al*., 2005) escludendo il segmento intermedio (Figura 7.9). Per l'acquisizione dello stesso parametro, ma con esclusione dell'acrosoma, è stata utilizzata la stessa metodica, partendo però dal punto medio alla base dell'acrosoma, nel punto di unione di quest'ultimo con la testa.

Per ottenere la misura della larghezza della testa e stata tracciata una linea retta trasversale, nel punto di massima ampiezza (Maggavi *et al*., 2016), solitamente circa a metà della lunghezza della testa dello spermatozoo e perpendicolare alla prima linea tracciata (Figura 7.9).

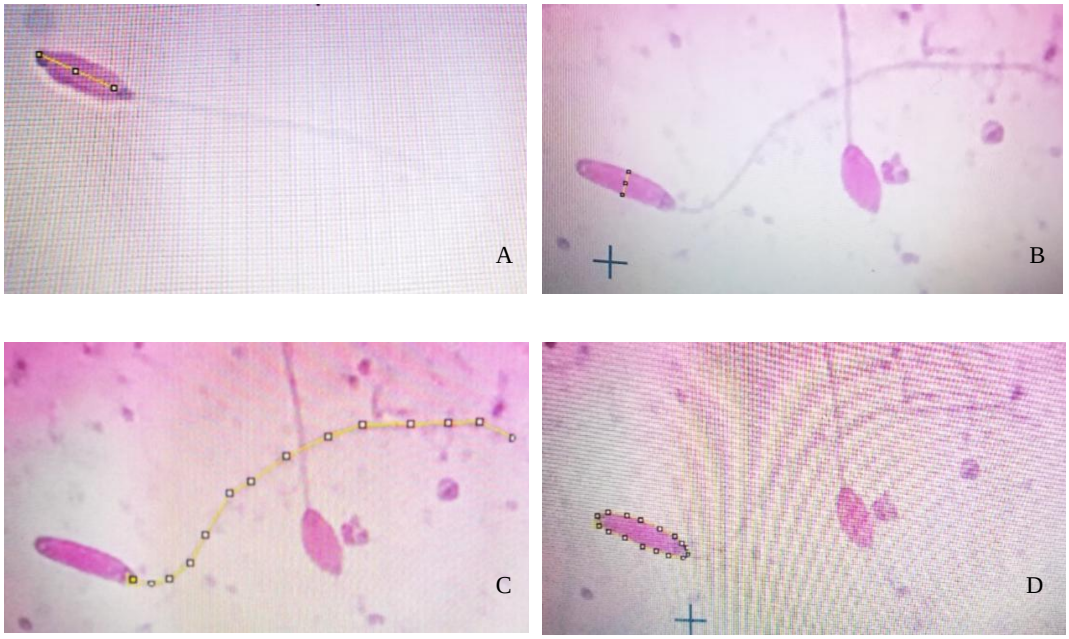


Figura 7.9: Misurazione dei diversi parametri morfometrici mediante l'impiego di ImageJ. Colorazione Rosa Bengala (400X).
A: lunghezza della testa dello spermatozoo (incluso l'acrosoma); *B*: larghezza della testa; *C*: lunghezza della coda; *D*: perimetro della testa (incluso l'acrosoma).

Per la lunghezza della coda è stato utilizzato lo strumento "linea spezzata" (*Segmented line selection tool*), con il quale, mediante click successivi del mouse, si è cercato di eseguire quanti più segmenti possibile. Questo per meglio adattarsi alla sinuosità della coda stessa e per garantire una maggiore accuratezza della misura. È stato possibile misurare tale parametro partendo dal punto di incontro tra segmento intermedio e segmento principale del flagello, fino ad arrivare all'apice della coda (Figura 7.9).

Mentre per ottenere il perimetro è stata utilizzata la funzione "poligono" (*Polygon selection tool*). Anche in questo caso, realizzando più lati possibile, si è cercato di seguire l'andamento curvilineo della testa dello spermatozoo, prima includendo poi escludendo l'acrosoma, ottenendo così due diversi parametri (Figura 7.9).

Ogni misura è stata poi salvata (Ctrl+M) su di un file Excel.

7.3.7 Analisi dei dati

Tutti i valori raccolti sono stati ordinati in fogli di lavoro Microsoft Office Excel**.**

Per effettuare il confronto dei dati normalmente distribuiti (volume, pH, concentrazione spermatica, numero di spermatozoi per eiaculato e parametri morfometrici tranne l'area) si è deciso di utilizzare il test statistico t-Student (livello di significatività: 95%), e i dati ricavati sono stati espressi in termini di media ± DS.
Mentre, per i dati non normalmente distribuiti (colore, percentuale di spermatozoi vitali, percentuale di anomalie morfologiche, area della testa dello spermatozoo) sono state realizzate statistiche descrittive, e per il confronto di tali dati è stato utilizzato un test statistico non parametrico (Test di Mann-Whitney), quindi i risultati ottenuti sono stati riportati in termini di mediana (minimo-massimo).
Per la valutazione delle differenze, in termini di motilità totale e progressiva, considerando le due diverse specie, i diversi intervalli di tempo e l'effetto della diluizione, è stata eseguita un'analisi della varianza (ANOVA).

Tutte le statistiche sono state realizzate grazie all'utilizzo di Microsoft Office Excel o del software di analisi statistica SAS® (SAS Institute Inc.).

8. RISULTATI

8.1 Raccolta del seme

Durante i mesi di Aprile e Maggio 2018 e 2019 sono state effettuate, appositamente per il seguente studio, 17 procedure di raccolta del seme dal Girsacro bianco e 7 dal Pellegrino.
In tre occasioni (2 per il Girsacro e 1 per il Pellegrino), a seguito del massaggio addominale, non è stato ottenuto eiaculato.
Pertanto, è stato possibile ottenere un totale di 6 campioni dal maschio di Falco pellegrino e 15 dall'ibrido. Di questi ultimi un campione si è rivelato completamente privo di spermatozoi, ed è pertanto stato escluso dallo studio. Di conseguenza risultano essere 14 gli eiaculati di Girsacro effettivamente considerati.

8.2 Volume

Su tutti gli eiaculati ottenuti dall'ibrido (n = 14) e dal Pellegrino (n = 6) è stato calcolato il volume di seme raccolto.
Sono stati riscontrati valori pari a 83,93 ± 49,36 µl e 119,50 ± 18,43 µl, rispettivamente nel Girsacro e nel Pellegrino.
Si è cercato di verificare un'eventuale effetto specie, dal momento che il Pellegrino sembra aver prodotto in media un maggiore quantitativo di seme. In realtà non è stata riscontrata nessuna differenza significativa (p = 0,108) nel volume di eiaculato tra l'ibrido e il Pellegrino.

8.3 Colore, contaminazione e pH

Per ciascun campione è stato valutato soggettivamente il colore, assegnando uno score da 0 a 3, corrispondente alla tonalità e torbidità del campione. È stata inoltre valutata macroscopicamente la presenza di eventuale contaminazione.

Gli eiaculati hanno evidenziato una consistenza tendente al sieroso, talvolta lievemente viscoso. Un campione eccessivamente acquoso può essere indicativo di un quantitativo maggiore di linfa, dovuto ad una eccessiva forza applicata durante la raccolta del campione (Gee, 1983), e ad una minore concentrazione spermatica. Tuttavia nel

presente studio non è stata presa in considerazione la correlazione tra viscosità, volume e concentrazione spermatica, pertanto non è stato possibile verificare la veridicità di tale riscontro.
I campioni hanno presentato un colore dal biancastro semitrasparente al torbido, fino al bianco-giallastro, con gran parte dei campioni caratterizzati da tonalità bianco-giallastre per lo più semitrasparenti. In particolare, nel Girsacro un solo campione sui 14 totali ha ottenuto lo score 0 (biancastro torbido), così come nel Pellegrino. Lo score 1 (biancastro semitrasparente) è stato assegnato a 5 campioni di Girsacro su 14, e ad un solo campione di Pellegrino. Mentre a 8 e 4 eiaculati, rispettivamente di Girsacro e di Pellegrino, è stato assegnato il punteggio di 2 (bianco-giallastro semitrasparente) (Tabella 8.1).
A nessun eiaculato considerato è stato assegnato lo score 3. Infatti, soltanto il campione azoospermico ha presentato alla raccolta un colore giallastro torbido, ma non è stato preso in considerazione nello studio.

Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa ($p = 0,940$) tra i due riproduttori in termini di colore e torbidità dell'eiaculato.

Tabella 8.1: Numero di campioni assegnato a ciascuno score colore.

Specie	Totale campioni	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Girsacro	14	1	5	8	0
Pellegrino	6	1	1	4	0

Ad ogni colore rilevato è stato assegnato un punteggio numerico. 0 = biancastro torbido; 1 = biancastro semitrasparente; 2 = bianco-giallastro semitrasparente; 3 = giallastro torbido.

Nessun campione si è presentato macroscopicamente contaminato da parte di feci ed urati. Questi ultimi, se in ingente quantità, conferiscono una colorazione biancastra intensa, pertanto risultano facilmente riconoscibili.
Soltanto un campione di Girsacro ha presentato una lieve contaminazione al termine del prelievo, che però ha interessato una sola goccia di seme, che all'interno del capillare è rimasta separata dal restante materiale seminale. Tale goccia singola è stata eliminata preservando il restante eiaculato dalla contaminazione e permettendo l'inclusione del campione nello studio.

È stato inoltre stimato il livello e la natura della contaminazione del campione al microscopio ottico.

A ciascun campione non diluito è stato attribuito uno score numerico (0-3), corrispondente ad un livello di contaminazione crescente.
Nel Girsacro è stato riscontrato un punteggio medio di 2 (moderata contaminazione), mentre nel Pellegrino il livello di contaminazione rilevato è stato leggermente inferiore (1,5).
I principali elementi non spermatici causa di tale contaminazione sono rappresentati dai *round bodies*, la cui presenza nell'eiaculato dei rapaci è comune. Essi, benché talvolta estremamente numerosi, non sembrano inficiare la funzione spermatica, pertanto non hanno significato clinico.
In un campione di Girsacro e in uno di Pellegrino sono state riscontrate tracce di feci ed urati, tuttavia la loro quantità è risultata essere così ridotta da non alterare il valore di pH dell'eiaculato.
In quattro campioni dell'ibrido e in un solo campione di Pellegrino sono state osservate tracce di eritrociti, la cui presenza è legata alla modalità di raccolta. Infatti, i due esemplari dello studio vengono normalmente utilizzati come riproduttori in allevamento e sono sottoposti anche a numerosi interventi di raccolta durante la giornata, questo può aver provocato un piccolo danno alla mucosa cloacale. In due occasioni, nel seme di Girsacro, è stata segnalata poi la presenza di cellule. Plausibilmente si è trattato di macrofagi, dal momento che sono stati osservati proprio negli ultimi due campioni raccolti nel Maggio 2018, al termine della stagione riproduttiva.

Il colore dell'eiaculato non sembra essere correlato con la concentrazione spermatica o con il grado di contaminazione e la presenza di tracce di eritrociti.

La valutazione del pH seminale ha permesso di individuare una differenza significativa ($p < 0,001$) tra le due specie.
Infatti, è stata rilevata una media pari a $7,44 \pm 0,20$ e $7,88 \pm 0,10$ rispettivamente nel Girsacro e nel Pellegrino. Proprio nel Pellegrino il pH è significativamente maggiore, tuttavia, sarebbe opportuno eseguire tale valutazione su di un numero maggiore di campioni, possibilmente di più esemplari della stessa specie, per verificare se tale differenza viene mantenuta.

8.4 Concentrazione

La concentrazione spermatica è stata stimata su tutti gli eiaculati, ad eccezione di un campione di Girsacro a causa dell'esiguo volume di quest'utimo.
Inoltre, in 2 campioni di Girsacro e 5 campioni di Pellegrino è stato necessario contare gli elementi spermatici presenti in 10 *small squares*, vista la ridotta quantità di spermatozoi. In particolare, questi campioni, corrispondono a quelli raccolti verso la fine della stagione riproduttiva, il che potrebbe spiegare la minore numerosità spermatica riscontrata. Tuttavia, l'effetto della stagione sulla concentrazione non è stato oggetto di analisi nel presente studio.

Nel Girsacro è stato rilevato un valore medio di 109,20 ± 74,35 x 10^3 spermatozoi/µl, mentre nel Pellegrino si è registrata una concentrazione pari a 16,94 ± 10,97 x 10^3 spermatozoi/µl.
È stato, poi, possibile ricavare in numero di spermatozoi presenti in ciascun eiaculato, il cui valore si è attestato sui 7,85 ± 4,93 x 10^6 spermatozoi/eiaculato in media nel Girsacro e 1,95 ± 1,30 x 10^6 spermatozoi/eiaculato nel Pellegrino.

Nell'ibrido sono stati riscontrati valori significativamente più elevati sia per quanto concerne la concentrazione spermatica ($p < 0,001$) che per il numero di spermatozoi/eiaculato ($p = 0,001$). Infatti, nel Pellegrino, la concentrazione si è mostrata sensibilmente inferiore, e ciò è stato confermato anche dalla maggiore percentuale di campioni (83,3%) in cui è stato necessario considerare 10 *small squares*, rispetto al Girsacro (15,4%).
Sia nell'ibrido che nel Pellegrino è stata confermata la presenza di una concentrazione inferiore in tutti quei campioni in cui sono stati valutati 10 *small squares*.

8.5 Motilità

La valutazione della motilità è stata eseguita grazie all'acquisizione di filmati e alla loro osservazione, che ha permesso di contare gli spermatozoi motili e di calcolare la motilità totale (%), la percentuale di spermatozoi progressivi sul totale delle cellule spermatiche osservate, la percentuale di spermatozoi non progressivi e la percentuale di progressivi sul totale dei motili, sul seme tal quale e diluito, sia nel Girsacro che nel Pellegrino. Lo scopo è stato quello di individuare un'eventuale differenza dei

parametri sopracitati tra le due specie. Si è cercato, inoltre, di verificare se l'*extender* Tris avesse avuto un qualche effetto sulla motilità spermatica.

Inoltre, per entrambi i donatori, è stata valutata la motilità spermatica allo scorrere del tempo, osservando il campione al tempo zero (T0), ossia poco dopo la raccolta, dopo 20 minuti (T20) e dopo 40 minuti dalla raccolta (T40), sia sul seme tal quale che diluito con Tris (1:1).

L'intento è stato quello di verificare se allo scorrere del tempo si assiste o meno ad una variazione dei parametri sopracitati nel seme stoccato a temperatura ambiente.

I valori medi di ciascun parametro sono stati riportati nella tabella (Tabella 8.2).

In particolare la motilità totale (%) del seme fresco non diluito, riscontrata a pochi minuti dalla raccolta, è stata del 32,06% nel Girsacro (n = 13) e del 67,52% nel Pellegrino (n = 6). Mentre, per il seme diluito con Tris, la motilità totale registrata appena dopo la raccolta è stata del 43,13% nell'ibrido e 60,00% nel Pellegrino.

Tabella 8.2: Valori di motilità totale (%), motilità progressiva (%), motilità non progressiva (%), progressivi/motili (%) espressi come valore medio per ogni intervallo di tempo, nei campioni di seme tal quali e diluiti con Tris (1:1) di Girsacro e Pellegrino.

Parametri	**Girsacro**			**Pellegrino**		
Tq	***T0***	***T20***	***T40***	***T0***	***T20***	***T40***
Motilità totale (%)	32,06	36,28	42,04	67,52	72,39	67,90
Motilità progressiva(%)	18,52	20,86	24,76	51,13	53,47	42,16
Motilità non progressiva (%)	13,54	15,42	19,19	16,39	18,09	25,74
Progressivi/motili (%)	42,91	43,42	45,39	74,23	72,85	61,12
Tris	***T0***	***T20***	***T40***	***T0***	***T20***	***T40***
Motilità totale (%)	43,13	42,86	44,85	60,00	65,41	69,82
Motilità progressiva(%)	29,11	24,77	32,50	56,79	46,81	51,28
Motilità non progressiva (%)	14,40	19,99	14,68	12,66	18,07	18,54
Progressivi/motili (%)	50,16	46,15	57,44	82,20	68,67	72,36

Nel Girsacro è stato notato che la motilità progressiva tende ad aumentare gradualmente allo scorrere del tempo se si considera il seme tal quale. Mentre nel seme diluito con Tris la motilità progressiva cala a T20, per poi aumentare nuovamente a T40 (Figura 8.1). Un andamento analogo è stato riscontrato anche per la motilità totale.

Nel Pellegrino, invece, la motilità progressiva sul tal quale è aumentata a T20, mentre a T40 ha subito un sensibile calo. Al contrario, nel seme diluito, similmente a quanto

riscontrato nel Girsacro, la motilità è diminuita a T20 per crescere di nuovo a T40, rimanendo però inferiore rispetto al valore riscontrato a T0 (Figura 8.2).

Mediante analisi della varianza (ANOVA) si sono confrontati i dati relativi alla motilità progressiva (%) e totale (%) allo scorrere del tempo, nel seme tal quale e diluito, con lo scopo di verificare se l'andamento riscontrato fosse significativo.
Nonostante l'andamento rilevato, la differenza nella motilità progressiva e totale registrata allo scorrere del tempo non è significativa, sia sul tal quale che sul seme diluito, entro specie.

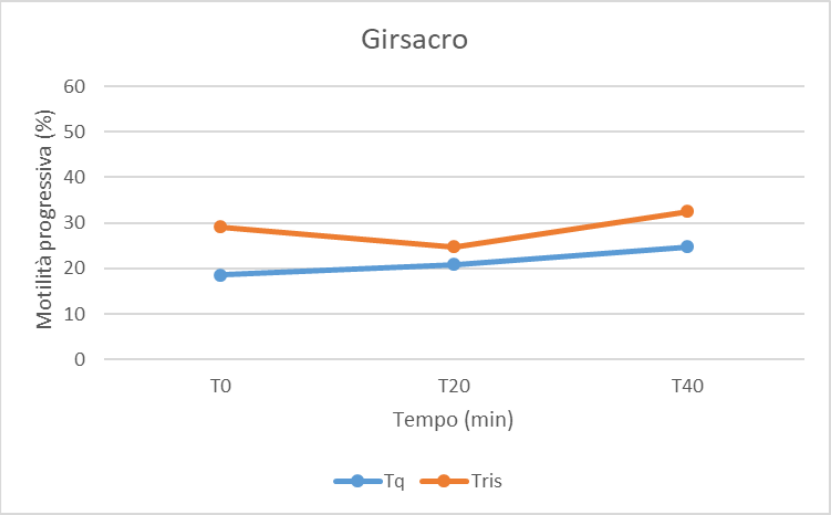


Figura 8.1: Andamento della motilità progressiva (%) allo scorrere del tempo. Confronto tra seme di Girsacro tal quale e diluito con Tris (1:1).

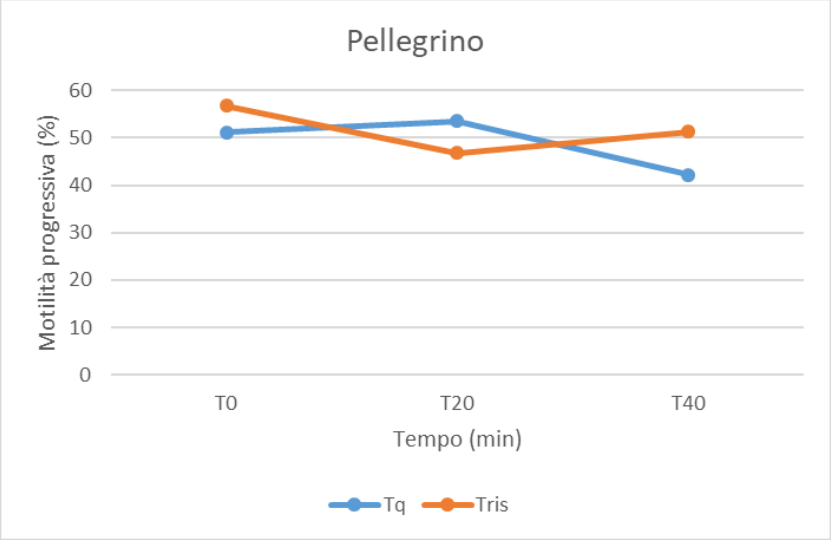


Figura 8.2: Andamento della motilità progressiva (%) allo scorrere del tempo. Confronto tra seme di Pellegrino tal quale e diluito con Tris (1:1).

Inoltre, la diluizione con l'*extender* Tris non ha comportato alcuna differenza significativa, sempre in termini di motilità progressiva e totale, rispetto al campione tal quale. Di conseguenza la motilità degli spermatozoi nel campione diluito si è mantenuta simile a quella del seme tal quale. Questo suggerisce che il Tris potrebbe prestarsi come diluitore per lo stoccaggio del seme a temperatura ambiente, dal momento che non provoca alterazioni della motilità rispetto al seme non diluito e mantiene la capacità motile degli spermatozoi nel tempo.

Mentre l'effetto del tempo e l'effetto della diluizione sul seme non sono significativi entro specie, la differenza nella motilità è altamente significativa ($p < 0,001$) se si confrontano i due donatori. Vi è, quindi, un importante effetto legato alla specie. Infatti nel Pellegrino si sono riscontrati valori di motilità progressiva e totale significativamente maggiori rispetto al Girsacro, sia che si considerino i tre intervalli di tempo, sia che si considerino i dati relativi al tal quale e al Tris.

È stata fatta anche una stima dell'intensità della motilità progressiva attribuendo per ogni campione (tal quale e diluito), di entrambe le specie, uno score numerico da 0 a 5, in cui ciascun numero corrisponde ad un valore di velocità progressiva crescente. Il punteggio numerico è stato assegnato per ogni intervallo di tempo.
È stato attribuito un punteggio minimo di 1 fino ad un massimo di 4. Per il seme tal quale di Girsacro è stato riscontrato uno score medio di 2,92 per ciascuno dei tre intervalli di tempo, mentre nel Pellegrino è stato rilevato uno score 3,15 a T0 e 3 in T20, T40. Mentre per il seme diluito con Tris è stato calcolato lo score medio tra i tre intervalli di tempo, pari a 3,02 nel Girsacro e 3,08 nel Pellegrino.
Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa in termini di velocità progressiva tra le due specie, tra il seme tal quale e diluito e allo scorrere del tempo.

8.6 Vitalità

È stata valutata la percentuale di cellule vitali riscontrata nel seme tal quale e diluito con Tris di entrambi i donatori.
La sua valutazione è stata resa possibile grazie all'utilizzo della colorazione Eosina-Nigrosina.

La percentuale di vitalità media riscontrata nel seme non diluito (Tq) è stata del 91,33 ± 4,88% (media ± DS) nel Girsacro e 82,50 ± 15,22% nel Pellegrino. Mentre nel seme diluito la percentuale di vitalità registrata è stata di 88,81 ± 5,74% nell'ibrido e 78,42 ± 12,32% nel Pellegrino.

È stata inoltre calcolata la percentuale di vitalità totale nel seme tal quale (84,36 ± 10,23%) e diluito (88,39 ± 9,61%), indipendentemente dalla specie.
Si è cercato di individuare un eventuale differenza tra il tal quale e il seme diluito con Tris in termini di percentuale di vitalità. Dal momento che i dati non hanno presentato una distribuzione normale, si è proceduto con un test non parametrico (Test di Mann-Whitney). A tale scopo sono stati messi a confronto i dati espressi in termini di mediana (min-max) del seme tal quale e diluito, dei quali sono stati ricavati valori rispettivamente di 93,00% (66,00 - 96,00%) e 89,50% (67,00 - 95,00%).
Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra i due metodi, pertanto l'*extender* Tris non sembra alterare la percentuale di cellule vitali rispetto al campione non diluito. Questo dato suggerisce che il Tris potrebbe potenzialmente rappresentare un ottimo *extender* per il seme di falco, utilizzabile sia nella conservazione nel breve periodo che a lungo termine.

Si è, quindi, cercato di individuare una possibile differenza legata alla specie, al fine di comprendere se il Tris abbia o meno un effetto diverso sul seme dei due esemplari. Sempre applicando il test di Mann-Whitney sono state messi a confronto i vari dati espressi come mediana (min-max) (Tabella 8.3).

Tabella 8.3: Percentuale di cellule vitali nel seme tal quale e diluito con Tris di Girsacro e Falco pellegrino. I valori sono stati espressi in termini di mediana (min-max).

Vitalità	Girsacro	Pellegrino
Tq	93,25% (83,00 - 95,50)	85,50% (66,00 - 96,00)
Tris	90,75% (75,50 - 93,00)	74,00% (67,00 - 95,00)

La vitalità percentuale del seme tal quale non differisce in modo significativo tra le due specie, lo stesso è stato rilevato per il seme diluito con Tris. Per tale motivo, il Tris, non solo non compromette la vitalità del seme diluito rispetto al tal quale, ma non mostra differenze significative, in termini di percentuale di cellule vitali, tra le due specie. Quest'ultimo dato conferma la sua potenziale efficacia su specie diverse, e ciò risulterebbe enormemente vantaggioso in ambito di allevamento.

Tuttavia, sarebbe opportuno ripetere tale valutazione su di un numero maggiore di campioni, includendo anche più specie, al fine di verificare se il Tris può rappresentare effettivamente un efficace *extender* per il seme di falco.

8.7 Anomalie morfologiche

L'analisi morfologica, con individuazione della percentuale di anomalie spermatiche, è stata eseguita sui campioni diluiti con Tris (1:10) di Girsacro (n = 14) e di Pellegrino (n = 4). Lo scopo di tale valutazione è stato quello di determinare la tipologia e la numerosità di tali alterazioni entro specie, ma anche di confrontare i due riproduttori sempre in termini di morfologia spermatica.

In entrambi i donatori gli spermatozoi hanno presentato la tipica morfologia di tipo sauropside, quindi con testa cilindrica e acrosoma bottoniforme.

La percentuale di spermatozoi morfologicamente normali è risultata pari al 66,71 ± 11,26% nell'ibrido e al 65,75 ± 7,81% nel Pellegrino.
Il valore percentuale di ciascuna anomalia spermatica è riportato, in termini di media ± DS (Tabella 8.4) e mediana (min-max) (Tabella 8.5).
Di seguito sono, inoltre, riportati alcuni esempi di anomalie spermatiche riscontrate durante il presente studio (Figura 8.3).
Solitamente, nel conteggio delle anomalie spermatiche, vengono considerate solo le teste staccate. Tuttavia, è stato deciso di considerare anche la percentuale di code prive di testa associata alla presenza di teste staccate, in modo da poterle distinguere da un altro tipo di anomalia, ossia l'acefalia, la quale si manifesta come segmento intermedio e flagello intatti e assenza di testa, non associato alla presenza di teste staccate, così come descritto da Du Plessis and Soley (2011).

Confrontando i risultati ottenuti, non è stata rilevata alcuna differenza significativa, tra il Girsacro e il Pellegrino, sia nella percentuale di spermatozoi normali che nella percentuale di anomalie spermatiche, ad eccezione che per la percentuale di teste amorfe ($p = 0,001$) e teste piegate ($p = 0,015$) (Tabella 8.5). Infatti, il Pellegrino ha presentato una percentuale maggiore di entrambe le anomalie. Inoltre, in quest'ultimo, durante l'osservazione al microscopio, è stata rilevata la presenza di spermatozoi dalla testa ramificata, i quali sono stati classificati come teste amorfe. Questa caratteristica

ramificazione è stata osservata soltanto nei campioni di Pellegrino, mentre nel Girsacro gli spermatozoi amorfi erano per lo più contraddistinti da teste di grandi dimensioni, piriformi o dalla morfologia non ben definibile (Figura 8.3).

Tabella 8.4: Percentuale di anomalie spermatiche nel seme diluito (1:10) di Girsacro e di Pellegrino. Valori espressi in termini di media ± DS.

Parametro	Girsacro	Pellegrino
N° campioni osservati	14	4
Spermatozoi normali (%)	66,71 ± 11,26	65,75 ± 7,81
Testa amorfa (%)	6,29 ± 2,30	11,50 ± 2,38
Testa staccata (%)	11,93 ± 9,51	8,75 ± 5,97
Testa piegata (%)	0,07 ± 0,27	1,50 ± 1,29
Testa "banana shaped" (%)	1,07 ± 1,59	0,75 ± 0,96
Macrocefalia (%)	2,36 ± 2,44	1,50 ± 1,29
Code multiple (%)	5,43 ± 3,28	3,75 ± 2,87
Coda piegata (%)	0,21 ± 0,58	0,00 ± 0,00
Coda arrotolata (%)	0,14 ± 0,36	0,75 ± 0,96
Coda spezzata (%)	3,64 ± 2,68	3,00 ± 3,83
Coda staccata (%)	2,14 ± 2,18	2,75 ± 2,36

Tabella 8.5: Percentuale di anomalie spermatiche nel seme diluito (1:10) di Girsacro e di Pellegrino. Valori espressi in termini di mediana (min-max).

Parametro	Girsacro	Pellegrino	p*
N° campioni osservati	14	4	
Spermatozoi normali (%)	69 (41-79)	65,5 (59-73)	0,568
Testa amorfa (%)	6,5 (2-10)	10,5 (10-15)	**0,001**
Testa staccata (%)	9,5 (0-34)	11 (0-13)	0,740
Testa piegata (%)	0 (0-1)	1,5 (0-3)	**0,015**
Testa "banana shaped" (%)	1 (0-6)	0,5 (0-2)	0,765
Macrocefalia (%)	1,5 (0-8)	1,5 (0-3)	0,717
Code multiple (%)	4,5 (2-13)	4,5 (0-6)	0,489
Coda piegata (%)	0 (0-2)	0 (0-0)	0,815
Coda arrotolata (%)	0 (0-1)	0,5 (0-2)	0,214
Coda spezzata (%)	3,5 (0-10)	2 (0-8)	0,670
Coda staccata (%)	1 (0-7)	2 (1-6)	0,542

p*: livello di significatività del test (Mann-Whitney).

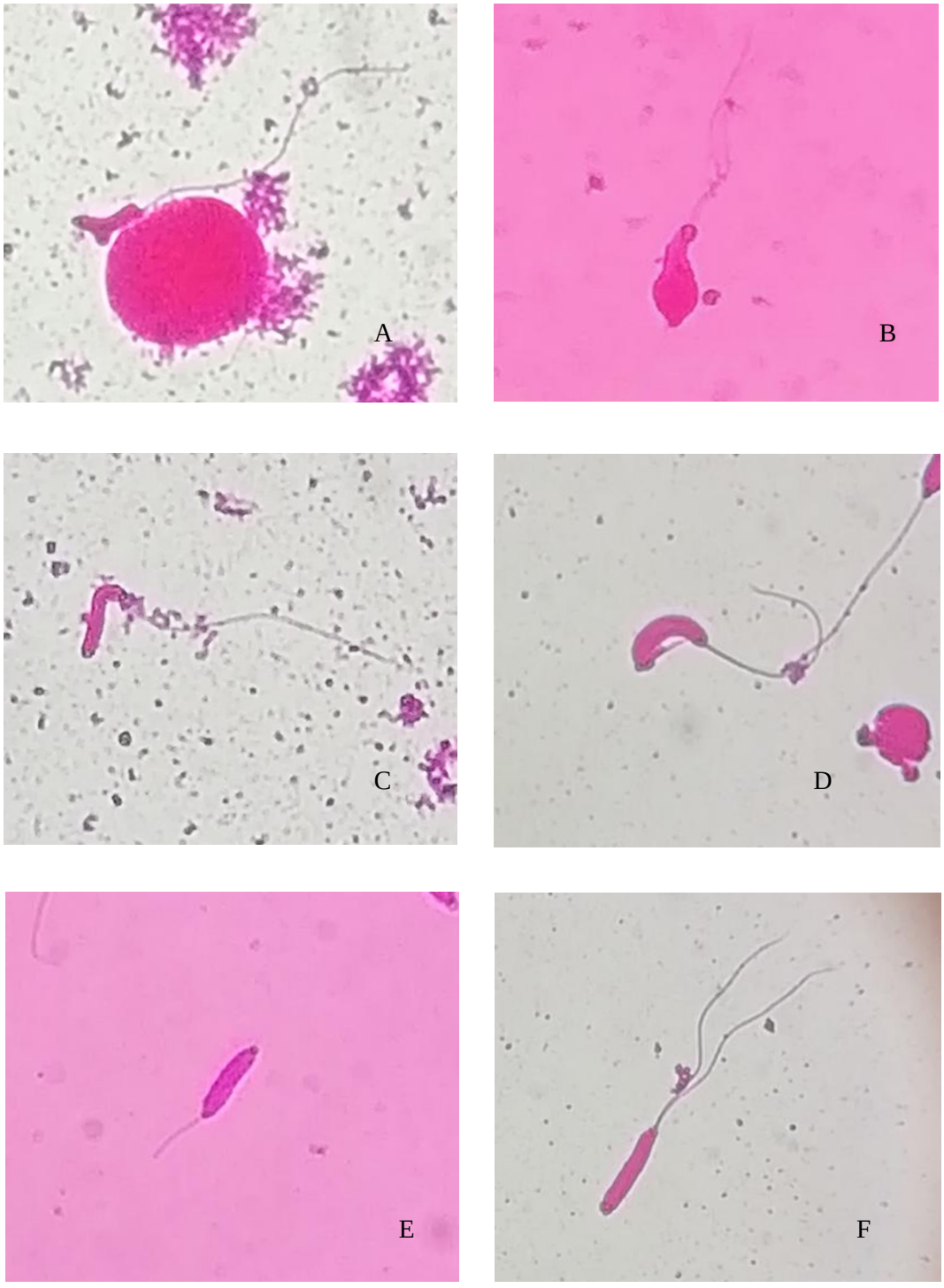


Figura 8.3: Esempi di anomalie spermatiche riscontrate durante lo studio. Colorazione: Rosa Bengala (400X).
A: Testa amorfa (ramificazione tipica del Pellegrino)
B: Testa amorfa (Girsacro)
C: Testa piegata
D: Testa "banana shaped"
E: Coda spezzata
F: Code multiple

8.8 Indagine morfometrica

La colorazione Rosa Bengala ha permesso anche di distinguere facilmente acrosoma, testa, segmento intermedio e flagello. La valutazione è stata effettuata sul seme diluito con Tris (1:10).

Per ciascuno dei campioni inclusi nella valutazione sono stati acquisiti i valori morfometrici di circa 50 spermatozoi.
Sono stati misurati, quindi, la lunghezza della testa dello spermatozoo (incluso l'acrosoma ed escluso l'acrosoma), la larghezza della testa, la lunghezza della coda (escluso il segmento intermedio), il perimetro della testa (incluso ed escluso l'acrosoma) e l'area della testa (incluso ed escluso l'acrosoma) su un totale di 650 spermatozoi di Girsacro e 210 spermatozoi di Pellegrino.
Per ognuno di tali parametri è stata calcolata la media e la deviazione standard (Tabella 8.6).

Tabella 8.6: Lunghezza media della testa, larghezza media della testa, perimetro ed area della testa e lunghezza della coda degli spermatozoi di Girsacro e Pellegrino. Tutti i valori sono stati espressi in termini di media ± DS. I vetrini sono stati allestiti con i campioni di seme diluiti 1:10 con Tris e colorati con colorazione Rosa Bengala.

Parametro	**Girsacro**	**Pellegrino**
Lunghezza (µm)[a c]	8,40 ± 1,88	9,30 ± 1,24
Lunghezza (µm)[b c]	7,49 ± 1,88	8,34 ± 1,24
Larghezza (µm)[c]	2,73 ± 0,48	2,30 ± 0,38
Perimetro (µm)[a c]	21,45 ± 3,89	23,19 ± 2,57
Perimetro (µm)[b c]	20,53 ± 3,89	22,28 ± 2,57
Area (µm²)[a d]	17,98 ± 5,35	16,70 ± 3,23
Area (µm²)[b d]	16,05 ± 5,15	14,97 ± 3,03
Coda (µm)[c]	35,51 ± 5,56	37,53 ± 6,38

a: parametri che includono l'acrosoma;
b: parametri che escludono l'acrosoma;
c: parametri caratterizzati da una distribuzione normale;
d: parametri non caratterizzati da distribuzione normale e per i quali è stata eseguita una statistica descrittiva per ricavare il valore di media±DS.

Successivamente si è attuato il confronto delle diverse misure ottenute tra Girsacro e Pellegrino, al fine di individuare una eventuale differenza nella morfometria spermatica tra le due specie.
Per i parametri caratterizzati da distribuzione normale (lunghezza, larghezza della testa, perimetro e lunghezza della coda) si è attuato il confronto tra i valori di media ±

DS, utilizzando il test statistico t-Student, il quale ha permesso di individuare una differenza altamente significativa ($p < 0,001$), tra parametri sopracitati, nelle due specie. In particolare il Pellegrino sembra possedere spermatozoi caratterizzati da teste significativamente più lunghe (sia che venga incluso o escusso l'acrosoma), mentre il Girsacro presenta teste di larghezza maggiore rispetto al Pellegrino. Il perimetro della testa (incluso ed escluso l'acrosoma) e la lunghezza della coda risultano essere maggiori nel Pellegrino rispetto al Girsacro. Quindi il Pellegrino presenta spermatozoi dalla testa più lunga e sottile in confronto all'ibrido.

I dati concernenti l'area della testa dello spermatozoo (includendo ed escludendo l'acrosoma) non hanno presentato una distribuzione normale. Pertanto, per verificare un'eventuale differenza tra le due specie è stato utilizzato il test di Mann-Whitney, che permette di confrontare due mediane.

I valori riguardanti l'area della testa sono, quindi, stati espressi anche in termini di mediana (min-max), con valori pari a 16,68 (10,28 - 52,14) μm^2 e 14,77 (8,70 - 49,59) μm^2 nel Girsacro, rispettivamente per l'area della testa incluso l'acrosoma ed escluso l'acrosoma. Mentre, nel Pellegrino, il valore dell'area della testa incluso l'acrosoma risulta pari a 16,36 (10,66 - 31,67) μm^2 e il valore che esclude l'acrosoma è di 14,64 (9,30 - 29,27) μm^2.

Confrontando l'area della testa dello spermatozoo escluso l'acrosoma, non sembra esserci una differenza significativa tra le due specie ($p = 0,111$). Al contrario, tale differenza diventa significativa se si considera l'area della testa incluso l'acrosoma ($p = 0,018$), la quale presenta un valore maggiore nel Girsacro. Probabilmente tale differenza è dovuta proprio al contributo dell'acrosoma stesso, che plausibilmente avrà una superficie maggiore nel Girsacro, mentre, se lo si esclude, non vi è differenza tra le due specie.

9. DISCUSSIONE

Molte specie di rapaci sono minacciate o a rischio estinzione. Diversi programmi di riproduzione in cattività sono nati proprio con lo scopo di preservare le popolazioni in declino (Lierz, 2014). L'interesse per l'implementazione delle tecniche di riproduzione artificiale non ha riguardato soltanto i programmi di conservazione, ma anche le realtà in cui tali tecniche vengono sfruttate a scopo commerciale, per la produzione di rapaci da falconeria.

La valutazione della qualità spermatica rappresenta un passaggio importante per lo sviluppo delle tecniche di riproduzione artificiale, soprattutto in quelle specie delle quali poco si conosce riguardo la biologia e fisiologia riproduttiva. Ma tale valutazione deve potersi adattare all'enorme variabilità interspecifica esistente, in termini di volume, concentrazione, motilità, vitalità, morfologia e morfometria spermatica.

Ecco che il presente studio mira ad individuare un protocollo di analisi del seme semplice e attuabile su più specie appartenenti al genere *Falco*.

Un passaggio cruciale, che precede la valutazione del materiale seminale, è la raccolta di quest'ultimo.

I metodi per la raccolta del seme nei rapaci, descritti in letteratura, comprendono il metodo cooperativo (Temple, 1972; Berry, 1972; Grier, 1973; Boyd and Schwartz, 1991; Samour, 2016a) e la tecnica del massaggio addominale (Weaver, 1991; Samour, 2016a; Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016; Cade *et al*., 1977), la quale non richiede un *training* molto lungo per abituare l'animale alla procedura, e pertanto si presta ad essere utilizzata anche sui rapaci selvatici. Quest'ultima metodica è stata utilizzata nel presente studio per l'ottenimento dell'eiaculato da esaminare.

La percentuale di successo del massaggio addominale negli uccelli può variare a seconda della specie e a seconda del soggetto, con valori riportati in letteratura pari all'86,00% nella Gru canadese (Gee and Temple, 1978), 90,00% nel Piccione selvatico (Sontakke *et al*., 2004), 84,60% nel Grifone dorsobianco del Bengala (Umapathy *et al*., 2005) e 74,00% nel Gheppio americano (Bird *et al*., 1976).

Anche in questo studio la raccolta tramite massaggio addominale si è rivelata efficace, con una percentuale di successo pari a 88,24% nel Girsacro e 85,71% nel Pellegrino.

Tale risultato è stato ottenuto grazie all'impiego di donatori normalmente utilizzati a tale scopo in allevamento, pertanto avvezzi alla procedura. Tuttavia in tre occasioni, a seguito del massaggio addominale, non è stato ottenuto l'eiaculato.

Ciò può essere stato dovuto al mancato raggiungimento dell'idoneo livello di rilassamento dell'animale o a causa della normale cessazione della produzione di spermatozoi in concomitanza con il termine della stagione riproduttiva (in particolare in due occasioni, in cui non si è più ottenuto materiale seminale a seguito del tentativo fallito). Inoltre, in una circostanza, l'eiaculato ottenuto dal Girsacro si è rivelato totalmente privo di spermatozoi e per tale motivo non è stato incluso nello studio. È plausibile che l'evento abbia coinciso con il termine della stagione riproduttiva per quell'esemplare. Infatti, il campione in questione è stato l'ultimo ad essere raccolto nella stagione 2018. L'interruzione repentina della produzione spermatica può essere ricollegata al calo drastico dei livelli di gonadotropine e testosterone, che si verifica proprio al termine del periodo riproduttivo.
Sono proprio questi ormoni, infatti, che orchestrano l'attività spermatogenetica. Quando i livelli sierici si abbassano si assiste alla produzione di eiaculato caratterizzato da una bassa concentrazione spermatica e da una elevata percentuale di cellule morfologicamente anomale, fino alla completa azoospermia (Santiago-Moreno *et al*., 2016).

Nonostante sia stato dimostrato che la tecnica del massaggio addominale possa portate ad una maggiore percentuale di contaminazione da urati, come è stato riscontrato nell'Aquila reale (36,8%), Falco pellegrino (48,2%) (Blanco *et al*., 2002a) e Grifone dorsobianco (39,4%) (Umapathy *et al*., 2005), soltanto un campione è risultato macroscopicamente contaminato. Ma il frazionamento della colonna di seme all'interno del capillare per la raccolta ha permesso di eliminare la porzione contaminata preservando la restante parte. Infatti, prestando attenzione durante il prelievo è possibile evitare la raccolta di feci ed urati, occasionalmente emessi. Inoltre, l'utilizzo di più capillari per il prelievo delle singole gocce di seme permette di preservare almeno una parte del materiale da una potenziale massiccia contaminazione.
Microscopicamente la contaminazione da parte di feci e urati ha riguardato solo il 6,25% dei campioni per Girsacro e il 16,67% nel Pellegrino, e il livello di contaminazione è stato così lieve da non aver apportato alcun cambiamento nel pH seminale. Una contaminazione così inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura è da ricondursi nuovamente al fatto che i soggetti inclusi nello studio sono impiegati da anni come riproduttori in allevamento, inoltre l'esperienza e la sensibilità del falconiere hanno sicuramente influito sull'efficacia della tecnica di raccolta.

Il volume di seme raccolto nel maschio di Pellegrino (119,50 ± 18,43 µl) si avvicina al valore riportato da Parks e colleghi (1986), i quali, utilizzando però il metodo cooperativo, ottennero 95,40 ± 51,70 µl (27-208 µl) di materiale seminale.
Se si considerano altri lavori in cui è stata utilizzata la tecnica del massaggio addominale, i valori relativi al volume spermatico sono sensibilmente inferiori, pari a 67,10 µl (Al-Daraji and Al-Shemmary 2016) e 15,50 ± 7,50 µl (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017).
Per quanto riguarda l'ibrido, il volume di seme (83,93 ± 49,36 µl) è stato comparato con i valori riportati in letteratura per le specie parentali (Girfalco e Falco sacro) in cui sono stati riscontrati volumi pari a 40,20 µl (Al-Daraji and Al-Shemmary 2016) e 25,20 ± 14,40 µl (Villaverde-Morcillo et al., 2017) per il Girfalco (*F. rusticolus*) e 44,50 µl (Al-Daraji and Al-Shemmary 2016) per il Falco sacro (*F. cherrug*).
Tale differenza può essere ricondotta a molteplici fattori, tra cui la frequenza di raccolta (Hoolihan and Burnham, 1985), il periodo della stagione riproduttiva, la tipologia e la durata del *training* per abituare l'animale al tipo di manipolazione, le caratteristiche individuali del soggetto e l'esperienza dell'operatore che esegue il massaggio.
Benché Villaverde-Morcillo *et al*. (2017) abbiano riscontrato una differenza significativa nel volume di eiaculato prodotto tra specie, tale significatività non è stata rilevata nel presente studio.

Concentrazione, motilità e morfologia spermatica sono considerati i tre parametri più importanti nella valutazione della qualità seminale (Du Plessis and Soley, 2014). La concentrazione spermatica calcolata per i due donatori risulta essere sensibilmente inferiore a quanto riportato per le specie avicole domestiche (Weaver, 1991), come pollo (Chalov, 1970), tacchino (Kotłowska *et al*., 2005) e anatidi (Kamar, 1962; Samour *et al*., 1985), mentre presenta il medesimo ordine di grandezza rilevato nel Parrocchetto monaco (Anderson *et al*., 2002), Gheppio americano (Bird and Laguë, 1977) e altri rapaci.
In particolare, la concentrazione spermatica riscontrata nel Pellegrino è risultata inferiore rispetto a quanto riportato da Hoolihan and Burnham (1985) (26,25 - 81,12 x 10^3 cell/µl), Parks *et al*. (1986) (47,4 x 10^3/µl) e Al-Daraji and Al-Shemmary (2016) (55,3 x 10^3/µl).
Tale differenza può essere legata al fatto che i campioni di Pellegrino sono stati raccolti verso la fine della stagione riproduttiva, quindi quando la produzione

spermatica comincia fisiologicamente a diminuire. Tuttavia il numero di cellule per eiaculato rientra nel *range* riscontrato da Hoolihan and Burnham (1985) (1,27 - 5,84 x 10^6 cell/eiaculato).

L'ibrido, invece, ha presentato una concentrazione spermatica media superiore a quanto riscontrato nelle specie parentali, i cui valori si aggirano attorno 41,30 x 10^3 cell/µl per il Girfalco e 44,50 x 10^3 cell/µl per il Falco sacro (Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016).

Vista la semplicità di utilizzo e la relativa precisione nella stima della concentrazione spermatica, escludendo fattori legati alla variabilità individuale, alla frequenza di raccolta e alla stagione, che possono incidere sulla produzione spermatica, il Vetriplast® sembra rappresentare una valida alternativa alle camere di conta in vetro, anche perché permette la valutazione di più campioni contemporaneamente.

La motilità totale media del seme fresco tal quale di Pellegrino, pochi minuti dopo la raccolta (67,52%), appare lievemente inferiore rispetto quanto riportato in studi precedenti, in cui nella stessa specie sono stati stimati valori medi pari a 83,90% (Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016) e 70,10% (Parks *et al*., 1986). Nonostante ciò il dato ottenuto nel presente studio rientra comunque nel range di valori riportato da Parks *et al*. (1986).

Al contrario, nel Girsacro, il valore di motilità totale (32,06%) è risultato sensibilmente inferiore rispetto a quanto stimato per il Girfalco (68,80%) e per il Falco sacro (74,20%) (Al-Daraji and Al-Shemmary, 2016). Allo stesso modo la percentuale di motilità progressiva nel seme dell'ibrido (18,52%) è risultata essere minore rispetto al valore riportato da Villaverde-Morcillo *et al*. (2017) per il Girfalco (75,00 ± 12,00%).

Inoltre la percentuale di motilità totale, nel Girsacro, sembra aumentare nel seme diluito con Tris appena dopo la raccolta (43,13%), tuttavia tale differenza tra seme tal quale e diluito non è significativa.

Tale discrepanza tra i dati rilevati nel presente studio e quelli riportati in letteratura è da ricondursi probabilmente alla tipologia di allestimento del campione.

Infatti, solitamente, la valutazione della motilità spermatica viene eseguita ponendo una goccia di seme su vetrino preriscaldato a 37°C (Parks *et al*., 1986; Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Nel presente studio, essendo tale valutazione eseguita sul campo in assenza di strumentazione necessaria a preriscaldare seme e vetrini, è stato scelto di allestire e osservare i campioni a temperatura ambiente, come suggerito dalle

linee guida WHO (World Health Organization, 2010), chiaramente monitorando la temperatura ambientale in modo da individuare eventuali variazioni nella temperatura stessa (fortunatamente il periodo nel quale si è svolto lo studio ha garantito di mantenere una temperatura relativamente costante all'interno del laboratorio presente in allevamento).

Questa differenza nell'allestimento dei campioni può aver alterato l'effettiva percentuale di cellule motili, con conseguente diminuzione della stessa dovuta alla temperatura di incubazione inferiore. Tuttavia, il risultato ottenuto nel Pellegrino potrebbe far ipotizzare che la temperatura di incubazione possa aver avuto un ruolo minore, avendo ottenuto valori molto simili a quanto rilevato con allestimento del campione a 37°C.

Un'altra sostanziale differenza tra il presente studio e la letteratura risiede nella modalità di stima della motilità spermatica. Generalmente questa viene valutata soggettivamente (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017), attribuendo un valore percentuale o uno score numerico a seconda di quanti spermatozoi motili vengono osservati per campo.

In questo studio, invece, tutti i parametri relativi alla motilità spermatica sono stati ricavati contando singolarmente gli spermatozoi motili, non motili e progressivi, grazie all'acquisizione e all'osservazione di filmati. Pertanto è probabile che il dato percentuale relativo alla motilità ritrovato in letteratura sia sovrastimato in virtù proprio della soggettività della valutazione.

A questo si aggiunge una possibile differenza individuale e di specie nel valore di motilità. Infatti, nel Pellegrino, si sono riscontrati valori di motilità progressiva e totale significativamente maggiori rispetto all'ibrido. Inoltre, in quest'ultimo, non è stato possibile comparare i dati relativi alla motilità con la letteratura, dal momento che non vi sono attualmente dati pubblicati relativi all'analisi spermatica negli esemplari ibridi. È possibile che, dal momento che il Girsacro ha mostrato una motilità inferiore rispetto alle specie parentali, l'effetto dell'ibridazione abbia avuto un impatto sui parametri spermatici. Ma per avvallare l'ipotesi sarebbe necessario ripetere lo studio su di un numero maggiore di ibridi. Nonostante ciò il riproduttore di Girsacro incluso nello studio è un esemplare di provata fertilità. Pertanto la presunta minore motilità degli spermatozoi del soggetto ibrido non sembra compromettere le performance riproduttive dello stesso.

La motilità spermatica, in entrambi i donatori, è stata valutata anche sul seme diluito con Tris allo scorrere del tempo. Lo scopo è stato quello di verificare se l'*extender*

impiegato fosse in grado di mantenere la motilità spermatica nel tempo e se il suo impiego potesse alterare i parametri sopracitati rispetto al seme non diluito.
Sia la motilità totale che progressiva, nel seme diluito, si sono mantenute simili nei tre intervalli in cui è stata eseguita l'osservazione. Inoltre i valori riscontrati sono risultati analoghi a quanto osservato sul seme tal quale entro specie. Questo dato suggerisce che il Tris potrebbe prestarsi come diluitore per lo stoccaggio del seme a temperatura ambiente, dal momento che non provoca alterazioni della motilità rispetto al seme non diluito e mantiene la capacità motile degli spermatozoi nel tempo. Infatti il Tris è stato in grado di sostenere la funzione spermatica per almeno 40 minuti a temperatura ambiente. Ma anche il seme tal quale ha mantenuto una motilità pressoché costante da T0 a T40. È pertanto possibile che le sostanze nutritive presenti all'interno del materiale seminale siano fisiologicamente in grado di sostenere il metabolismo spermatico per tutto quel tempo, fino all'esaurimento delle stesse. In letteratura è indicato che il seme fresco può mantenere la capacità fertilizzante da 5-10 minuti (Blesbois and Brillard 2007) fino ad 1 ora (Boyd and Schwartz, 1991) a temperatura ambiente (ma aneddoticamente è riportato che la motilità e la fertilità del campione vengano mantenute molto più a lungo).
Per tale motivo sarebbe opportuno aumentare il tempo di incubazione anche oltre le 24 ore e ripetere la valutazione della motilità, al fine di individuare in quale momento le riserve energetiche nel tal quale arrivano ad esaurimento e se effettivamente il Tris garantisce il giusto sostentamento dopo l'esaurimento delle stesse.
Nonostante ciò il fatto che la motilità spermatica non abbia subito un calo dopo la diluizione rappresenta comunque un risultato incoraggiante. Tuttavia tale dato dovrebbe essere considerato assieme a quanto riscontrato nella valutazione della vitalità spermatica. Infatti un buon diluitore non solo deve garantire il mantenimento della motilità degli spermatozoi, ma deve possedere caratteristiche tali da limitare i danni alla membrana spermatica, che possono verificarsi a seguito dello stress osmotico o dei cambiamenti di pH del mezzo, compromettendo la vitalità degli spermatozoi stessi.
Per tale motivo è stata comparata anche la percentuale di cellule vitali tra campione tal quale e diluito per entrambi i donatori.

La percentuale di spermatozoi vitali sul seme non diluito di Girsacro (91,33 ± 4,88%) risulta superiore a quanto riportato da Al-Daraji and Al-Shemmary (2016) per le due

specie parentali, e si avvicina a quanto riscontrato nel pollo (98,00%) e nel fagiano (97,00%), utilizzando sempre la colorazione Eosina-Nigrosina (Herrera *et al*., 2005).
Mentre per il Pellegrino la percentuale di vitalità (82,50 ± 15,22%) si avvicina al dato riportato da Blanco *et al*. (2002a) (93,80 ± 4,70%), mentre risulta lievemente superiore al valore riscontrato da Al-Daraji and Al-Shemmary (2016) (78,10%).
La vicinanza della percentuale di vitalità ottenuta nel presente studio ai dati presenti in letteratura rappresenta un risultato incoraggiante, soprattutto per quanto concerne il Falco pellegrino. In quest'ultimo, infatti, in uno studio precedente, l'utilizzo della colorazione Eosina-Nigrosina non aveva permesso di ottenere informazioni precise riguardo la vitalità spermatica, dal momento che il colorante sembrava penetrare anche all'interno delle cellule vitali (Hoolihan and Burnham, 1985).
Nel presente studio, invece, la vitalità percentuale del seme tal quale non differisce in modo significativo tra i due donatori, facendo presagire che in realtà tale colorazione si possa prestare allo scopo anche in queste specie. Inoltre, all'osservazione diretta nel campione colorato al microscopio, è stato possibile distinguere perfettamente le cellule vitali da quelle non vitali e non sono mai state riscontrate colorazioni ambigue o un numero insolitamente elevato di spermatozoi non vitali, tali da far sospettare difetti nell'acquisizione del colorante da parte degli spermatozoi stessi.
Tuttavia, per verificare se effettivamente l'Eosina-Nigrosina rappresenta, nei falchi, una colorazione efficace per discriminare le cellule vitali da quelle morte, sarebbe opportuno testare altre tipologie di colorazioni e compararne i dati, al fine di individuare una eventuale differenza nella percentuale di vitalità con le diverse tecniche.
Nonostante ciò, la colorazione usata in questo studio è risultata essere di semplice applicabilità sul campo ed ha permesso di distinguere le due popolazioni cellulari anche nel seme diluito.
Ciò ha permesso di verificare che non esiste una differenza significativa tra la vitalità riscontrata sul seme tal quale e su quello diluito con Tris, dimostrando che l'*extender* è stato in grado di mantenere ottimali le caratteristiche dell'ambiente extracellulare (soprattutto in termini di pH e osmolarità), impedendo un qualsiasi danno a carico degli spermatozoi che potesse comprometterne la vitalità.
Il Tris, quindi, non solo non pregiudica la vitalità del seme diluito rispetto al tal quale, ma non comporta alcuna differenza, in termini di percentuale di cellule vitali, tra le due specie.

Ciò sembra, quindi, confermare che il Tris potrebbe effettivamente prestarsi come *extender* per il seme di falco, sia per lo stoccaggio a breve termine che a lungo termine.
La prospettiva futura è, infatti, quella di utilizzare il Tris come *extender* di base cui verrà aggiunto il crioprotettore, con lo scopo poi di procedere con le prove di congelamento del seme.
La presenza del fruttosio all'interno del Tris fornisce l'energia necessaria al mantenimento della motilità spermatica, mentre il tris(idrossimetil)amminometano cloridrato e il citrato limitano le variazioni di pH dovute al metabolismo spermatico.
Queste ultime due sostanze, in particolare, sono comunemente impiegate come buffer nella costituzione di *extender* per il seme di mammiferi, come bovino (Rehman *et al*., 2013), bufalo (El-Sisy *et al*., 2016), suino (Gadea, 2003), coniglio (Carluccio *et al*., 2010), cane (Rota *et al*., 1995; Tsutsui *et al*., 2003; Hermansson and Forsberg, 2006) e specie selvatiche come il Licaone (*Lycaon pictus*) (Van den Berghe *et al*., 2018).
Mentre l'utilizzo del tris(idrossimetil)amminometano cloridrato negli uccelli è poco documentato, ma è stato sperimentato nel tacchino (Kuzlu and Taskin, 2017).

Pertanto, la scelta di utilizzare questo *extender*, oltre ad essere stata dettata dalla semplice reperibilità dello stesso (essendo già in uso presso il Laboratorio di Ostetricia del Dipartimento MAPS dell'Università degli Studi di Padova), ha avuto lo scopo di testare la sua efficacia sul seme di uccelli.
Non includendo alcun tipo di crioprotettore al suo interno è stato possibile verificare l'effetto dei buffer e del fruttosio sulla funzione spermatica. Questo dato preliminare sarà utile nel momento in cui si deciderà di testare i differenti crioprotettori. Infatti, avendo già verificato l'efficacia del Tris, una volta addizionato il crioprotettore sarà possibile individuare eventuali alterazioni nei parametri spermatici, riconducibili all'effetto del crioprotettore stesso o di qualsiasi altra sostanza che si deciderà di addizionare all'*extender* (come tuorlo d'uovo). Ciò permetterà di individuare il crioprotettore più idoneo per la crioconservazione del seme di falco.
Ma l'efficacia del processo di crioconservazione non è determinata solo dal tipo di crioprotettore utilizzato, ma anche dalla metodica di congelamento e dalla morfologia spermatica.
Infatti la capacità di risposta degli spermatozoi al processo di congelamento-scongelamento è fortemente influenzata dalle caratteristiche morfologiche e morfometriche (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Pertanto conoscere le caratteristiche

dell'eiaculato e acquisire informazioni riguardo la dimensione e la forma degli spermatozoi divengono fondamentali per lo sviluppo della crioconservazione del seme nei rapaci (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Inoltre la determinazione delle dimensioni della testa dello spermatozoo può essere utile anche per riconoscere diverse sottospecie (Gee, 1983).

L'utilizzo della colorazione Rosa Bengala, qui utilizzata per la prima volta nei falchi, si è rivelata una metodica di semplice applicabilità sul campo ed efficace nel permettere di individuare le anomalie spermatiche. Ha garantito, inoltre, di attuare un'attenta valutazione morfometrica, dal momento che ha messo chiaramente in evidenza tutte le diverse parti dello spermatozoo, sia nel Pellegrino che nel Girsacro. È stata impiegata anche in due campioni di Astore (*Accipiter gentilis*), dimostrandosi efficace anche sugli spermatozoi di questa specie, caratterizzati da una testa filiforme. Tuttavia, visto l'esiguo numero di campioni di Astore su cui è stata testata, i risultati non sono stati riportati nello studio.

Nonostante l'efficacia, l'utilizzo della colorazione Rosa Bengala negli uccelli è poco documentato, infatti è stata testata nel Nandù (*Rhea americana*) (Góes *et al*., 2010), nello Struzzo (Walsangkar *et al*., 2015) e nel pollo domestico (Nath *et al*., 2015), mentre non vi sono studi che testimonino il suo utilizzo nei rapaci.

La percentuale di spermatozoi morfologicamente normali riscontrata nel Girsacro (66,71 ± 11,26) e nel Pellegrino (65,75 ± 7,81) è risultata essere inferiore rispetto a quanto ritrovato nel pollo (98%), fagiano (97%), Poiana codarossa (96%) (Herrera *et al*., 2005) ed Emù (*Dromaius novaehollandiae*) (83%) (Du Plessis and Soley, 2011). Mentre sembrano avvicinarsi ai valori ricavati dallo studio di Al-Daraji and Al-Shemmary (2016), soprattutto confrontando i dati relativi all'ibrido con quanto riscontrato nel Girfalco (68,2%) e Falco sacro (74,9%); per il Pellegrino, invece, è stato rilevato un valore pari all'80%.

La conseguente maggiore percentuale di anomalie spermatiche riscontrate nel presente studio, rispetto a quanto riportato in gran parte delle ricerche riguardanti le specie domestiche e selvatiche, non necessariamente si traduce in una minore fertilità. È necessario prima stabilire la tipologia di anomalie presenti nell'eiaculato dal momento che non tutte compromettono la capacità fecondante delle cellule spermatiche. Infatti, generalmente sono le anomalie definite maggiori (a carico della testa, dell'acrosoma e del segmento intermedio) che potenzialmente possono portare ad una ridotta fertilità, mentre la presenza di anomalie minori (anomalie della coda e teste staccate) (Chenoweth, 2005) non ha una grande rilevanza clinica a meno che

non siano presenti in elevata percentuale (Enciso *et al*., 2011). In entrambi i donatori inclusi nello studio, le anomalie minori rappresentano la maggior parte delle anomalie totali riscontrate. Inoltre le specie tendenzialmente monogame presentano normalmente una più alta percentuale di anomalie spermatiche e forme immature (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Mentre le specie poligame, come i galliformi, presentano una maggiore omogeneità, la quale risulta vantaggiosa vista l'intensa competizione spermatica che le caratterizza (Santiago‐Moreno et al., 2016).

In aggiunta a ciò, la discrepanza di dati rispetto alla letteratura può essere dovuta anche alla mancanza di un sistema classificativo univoco delle anomalie spermatiche negli uccelli.

Nonostante ciò la stima della percentuale di spermatozoi normali sul seme diluito, assieme agli altri parametri, rappresenta un punto di partenza per stimare la potenziale capacità di fecondazione degli spermatozoi del campione, prima di attuare la crioconservazione del seme. Inoltre, la manipolazione dell'eiaculato e il processo di congelamento-scongelamento stesso, possono danneggiare una parte delle cellule spermatiche portando alla comparsa artefattuale di anomalie quali teste staccate e code spezzate. La loro valutazione prima del processo di stoccaggio a lungo termine permette, quindi, di comprendere se tali anomalie si siano generate a seguito della metodica stessa o se fossero già presenti.

Durante il processo di crioconservazione, però, possono verificarsi cambiamenti anche a carico della dimensione della testa dello spermatozoo a causa di un danno all'acrosoma o ad una alterazione nella struttura della cromatina (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017). Inoltre, la dimensione della testa rispecchia il volume di acqua presente all'interno della cellula ed influenza la permeabilità della stessa al crioprotettore. Quindi la capacità delle cellule spermatiche di sopravvivere al processo di crioconservazione dipende dalla loro dimensione.

L'utilizzo di ImageJ ha permesso di ricavare in modo semplice diversi parametri morfometrici. Il Falco pellegrino ha dimostrato di possedere spermatozoi dalla testa più lunga e sottile. Mentre il Girsacro ha presentato un'area della testa (incluso l'acrosoma) significativamente maggiore rispetto a quella del Pellegrino, ma tale differenza non è stata riscontrata considerando l'area della testa escluso l'acrosoma, suggerendo che quest'ultimo deve avere una superficie maggiore proprio nell'ibrido.

I parametri dimensionali relativi alla testa dello spermatozoo, sia nel Girsacro che nel Pellegrino, sono risultati superiori a quanto riscontrato da Villaverde-Morcillo *et al*. (2017), i quali hanno rilevato una lunghezza della testa (escluso l'acrosoma) pari a

6,70 ± 1,40 nel Girfalco, 6,30 ± 10 nel *F. peregrinus peregrinus* e 7,00 ± 1,20 nel *F. peregrinus brookei*; una larghezza di 2,10 ± 0,50 (Girfalco), 1,60 ± 0,20 (*F. p. peregrinus*) e 1,70 ± 0,30 (*F. p. brookei*); un'area di 11,90 ± 4,00 (Girfalco) e 8,50 ± 1,40 (*F. p. peregrinus*) e 10,00 ± 2,40 (*F. p. brookei*) ed un perimetro pari a 16,20 ± 3,2 (Girfalco), 14,80 ± 2,10 (*F. p. peregrinus*) e 16,50 ± 2,80 (*F. p. brookei*). Villaverde-Morcillo *et al*. (2017) hanno inoltre individuato tra gli spermatozoi maturi quattro diverse sottopopolazioni caratterizzate da parametri dimensionali differenti. In particolare i valori relativi alle sottopopolazioni 1 (Sp1) e 2 (Sp2) si avvicinano maggiormente a quanto riscontrato in questo studio preliminare.

Il motivo di tale differenza è da ricercare in molteplici fattori come: caratteristiche legate all'individuo, sottospecie, periodo della stagione riproduttiva, tipo di *extender*, metodica di colorazione, tipologia di software utilizzata per effettuare le misurazioni. Inoltre è stato notato che, nella Pernice rossa (*Alectoris rufa*), la lunghezza e l'area della testa degli spermatozoi risultano inferiori rispetto ai suoi ibridi (Santiago‐Moreno *et al*., 2016), e ciò potrebbe essere vero anche per il Girsacro.

Questi dati rappresentano un risultato preliminare, ma, vista la notevole importanza che riveste la morfometria nel prevedere la risposta del seme al congelamento, la prospettiva futura è quella di ripetere la valutazione su più esemplari, cercando di includere più specie e testando anche altre colorazioni.

Inoltre sarebbe interessante quantificare la percentuale di cellule immature, le quali possono avere un effetto deleterio sull'efficacia del processo di congelamento-scongelamento, essendo responsabili della produzione di elevate quantità di ROS (Villaverde-Morcillo *et al*., 2017).

10. CONCLUSIONI

Esiste una notevole variabilità nelle caratteristiche spermatiche anche tra specie di uccelli appartenenti allo stesso genere. Ciò può influenzare fortemente lo sviluppo di metodiche di conservazione del seme nel breve e lungo periodo. Pertanto lo sviluppo di metodiche di analisi spermatica efficaci diviene fondamentale per ampliare l'attuale conoscenza riguardo le caratteristiche degli spermatozoi degli uccelli e per individuare le eventuali differenze tra specie.

In particolare, nel presente studio, è stata individuata una differenza significativa, legata alla specie, nel valore di pH seminale, nella concentrazione spermatica, nel numero di spermatozoi/eiaculato, nella motilità totale (%) e progressiva (%), in alcuni parametri morfometrici e nella percentuale di alcune anomalie spermatiche. Tali differenze dovranno essere tenute in considerazione nel momento in cui si deciderà di procedere con prove di crioconservazione del materiale seminale.

L'utilizzo dell'*extender* contenente tris(idrossimetil)amminometano cloridrato, invece, non ha comportato alcuna variazione, in termini di motilità e vitalità, rispetto al seme tal quale sia nel Girsacro che nel Pellegrino. Infatti ha permesso il mantenimento della funzione spermatica per 40 minuti a temperatura ambiente e ha mantenuto un ambiente extracellulare ideale al mantenimento della vitalità degli spermatozoi. Il fatto che il diluitore non abbia compromesso la motilità e non abbia causato un significativo danno alla membrana citoplasmatica dimostra la potenzialità di impiego del Tris nello stoccaggio a breve termine, ma la reale sfida è rappresentata dal suo utilizzo come diluitore per lo stoccaggio del seme a lungo termine e a bassa temperatura. In realtà, durante lo studio, sono state effettuate anche delle prove di stoccaggio del seme diluito a temperatura di refrigerazione (4°C). Dopo un'ora in frigorifero la motilità spermatica è stata rivalutata con lo scopo di verificare se la bassa temperatura avesse comportato alterazioni della motilità stessa. Purtroppo questa valutazione è stata eseguita su un numero insufficiente di campioni, pertanto si è deciso di non includere i risultati nello studio. Tuttavia tali risultati sono apparsi incoraggianti e sarebbe interessante includere tale valutazione in studi futuri.

Il Tris si potrebbe prestare, quindi, a diventare l'*extender* di base al quale addizionare il crioprotettore in un futuro protocollo di crioconservazione.

Per l'applicazione di tale metodica, però, diviene fondamentale considerare anche la dimensione degli spermatozoi e la percentuale di spermatidi e spermatociti presenti nel

campione, dal momento che potrebbero condizionare l'efficacia del processo di congelamento-scongelamento. L'impiego della colorazione Rosa Bengala e l'utilizzo di ImageJ come software di elaborazione digitale delle immagini si sono dimostrati strumenti efficaci per l'ottenimento dei diversi parametri morfometrici. Pertanto il loro uso nell'analisi del seme negli uccelli dovrebbe essere implementato.

Questo studio preliminare, quindi, grazie all'utilizzo di alcuni strumenti testati per la prima volta nei rapaci, propone un protocollo di analisi spermatica semplice, poco costoso e applicabile sul campo, benché siano necessarie ulteriori prove al fine di perfezionare la procedura. Suggerisce, inoltre, il possibile utilizzo del Tris come *extender* per lo stoccaggio del seme a breve e a lungo termine.

11. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Aire T.A. (2014). Spermiogenesis in birds. Spermatogenesis 4(3): e959392

Al-Daraji H.J. and Al-Shemmary S. A. (2016). Effect of breed of falcon on semen quality traits. International Journal of Conservation Science 7(3): 725-734

Allen C.J. and Champion L.R. (1955). Competitive fertilization in the fowl. Poult. Sci. 34(6): 1332-1342

Anderson S.J., Bird D.M. and Hagen M.D. (2002). Semen characteristics of the Quaker parakeet (*Myiopsitta monachus*). Zoo Biol 21: 507-513

Ashizawa K. and Sano R. (1990). Effects of temperature on the immobilization and the initiation of motility of spermatozoa in the male reproductive tract of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. 96(2): 297-301

Ávalos J. (2013). The peregrine falcon and human beings. In The book of raptors, ed. Lacasa M., 257-264. Barcelona: Photodigiscoping S.C.P

Ball B.A. and Mohammed H.O. (1995). Morphometry of stallion spermatozoa by computer assisted image analysis. Theriogenology 44:367-377.

Ballou J.D. (1984). Strategies for maintaining genetic diversity in captive populations through reproductive technology. Zoo Biology 3(4): 311-323

Ballou J.D. (1992). Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. Cryobiology 29(1): 19-25

Barthel P.H. and Fünfstück H.J. (2012). Das problem der hybriden zwischen großfalken *Falco spp*. (The problem of hybrids between large falcons *Falco spp*.). Limicola 26: 21-43

Batocco F. (2015). 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. Tutore Fausto A.M., co-tutore Taddei A.R.. Dottorato di ricerca in Evoluzione biologica e biochimica,

Dipartimento di scienze biologiche ed ecologiche, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

Beatty R.A. (1957). Nigrosin-eosin staining of rabbit spermatozoa and the fertility of semen. In Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B., Biology 67(1): 1-31

Beebe K., Bentley G.E. and Hau M. (2005). A seasonally breeding tropical bird lacks absolute photorefractoriness in the wild, despite high photoperiodic sensitivity. Functional Ecology 19(3): 505-512

Beletsky L. D., Gori D. F., Freeman S. and Wingfield, J. C. (1995). Testosterone and polygyny in birds. In Current Ornithology 12, ed. Power D.M., 1–41. Boston: Springer

Benoit J. and Assenmacher I. (1954). Comparative sensitivity of superficial and deep receptors in photosexual reflex in duck. C. R. Hebd Seances Acad. Sci. 239(1), 105-107

Benoit, J. (1964). The role of the eye and of the hypothalamus in the photostimulation of gonads in the duck. Annals of the New York Academy of Sciences 117: 204-215

Berry R.B. (1972). Reproduction by artificial insemination in captive American goshawks. J. Wldlf Managmnt 36(4): 1283-1288

Best R. (1996). Breeding Problems (Raptors), In BSAVA Manual of Raptors, Pigeons and Waterfowl, ed. Beynon P. H., Forbes N. A. and Harcourt-Brown N. H., 208-215. Shurdington: BSAVA - British Small Animal Veterinary Association

Bird D.M., Laguë P.C. (1977). Semen production of the American kestrel. Can. J. Zool. 55(8): 1351-1358

Bird D.M., Laguë P.C. and Buckland R.B. (1976). Artificial insemination vs natural mating in captive American kestrels. Can. J. Zool. 54(7): 1183-1191

BirdLife International (2015). European Red List of Birds. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. http://datazone.birdlife.org/info/euroredlist, consultato il 30/05/2019

BirdLife International (2016a). BirdLife Position on minimising threats from hybrid falcons (originating from captive-bred birds) on wild European falcon populations. https://www.birdlife.org/sites/default/files/bhdtf_position_2016_hybrid_falcons.pdf, consultato: 30/05/2019

BirdLife International (2016b). Falco peregrinus. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T45354964A95143387.en, consultato: 30/05/2019

BirdLife International (2018). State of the world's birds: taking the pulse of the planet, ed. BirdLife International. Cambridge, UK: BirdLife International

Birkhead T.R. and Fletcher F. (1995). Depletion of determines sperm numbers in male Zebra finches. Animal Behavior 49(2): 451-456

Birkhead T.R., Immler S., Pellatt E.J. and Freckleton R. (2006). Unusual sperm morphology in the Eurasian bullfinch *Pyrrhula pyrrhula*. Auk, 123(2): 383-392

Björndahl L., Söderlund I. and Kvist U. (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Human Reproduction 18(4): 813-816

Blanco J.M., Gee G., 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(4): 1164-1171

Blanco J.M., Gee G.F., Wildt D.E., Donoghue A.M. (2002a). Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and a novel intramagnal insemination approach. J Zoo Wildl Med 33(1): 1-7

Blanco J.M., Samour J. and Bird D.M. (2007). Reproductive physiology. In Raptor Research and Management Techniques, ed. Bird D.M. and Bildstein K.L., 286-292. Surrey: Hancock House Publishers Ltd

Blanco J.M., Wildt D.E., Höfle U., Voelker W., Donoghue A.M. (2009). Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. Theriogenology 71(1): 200-213

Blanco J.M., Wildt D.E., Monfort S.L., Gee G. and Donoghue A.M. (2002b). Developing assisted reproductive technologies to promote *ex situ* raptor conservation. In Proceedings of the International Symposium on Assisted Reproductive Technology (ART) for the Conservation and Genetic Management of Wildlife, 264-269. Omaha, Nebraska, 2002

Blas J., López L., Tanferna A., Sergio F. and Hiraldo F. (2010). Reproductive endocrinology of wild, long-lived raptors. General and Comparative Endocrinology 168(1): 22-28

Blesbois E. (2006). Advances in avian semen cryopreservation. In Proceedings of the 12th European Poultry Conference, 10-14. Verona, Italy, 2006

Blesbois E. and Brillard J.P. (2007). Specific features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. Animal 1(1): 1472-1481

Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F., Mignon-Grasteau S., Saint Jalme M. and Mialon-Richard M.M. (2008). Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. Theriogenology 69(2): 252-61

Blesbois E., Seigneurin F., Grasseau I., Limouzin C., Besnard J., Gourichon D., Coquerelle D.G., Rault P. and Tixier-Boichard M. (2007). Semen cryopreservation for *ex situ* management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. Poult. Sci. 86(3): 555-564

Boyd L.L. (1978). Artificial insemination of falcons. Symp. Zool. Soc. London 43: 73-80

Boyd L.L. and Schwartz C.M. (1991) Training imprinted semen donors. In Falcon propagation: a manual of captive breeding, ed. Weaver J.D. and Cade T.J., 24-31. Boise: The Peregrine Fund Inc

Boz M.A., Sarıca M. and Yamak U.S., (2014). The effect of oviposition time on hatching traits of different chicken genotypes. Europ. Poult.Sci. 78: 1-9

Breucker H. (1978). Macrophages, a normal component in seasonally involuting testes of the swan (*Cygnus olor*). Cell Tiss Res 193(3): 463-471

Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K. and Hartman D. (2011). Examination of the Stallion for Breeding Soundness. In Manual of equine reproduction, Third edition, ed. Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K. and Hartman D., 176-206. Maryland Heights: Mosby Inc. (Elsevier)

Brock M. and Bird D. (1991). Prefreeze and postthaw effects of glycerol and dimethylacetamide on motility and fertilizing ability of American kestrel (*Falco sparverius*) Spermatozoa. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 22(4): 453-459

Brock M.K., Bird D.M. and Ansah G.A. (1984). Cryogenic preservation of spermatozoa of the American kestrel. Int Zoo Yearb 23(1): 67-91

Brock, M. (1991). Semen collection and artificial insemination in the Hispaniolan parrot (*Amazona ventralis*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine 22(1): 107-114

Burrows W.H. and Quinn J.P. (1935). A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. Poult. Sci. 14(4): 253-254

Burrows W.H. and Quinn J.P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey, Poult. Sci. 16(1): 19-24

Cade T.J., Weaver J.D., Platt J.B. and Burnham W.A. (1977). The propagation of large falcons in captivity. Raptor Research 11(1-2): 28-48

Campbell R.C., Dott H.M. and Glover T.D. (1956). Nigrosin eosin as stain for differentiating live and dead spermatozoa. J. Agric. Sci. 48(1): 1-8

Carluccio A., Robbe D., De Amicis I., Contri A., Tosi U., Russo F. and Paoletti M. (2010). Technical Note: Artificial insemination in rabbits: laboratory and field trial with three different semen extenders. World Rabbit Science 12(2): 65-79

Cassone V.M. and Kumar V. (2015). Circadian Rhythms. In Sturkie's avian physiology, Sixth Edition, ed. Scanes C.G., 814-827. San Diego: Academic Press

Chalov A. (1970). Semen quality and fertilizing capacity of cocks. Ptiferodstron 20: 24-26

Chen Y.-C., Liu H.-C., Wei L.-Y., Huang J.-F., Lin C.-C., Blesbois E. and Chen M.-C. (2016). Sperm quality parameters and reproductive efficiency in Muscovy duck (*Cairina moschata*). Journal of Poultry Science 53(3): 223-232

Cheng F.P., Guo T.J., Wu J.T., Lin T.E., Ursem P.J.F., Colenbrander B. and Fung H.P. (2002). Annual variation in semen characteristics of pigeons (*Columbia livia*). Poult. Sci. 81(7): 1050-1056

Cheng K.M., Hickman A.R., and Nichols C.R. (1989). Role of the proctodeal gland foam of male japanese quail in natural copulations. Auk 106: 279-285

Chenoweth P.J. (2002). Semen quality assessment. In Proceedings The applied reproductive strategies in beef cattle workshop, 247-255. Manhattan, Kansas, 2002

Chenoweth P.J. (2005). Genetic sperm defects. Theriogenology 64(3): 457-468

Christensen V.L. and Bagley L.G. (1989). Efficacy of fertilization in artificially inseminated turkey hens. Poult. Sci. 68(5): 724-729

Collins T.J. (2007). ImageJ for microscopy. Biotechniques 43(1): 25-30

Cooper J.E. (2002). Nomenclature. In Birds of prey: health and disease, Third edition, ed. Cooper J.E., 9-12. Oxford: Blackwell Science Ltd

Coppack T. and Pulido F. (2004). Photoperiodic response and the adaptability of avian life cycles to environmental change. Advances in ecological research 35: 131-150

D'Aloria M.A. and Eastham C.P. (2000). DNA-based sex identification of falcons and its use in wild studies and captive breeding. Zool. Middle East 20(1): 25-32

D'Ovidio (2017). Anatomia e fisiologia. In medicine a chirurgia degli animali esotici, ed. Selleri P., Di Girolamo N., Collarile T., 38-43. Vermezzo: Poletti editore

Dawson A. and Sharp J.P. (2007). Photorefractoriness in birds - photoperiodic and non-photoperiodic control. General and Comparative Endocrinology 153 (1-3): 378-384

Deem S. L. (2002). Medicina dei rapaci - principi di base e condizioni non infettive. Veterinaria 16(1): 89-96

Della Volpe A., Schmidt V. and Krautwald-Junghanns M.E. (2011). Attempted semen collection using the massage technique in Blue fronted amazon parrots (*Amazona aestiva aestiva*). J Avian Med Surg 25(1): 1-7

DeMatteo K.E., Karagiannis K.L., Asa C.S., Macek M.S., Snyder T.L., Tieber A.M. and Parker P.G. (2004). Semen collection and artificial insemination in the Common piping guan (*Pipile cumanensis cumanensis*): potential applications for Cracidae (*Aves: Galliformes*). J Avian Med Surg 35(4): 447-458

Dewey T. and Potter M. (2002). *Falco peregrinus*. Animal diversity web. University of Michigan Museum of Zoology. https://animaldiversity.org/accounts/Falco_peregrinus/, consultato il 13/09/2019

Dixon A. (2012). Conservation of the Saker Falcon (*Falco cherrug*) and the use of hybrids for falconry. Aquila 119: 9-19

Dogliero A., Rota A., Lofiego R., Mauthe von Degerfeld M. and Quaranta G. (2016). Semen evaluation in four autochthonous wild raptor species using computer-aided sperm analyzer. Theriogenology 85(6): 1113-1117

Donoghue A.M. (1999). Prospective approaches to avoid flock fertility problems: predictive assesment of sperm function traits in poultry. Poult sci. 78(3): 437-443

Donoghue A.M. and Wishart G.J. (2000). Storage of poultry semen. Anim Reprod Sci. 62(1-3): 213-232

Dott H.M. and Foster G.C. (1972). A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. J. Reprod. Fert. 29(3): 443-445

Du Plessis L. and Soley J.T. (2011). Incidence, structure and morphological classification of abnormal sperm in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). Theriogenology 75(4): 589-601

Du Plessis L. and Soley J.T. (2014). Light microscopic features and morphometry of sperm in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). Theriogenology 81(2): 203-209

Eastham C.P. and Nicholls M. K. (2005). Morphometric analysis of large falco species and their hybrids with implications for conservation. J Raptor Res. 39(4): 386-393

El-Sisy G.A., Shahba M.I. and El-Sheshtawy R.I. (2016). Freezability of buffalo semen with TRIS extender enriched with disaccharides (trehalose or sucrose) and different glycerol concentrations. Asian Pacific Journal of Reproduction 5(5): 416-418

Enciso M., Cisale H., Johnston S.D., Sarasa J., Fernández J.L. and Gosálvez J. (2011). Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. Theriogenology 76(1): 23-32

Enderson J.H., White C.M. and Banasch U. (1998). Captive breeding and releases of peregrines (*Falco peregrinus*) in North America. In Holarctic Birds of Prey, ed. Chancellor R.D., Meyburg B.U.and Ferrero J.J., 437-444. Merida: Adenex and Berlin: World Working Group on Birds of Prey.

Esteso M.C., Fernández-Santos M.R., Soler A.J. and Garde J.J. (2003). Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. Cryoletters 24(4): 261-268

Ferreira T. and Rasband W. (2012). ImageJ User Guide (IJ 1.46r). https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146.html, consultato 16/07/2019

Fischer D., Neumann D., Purchase C., Bouts T., Meinecke- Tillmann S., Wehrend A. and Lierz M. (2014). The use of semen evaluation and assisted reproduction in Spix's macaws in terms of species. Conservation Zoo Biology 33(3): 234-244

Fleming L.V., Douse A.F. and Williams N.P. (2011). Captive breeding of peregrine and other falcons in Great Britain and implications for conservation of wild populations. Endangered Species Research 14(3): 243-257

Fowler D.W., Freedman E.A., Scannella J.B. (2009). Predatory functional morphology in raptors: interdigital variation in talon size is related to prey restraint and immobilisation technique. PLoS ONE 4(11): e7999

Fox N. (2013). Gestione della riproduzione. In Comprendere gli uccelli da preda, ed. Fox N., 58-118. Alessandria: Artiglio editore

Frediani M.H., Guida F.J.V., Salgado P.A.B., Gonçalves D. R., Blank M.H., Novaes G.A. and Pereira R.J.G. (2019). Semen collection by electro-stimulation in a variety of bird orders. Theriogenology 125: 140-151

Freshman J.L. (2002). Semen collection and evaluation. Clinical techniques in small animal practice 17(3): 104-107

Fujihara N., Nishiyama H. and Koga O., (1985). The ejection of a frothy fluid from the cloacal region of rooster during manual semen collection. Can. J. Anim. Sci. 65(4): 985-988

Gadea J. (2003). Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. Spanish Journal of Agricultural Research 1(2): 17-27

Gee G.F. (1983). Avian artificial insemination and semen preservation. In Proceedings IFCB Symposium on Breeding Birds in Captivity, ed. Delacour J., 375- 398. North Hollywood, CA., 1983

Gee G.F. and Sexton T.J. (1990). Cryopreservation of semen from the Aleutian Canada goose (*Branta canadensis leucopareia*). Zoo. Biol. 9(5): 361-371

Gee G.F. and Temple S.A. (1978). Artificial insemination for breeding nondomestic birds. In Artificial breeding of non-domestic animals, ed. Watson P.F., 51-72. London: Academic Press

Gee G.F., Bakst M.R. and Sexton T.J. (1985). Cryogenic preservation of semen from the Greater Sandhill Crane. J Wildlife Manage 49(2): 480-484

Gee G.F., Bertschinger H., Donoghue A.M., Blanco J. and Soley J. (2004). Reproduction in nondomestic birds: physiology, semen collection, artificial insemination and cryopreservation. Avian and Poultry Biology Reviews 15(2): 47-101

Gee G.F., Morrell C.A., Franson J.C. and Pattee O.H. (1993). Cryopreservation of American kestrel semen with dimethylsulfoxide. J Raptor Res 27(1): 21-25

Gentile A, Federico II e la Falconeria. http://www.stupormundi.it/it/federico-ii-e-la-falconeria, consultato il 12/09/19

Gill F. and Donsker D. (2019). IOC World Bird List (v 9.1). http://www.worldbirdnames.org, consultato il 13/09/2019

Girling S.J. (2003). Basic avian anatomy and physiology. In Veterinary nursing of exotic pets, ed. Girling S.J., 3-24. Oxford: Blackwell Publishing Ltd

Global Raptor Information Network (2019). Species account: Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*). http://www.globalraptors.org/grin/SpeciesResults.asp?specID=8248, consultato il 13/09/2019

Góes P.A.A., Cavalcante A.K. da S., Nichi M., Perez E.G. de A., Barnabe R.C. and Barnabe V.H. (2010). Reproductive characteristics of captive greater rhea (*Rhea*

americana) males reared in the state of São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Poultry Science 12(1): 57-62

Graham J.K. (2001). Assessment of sperm quality. In Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, 302-305. San Diego, USA, 2001

Gravance C., Lewis K.M. and Casey P.J. (1995). Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. Theriogenology 44(7): 989-1002

Grier J.W. (1973). Techniques and results of artifcial insemination with Golden Eagles. Raptor Res. 7(1): 1-12

Gvaryaku G., Robinson B., Meltzer A., Perek M. and Snapir N. (1984). An improved method for obtaining semen from Muskovi drakes and some of its quantitative and qualitative characteristics. Poult. Sci. 63(3): 548-53

Hammerstedt R.H., Graham J.K. and Nolan J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. Journal of Andrology 11(1): 73-88

Hartley P.S., Dawson B., Lindsay C., McCormick P. and Wishart G. (1999). Cryopreservation of houbara semen: A pilot study. Zoo Biol. 18(2): 147-152

HBW and BirdLife International (2018). Handbook of the Birds of the World and BirdLife International digital checklist of the birds of the world. Version 3. http://datazone.birdlife.org/userfiles/file/Species/Taxonomy/HBW-BirdLife_Checklist_v3_Nov18.zip [.xls zipped 1 MB], consultato il 13/09/2019

Hermansson U. and Linde-Forsberg C. (2006). Freezing of stored chilled dog spermatozoa. Theriogenology 65(3): 584-593

Hernández-Avilés C., Zambrano-Varón J. and Jiménez-Escobar C. (2019). Current trends on stallion semen evaluation: what other methods can be used to improve our capacity for semen quality assessment? Journal of veterinary andrology 4(1): 1-19

Herrera J. A., Calderón G., Guzmán A., Vargas A. K., Ávalos A., Rosales A. M. (2017). Evaluation of two diluents for the storage of fresh and cryopreserved semen of Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*). Austral J Vet Sci 49(1): 39-43

Herrera J.A., Quintana J.A., López M.A., Betancourt M. and Fierro R. (2005). Individual cryopreservation with dimethylsulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. Archives of Andrology 51(5): 353-360

Hirai M., Boersma A., Hoeflich A., Wolf E., Foll J., Aumüller T.R. and Braun J. (2001). Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars *(Sus scrofa)*: relation to fertility and seminal plasma growth factors. J Androl 22 (1): 104-10

Hoolihan J. and Burnham W. (1985). Peregrine falcon semen: a quantitative and qualitative examination. Raptor Reseach 19(4): 125-127

Immler S., Saint-Jalme M., Lesobre L., Sorci G., Roman Y. and Birkhead T.R. (2007). The evolution of sperm morphometry in pheasants. J Evol Biol 20(3): 1008-1014

Jamieson B.G.M. (2007). Avian spermatozoa: structure and phylogeny. in reproductive biology and phylogeny of birds, Part A, ed. Jamieson B.G.M., 349–511. Enfield, NH: Science Publishers

Johnson A.L. (1986). Reproduction in the male. In Avian physiology, Fourth edition, ed. Sturkie P.D., 432-451. New York: Springer

Johnson A.L. (2015). Reproduction in the female. In Sturkie's avian physiology, Sixth Edition, ed. Scanes C.G., 635-665. San Diego: Academic Press

Jones R. and Dodd C. (2012). Birds: biology and husbandry. In BSAVA Manual of Exotic Pet and Wildlife Nursing, ed. Varga M., Lumbis R., Gott L., 58-79. Gloucester: BSAVA-British Small Animal Veterinary Association

Kamar G.A.R. (1962). Semen characteristics of various breeds of drakes in the subtropics. J. Reprod. Fertil. 3: 405-409

King A.S. and McLelland J. (1984). Male reproductive system. In Birds: Their structure and function, Second edition, ed. King A.S. and McLelland J., 166-174. London: Bailliere Tindall

Kirby J.D. and Froman D.P. (2000). Reproduction in the male. In Sturkie's Avian Physiology, Fifth Edition, ed. Whittow G.C., 597–612. San Diego: Academic Press

Knowles-Brown A. and Wishart G.J. (2001). Progeny from cryopreserved Golden eagle spermatozoa. Avian Poult. Biol. Rev. 12: 201-202

Komarek V. (1970). The cloaca of the turkey-cock and of the cock. Acta Vet. Brno 39: 227-234

Kondracki S., Banaszewska D. and Mielnicka C. (2005). The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). Cellular & Molecular Biology Letters 10(1): 3-13

Kondracki S., Wysokińska A., Kania M. and Górski K. (2017). Application of two staining methods for sperm morphometric evaluation in domestic pigs. J Vet Res 61(3): 345-349

Kotłowska M., Glogowski J., Dietrich G.J., Kozłowski K., Faruga A., Jankowski J. and Ciereszko A. (2005). Biochemical characteristics and sperm production of turkey semen in relation to strain and age of the males. Poult. Sci. 84(11): 1763-1768

Kowalczyk A.M., Łukaszewicz E.T. and Kowalczyk A. (2012). Successful preservation of capercaillie (*Tetrao urogallus L.*) semen in liquid and frozen states. Theriogenology 77(5): 899-907

Kucera A.C and Heidinger B.J. (2018). Avian semen collection by cloacal massage and isolation of DNA from sperm. J. Vis. Exp. 132: e55324

Kuzlu M. and Taskin A. (2017). The effect of different extenders on the sperm motility and viability of frozen Turkey semen. Indian J. Anim. Res. 51(2): 235-241

Lake P.E. (1957). The male reproductive tract of the fowl. J. Anat. 91: 116-129

Lake P.E. and Stewart J.M. (1978). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen-an improved method. Br. Poult. Sci. 19(2):187-194

Lake P.E. (1971). The male in reproduction. In Physiology and biochemistry of the domestic fowl, Volume 3, ed. Bell D.J. and Freeman B.M., 1411-1447. London: Academic Press

Lierz M. (2008). Raptors: reproductive disease, incubation and artificial insemination. In BSAVA manual of raptors, pigeons and passerine birds, ed. Chitty J. and Lierz M., 235-249. Gloucester: BSAVA - British Small Animal Veterinary Association

Lierz M. (2014). Veterinary perspectives of falcon breeding. In Proceedings Veterinary medicine for falconry into the 21th century, 6-8. Doha, Qatar, 2014

Lierz M., Petritz O.A. and Samour J. (2016). Reproduction. In Current therapy in avian medicine and surgery, ed. Speer B. L., 433-460. St. Louis: Elsevier Inc

Lierz M., Reinschmidt M., Müller H., Wink M. and Neumann D. (2013). A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (*Psittaciformes*). Scientific Reports 3: 2066

Lindberg P. and Nesje M. (2000). Lost falconers birds and hybrid falcons - do they have an impact on European Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) populations? - a case study of lost falconers birds breeding in Sweden. In Proceedings of the Joint Meeting of the Raptor Research Foundation and the World Working Group on Birds of Prey and Owls, 107-120. International Birding and Research Center in Eilat, Israel, 2000

Linde-Forsberg C. (2001). Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In Recent advances in small animal reproduction, ed. Concannon P.W., England G., Verstegen J. and Linde-Forsberg C.. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Document No. A1209.0501

Long J.A. (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? Poult. Sci. 85(2): 232-236

Lüpold S., Calhim S., Immler S. and Birkhead T.R. (2009). Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. In Proceedings Biological sciences 276(1659): 1175-1181

Mace G.M. (1989). The application of reproductive technology to endangered species breeding programmes. Zoological Journal of the Linnean Society 95(2): 109-116

Madeddu M. (2008). Creazione di una banca del seme di specie selvatiche dell'avifauna sarda mediante l'utilizzo del gallo come modello sperimentale. Tutore Berlinguer F.. Dottorato di Ricerca in "Riproduzione, Produzione e Benessere Animale", Dipartimento di Biologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari

Maggavi R.R., Pujari S. and Kumar, V. (2016). Development of a novel computer assisted system for human sperm head morphometry based on open source software. Journal of medical science and clinical research (JMSCR) 4(6): 11065-11072

Mancinelli E. and Bament W. (2014). Birds of prey: what you should know. https://www.vettimes.co.uk consultato il 13/09/2019

Mantovani C., Cerolini S., Bellaganba F., Mangiagalli M.G. and Cavalchini L.G. (1993). Evaluation of pheasant semen production during the reproductive season. Reprod. Nutr. Dev. 33(6): 503-509

Marquez B.J. and Ogasawara F.Y. (1975). Scanning electron microscope studies of turkey semen. Poult. Sci. 54(4): 1139-1142

McFarlane R.W. (1963). The taxonomic significance of avian sperm. Proceedings of the XIII international ornithological congress, ed. Sibley G.C., 91-102. Ithaca, New York, 1963

Meijer T. and Schwabl, H., (1989). Hormonal patterns in breeding and nonbreeding kestrels (*Falco tinnunculus*): field and laboratory studies. General and Comparative Endocrinology 74(1): 148-160

Meijer T., Daan S. and Hall M.R. (1990). Family planning in the kestrel (*Falco tinnunculus*): the proximate control of laying date and clutch size. Behavaviour 114(1-4): 117-136

Meijer T., Deerenberg C., Daan S. and Dijkstra C. (1992). Egg-laying and photorefractoriness in the European Kestrel (*Falco tinnunculus*). Ornis Scandinavica 23(3): 405-410.

Menaker M. (1968). Extraretinal light perception in the sparrow. Entrainment of the biological clock. In Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 59(2): 414-421

Menaker M. and Underwood H. (1979). Extraretinal photoreception in birds. Photochemistry and Photobiology 23(4): 299-306

Mindell D.P., Fuchs J. and Johnson J.A. (2018). Phylogeny, taxonomy, and geographic diversity of diurnal raptors: *Falconiformes*, *Accipitriformes* and *Cathartiformes*. In Birds of Prey, ed. Sarasola J.H., Grande J.M and Negro J.J., 3-32. Cham: Springer International Publishing AG

Moller A.P. (1991). Sperm competition, sperm depletion, paternal care, and relative testis size in birds. The American Naturalist 137(6): 882-906

Muller M.G. (2009a). Introduction. In Practical handbook of falcon husbandry and medicine, ed. Muller M.G, 1-12. New York: Nova Science Publishers Inc

Muller M.G. (2009b). Species information. In Practical handbook of falcon husbandry and medicine, ed. Muller M.G, 13-31. New York: Nova Science Publishers Inc.

Nath A., Basu S. and Datta U. (2015). Coenzyme Q10 and soyphosphatidylcholine in EK extender on preservation of Rhode Island Red poultry semen. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research 2(2): 134-140

Nelson R.W. (1972). On photoperiod and captive breeding of northern peregrines. Raptor Research Vol. 6 (2): 57-72

Neumann D., Kaleta E.F. and Lierz M. (2013). Semen collection and artificial insemination in Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) - a potential model for Psittacines. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 41(2): 101-105

O'Brien J., Oehler D., Malowski S. and Roth T. (1999). Semen collection, characterization, and cryopreservation in a Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). Zoo Biol. 18(3): 199-214

Oberlender G., Murgas L.D.S., Zangeronimo M.G., Silva A.C., Pereira L.J. and Muzzi R.A.L. (2012). Comparison of two different methods for evaluating boar semen morphology. Arch Med Vet 44: 201-205

Oliphant L.W. (1991). Hybridization between a Peregrine falcon and a Prairie falcon in the wild. J. Raptor Res. 25(2): 36-39

Ostermeier G.C., Sargeant G.A., Yandell B.S., Evenson D.P. and Parrish J.J. (2001). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. J Androl 22(4): 595-603.

Owen R.D. (1941). Artifcial insemination of pigeons and doves. Poult. Sci. 20(5): 428-431

Papanicolaou G.N. (1942). A new procedure for staining vaginal smears. Science 95(2469): 438-439

Parks J.E and Hardaswic V. (1987). Fertility and hatchability of falcon eggs after insemination with frozen Peregrine falcon semen. J. Raptor Res. 21(2): 70-72

Parks J.E., Heck W.R. and Hardaswick V. (1986). Cryopreservation of Peregrine falcon semen and post-thaw dialysis to remove glycerol. J Raptor Res 20(1): 15-20

Pellatt E.J. and Birkhead T.R. (1994). Ejaculate size in zebra finches (*Taeniopygia guttata*) and a method for obtaining ejaculates from passerine birds. Ibis 136(1): 97-106

Peña .FJ., Saravia F., García-Herreros M., Núñez-Martín I., Tapia J.A., Johannisson A., Wallgren M. and Rodríguez-Martinez H. (2005). Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. J Androl 26(6): 716-723

Penfold L.M., Harnal V., Lynch W., Bird D., Derrickson S.R. and Wildt D.E. (2001). Characterization of Northern pintail (*Anas acuta*) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. Reproduction 121(2): 267-275

Platt J.B., Bird D.M. and Bardo L. (2007). Captive breeding. In Raptor research and management techniques, ed. Bird D.M. and Bildstein K.L., 383-400. Surrey: Hancock House Publishers Ltd

Pollock C.G. and Orosz S.E. (2002). Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. The veterinary clinics exotic animal practice 5(3): 441-474

Pollock C.G., Klaphake E. and Wellehan J.F.X. Jr. (2016). Avian medicine: an overview. In Current therapy in avian medicine and surgery, ed. Speer B. L., 1-2. St. Louis: Elsevier Inc

Proudman J.A. and Siopes T.D. (2002). Relative and absolute photorefractoriness in turkey hens: profiles of prolactin, thyroxine, and triiodothyronine early in the reproductive cycle. Poult Sci 81(8): 1218-1223

Quay W.B. (1967). Comparative survey of the anal glands of birds. Auk 84(3): 379-389

Quinn J.P. and Burrows W.H. (1936). Artificial insemination in fowls. J Heredity 27(1): 31-38

Rehman F., Zhao C., Shah M.A., Qureshi M.S. and Wang X. (2013). Semen extenders and artificial insemination in Ruminants. Veterinaria 1(1): 1-8

Rota A., Ström B. and Forsberg C.L. (1995). Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. Theriogenology 44(6): 885-900

Rybnik P.K., Horbanczuk J.O., Naranowicz H., Lukaszewicz E. and Malecki I.A. (2007). Semen collection in the Ostrich (*Struthio camelus*) using a dummy or a teaser female. Br. Poult. Sci. 48(5): 635-643

Saint Jalme M. (1999). Endangered avian species captive propagation: an overview of functions and techniques. Avian and Poulty Biology Reviews 13(3): 187- 202

Saint Jalme M., Gaucher P. and Paillat P. (1994). Artificial inseminations in Houbara bustards (*Chlamydotis undulata*): influence of the number of spermatozoa and insemination frequency on fertility and ability to hatch. J. Reprod. Fertil. 100(1): 93-103

Saint Jalme M., Lecoq R., Seigneurin F., Blesbois E. and Plouzeau E. (2003). Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the step towards a cryobank for endangered avian species. Theriogenology 59(3-4): 875-888

Samour J. (2016a). Reproduction - Semen collection. In Avian medicine, Third edition, ed. Samour J., 525-529. St. Louis: Elsevier

Samour J. (2016b). Reproduction - Semen quality assessment. In Avian medicine, Third edition, ed. Samour J., 529-531. St. Louis: Elsevier

Samour J. (2016c). Reproduction, Spermatozoa quality assessment. In Avian medicine, Third edition, ed. Samour J., 531-534. St. Louis: Elsevier

Samour J., Baggott G.K., Williams G., Bailey I.T., Watson P.F. (1986a). Seminal plasma composition in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Comp Biochem Physiol 84(4): 735-738

Samour J., Markham J.A. and Moore H.D.M. (1988). Semen cryopreservation and artificial insemination in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). J. Zool. 216(1): 169-176

Samour J., Smith C.A., Moore H.D.M. and Markham J.A. (1986b). Semen collection and spermatozoa characteristics in Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). Vet Rec 118(14): 397-399

Samour J., Spratt D.M. J., Hutton R.E. and Jones D.M. (1985). Studies on semen collection in waterfowl by electrical stimulation. British Veterinary Journal 141(3): 265–268

Santiago-Moreno J., Esteso M.C., Villaverde-Morcillo S., Toledano-Déaz A., Castaño C., Velázquez R., López-Sebastián A., Goya A.L. and Martínez J.G. (2016). Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. Asian journal of andrology 18(6): 882-888

Santolaria P., Soler C., Recreo P., Carretero T., Bono A., Berné J.M. and Yániz J.L. (2016). Morphometric and kinematic sperm subpopulations in split ejaculates of normozoospermic men. Asian journal of andrology 18(6): 831-834

Sayed M.A.M., Abouelezz F.M.K. and Abdel-Wahab Amira A.M. (2017). Analysis of sperm motility, velocity and morphometry of three egyptian indigenous chicken strains. Egypt. Poult. Sci. 37(4): 1173-1185

Schmutz S.M. and Oliphant L.W. (1987). Chromosome study of peregrine, prairie, and gyrfalcons with implications for hybrids. J. of Heredity 78(6): 388-390

Schneider H., Fischer D., Failing K., Ehling C., Meinecke-Tillmann S., Wehrend A. and Lierz M. (2017). Investigations on different semen extenders for Cockatiel semen. J. Zoo Biol. 1(1): 1-12

Scott D.E. (2016). Anatomy and physiology. In Raptor medicine, surgery, and rehabilitation, Second Edition, ed. Scott D.E., 11-20. Wallingford: CAB International

Sekoni V.O. and Gustafsson B.K. (1987). Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. British Veterinary Journal 143 (4)**:** 312-317.

Sexton T.J. (1977). A new poultry semen extender: Effects of extension on the fertility of chicken semen. Poult. Sci. 56(5): 1443-1446

Sexton T.J. and Gee G. (1978). A comparative study on the cryogenic preservation of semen from the sandhill crane and the domestic fowl. Symp. Zool. Soc. London 43: 89-95

Shaklee W.E. and Knox C.W. (1954). Hybridization of the pheasant and fowl. J. Hered. 45(4): 183-190

Singh A., Teotia U.V.S. and Singh S. (2012). Semen evaluation in farm animals. DHR International Journal Of Biomedical and Life Sciences 2(1): 35-40

Sjaastad O.V., Sand, O. and Hove K. (2010). Reproduction. In Physiology of domestic animals, ed. Sjaastad O.V., Sand, O. and Hove K., 683-730. Oslo: Scandinavian Veterinary Press

Słowińska M., Sallem H., Clench M.R. and Ciereszko A. (2018). Metabolomic analysis of white and yellow seminal plasma in turkeys (*Meleagris gallopavo*). Poult. Sci. 97(3): 1059-1065

Smyth J.R.Jr. (1968). Poultry. In The artificial insemination of farm animals, ed. Perry E.J., 258-300. New Brunswick: Rutgers University Press

Sontakke S.D., Umapathy G., Sivaram V., Kholkute S.D. and Shivaji S. (2004). Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). Theriogenology 62(1-2):139-153

Sousa P.D., Santos E.S., Souza A.L., Lima G.L., Barros F.P., Oliveira M.F. and Silva A.R. (2013). Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). Pesq. Vet. Bras. 33(7): 924-930

Stelzer G., Crosta L., Bürkle M. and Krautwald-Junghanns M.E. (2005). Attempted semen collection using the massage technique and semen analysis in various psittacine species. J. Avian. Med. Surg. 19(1): 7-13

Temple S.A. (1972). Artificial insemination with imprinted birds of prey. Nature 237(5353): 287-288

Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T. and Tur B. (1995). Cryopreservation of poultry semen. Br. Poult. Sci. 36(5): 805-811

Tsutsui T., Tezuka T., Mikasa Y., Sugisawa H., Kirihara N., Hori T., Kawakami E. (2003). Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. J. Vet. Med. Sci. 65(3): 307-12

Umapathy G., Sontakke S., Reddy A., Ahmed S. and Shivaji S. (2005). Semen characteristics of the captive Indian white-backed vulture (*Gyps bengalensis*). Biol. Reprod. 73(5): 1039-1045

Van den Berghe F., Paris M.C.J., Briggs M.B., Farstad W.K. and Paris D.B.B.P. (2018). A two-step dilution tris-egg yolk extender containing Equex STM significantly improves sperm cryopreservation in the African wild dog (*Lycaon pictus*). Cryobiology 80: 18-25

Van der Horst G. and Maree L. (2009). SpermBlue: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. Biotech Histochem 84(6): 299-308

Venable N.J. (1996). Birds of prey through the ages. In Birds of prey, ed. Venable N.J., 3-6 West Virginia University Extension Service

Villaverde-Morcillo S., Soler A.J., Esteso M.C., Castaño C., Miñano-Berna A., Gonzalez F. and Santiago-Moreno J. (2017). Immature and mature sperm morphometry in fresh and frozen-thawed falcon ejaculates. Theriogenology 98: 94-100

Vizcarra J., Alan R. and Kirby J. (2015). Reproduction in male birds. In Sturkie's avian physiology, Sixth edition, ed. Scanes C.G., 667-693. San Diego: Academic Press

Waldoch J., Root T., Dubach J.M., Proudfoot J. and Ramer J. (2012). Semen characteristics and artificial insemination in Rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome chrysocome*). Zoo. Biol. 31(2): 166-180

Waldoch J., Root T., Ramer J. and Proudfoot J. (2007). Semen collection and characterization in Rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome chrysocome*). J. Zoo. Wildlife Med. 38(1): 13-17

Walsangkar M.G., Omprakash A.V., Selvan S.T. and Sundaresan A. (2015). Effect of breeding season on seminal attributes of Ostrich (*Struthio camelus*) semen in humid tropical climate. International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture 1(4): 39-43

Weaver J.D. (1991). Artificial insemination. In Falcon propagation: a manual of captive breeding, ed. Weaver J.D. and Cade T.J., 19-23. Boise: The Peregrine Fund Inc

White, C.M., Clum N.J., Cade T.J. and Hunt W.G. (2002). Peregrine falcon (*Falco peregrinus*), version 2.0. In The birds of North America, ed. Poole A.F. and Gill F.B.. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, USA. https://birdsna.org/Species-Account/bna/species/perfal/introduction, consultato 16/07/2019

Wink M., Döttlinger H., Nicholls M.K., Sauer-Gürth H. (2000). Phylogenetic relationships between Black Shaheen (*Falco peregrinus peregrinator*), Red-naped Shaheen (*F. pelegrinoides babylonicus*) and Peregrines (*F. peregrinus*). In Raptors at risk, ed. Chancellor R.D. and Meyburg B.U., 853-857. Berlin/Blaine: WWGBP/Hancock House

Wink M., Sauer-Gürth H., Ellis D. and Kenward R. (2004). Phylogenetic relationships in the Hierofalco complex (Saker-, Gyr-, Lanner-, Laggar Falcon). In Raptors worldwide, ed. Chancellor R.D. and Meyburg B.U., 499-504. Berlin: WWGBP - The World Working Group on Birds of Prey and Owls

Wishart G.J. and Palmer F.H. (1986). Correlation of the fertilizing ability of semen from individual male fowls with sperm motility and ATP content. Br Poult. Sci. 27(1): 97-102

Wolfson A. (1952). The cloacal protuberance. a means for determining breeding condition in live male passerines. Bird Banding 23(4): 159-165

World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research (2010). Standard procedures. In WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth edidion, ed. World Health Organization, 7-114. Ginevra: WHO Press

Yániz J.L., Capistrós S., Vicente-Fiel S., Hidalgo C.O. and Santolaria P. (2016). A comparative study of the morphometry of sperm head components in cattle, sheep, and pigs with a computer-assisted fluorescence method. Asian J. Androl. 18(6): 840-843

Young G.R, Dawson A., Newton I. and Walker L. (2009). The timing of gonadal development and moult in three raptors with different breeding seasons: effects of gender, age and body condition. Ibis 151(4): 654–666

Zucca P. (2002). Anatomy. In Birds of prey: health and disease, Third edition, ed. Cooper J.E., 13-27. Oxford: Blackwell Science Ltd

12. SITOGRAFIA

http://www.falconeria.info/altro/articoli_falconeria_rapaci/articolo_rapaci_alto_basso_volo.htm. I rapaci della falconeria: alto volo e basso volo, consultato il 13/08/2019

https://iaf.org/a-history-of-falconry. A history of falconry, consultato il 17/09/2019

https://iaf.org/exotic-species-and-hybrids-in-falconry. Exotic species and hybrids in falconry, consultato: 30/05/2019

https://www.cites.org/eng/disc/species.php, consultato: 21/05/2019

https://cites.org/eng/prog/captive-breeding, consultato: 27/08/2019

https://www.iaf.org/download/docs. Position statement and code of conduct for falconry with respect to invasive alien species, The International Association for Falconry and Conservation of Birds of Prey (2014), consultato: 30/05/2019

https://www.iucn.org, consultato: 15/05/2019

https://www.iucnredlist.org/, consultato: 15/05/2019

http://www.kima.it/files/Plastic%20Counting%20Chambers.pdf. Plastic counting chambers, consultato 16/07/2019

http://www.enrico-bruno.it/media/upload/prodotti/05211710%20Vetrini%20sedimenti%20urinari%20Vetriplast.pdf, consultato 16/07/2019

https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpbnxjZGVmYXVsd2NpZW5jZXNhdXxneDoyODE1ODVlZTE0YWEzMmI0. VETRIPLAST® Counting chambers, Vacutest Kima s.r.l., consultato 16/07/2019

13. RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Professor Antonio Mollo, per la pazienza con la quale ha saputo guidarmi nei momenti di difficoltà, e il Dottor Marco Martini, per avermi assecondato e per aver creato l'opportunità per la nascita di questo studio.

Un ringraziamento speciale va a Nicola Michelon, per il tempo dedicatomi, per la sua disponibilità e per avermi fatto conoscere alcune sfaccettature del mondo della falconeria; senza di lui tutto questo non sarebbe stato possibile.

A Paolo Zucchini e a Barbara Contiero, per il supporto tecnico e statistico, senza il quale non avrei potuto completare questo progetto.

A tutti gli amici e colleghi dell'università che hanno sopportato i miei momenti di crisi e che mi hanno aiutato ad affrontarli.

Alla mia famiglia, per avermi sempre incoraggiato e sostenuto nella mia passione.

Infine a Yuri, per la dolcezza e la calma con le quali mi è stato accanto in ogni momento. A lui dedico questo lavoro.