



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

*International PhD School in
Biomolecular and Biotechnological Sciences*

Curriculum: Biochemistry and Molecular Biology

Direttore: Prof. Leonardo Antonio Sechi

XXVII Ciclo

**Studio della variabilità genetica nel Grifone
Sardo (*Gyps fulvus*) attraverso l'analisi del
DNA mitocondriale**

Tutor: Dott. Paolo Mereu, PhD

Dottorando: Dott. Luca Decandia

Sommario

1. Scopo della ricerca	4
2. Introduzione	7
2.1 Il Grifone	7
2.2 DNA mitocondriale	11
2.2.1 Struttura e funzioni	11
2.2.2 <i>Control Region</i>	13
2.3 Analisi filogenetica	15
2.4 Network	17
3. Materiali e metodi	20
3.1 Estrazione del DNA	20
3.2 Amplificazione tramite PCR del DNA	22
3.2.1 Primer degenerati	27
3.3 Controllo e purificazione dei prodotti di PCR	28
3.4 Sequenziamento nucleotidico	28
3.5 Analisi dei dati	29
4. Risultati	31
4.1 Caratterizzazione strutturale	31
4.2 Confronti di sequenza	33
4.2.1 ND2	33
4.2.2 <i>Control Region</i>	33
4.3 Analisi filogenetica	34
4.3.1 ND2	34
4.3.2 <i>Control Region</i>	37
5. Discussione	45
6. Bibliografia	53

1. Scopo della ricerca

Conoscere l'origine di una specie e ricostruire il percorso evolutivo che ne ha caratterizzato la comparsa e l'insediamento in una determinata area geografica è di fondamentale importanza per la gestione mirata del patrimonio faunistico di un territorio, che abbia come fine ultimo la conservazione della biodiversità attraverso la tutela dell'identità genetica delle specie in esso presenti.

Secondo la "Lista Rossa 2011 degli uccelli nidificanti in Italia" redatta dalla LIPU (Lega Italiana Protezione Uccelli) sulla base delle linee guida fornite dalla IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), sul territorio nazionale sono presenti 249 specie aviarie stanziali, il 29,5% delle quali è ritenuto a rischio di estinzione (Peronace *et al.*, 2012).

In Sardegna, vive come nidificante, unico caso in Italia, l'avvoltoio Grifone della specie *Gyps fulvus* (genere *Gyps*) del quale attualmente si contano circa trenta coppie territoriali individui.

La specie ha subito un declino considerevole nell'ultimo secolo; in tre generazioni la popolazione italiana si è ridotta dell'83,6%, passando dai 580 individui stimati nel 1955 ai 95 nel 2005, mentre il numero di coppie è diminuito del 96,9% (Gustin *et al.*, 2009). In poco più di 50 anni gli individui maturi della popolazione italiana sono diventati 5 volte meno rispetto ai primi anni 50' del secolo scorso, situazione allarmante per la propagazione ed il mantenimento della specie.

Sulla base di questi dati, *Gyps fulvus* è stato inserito nella categoria delle specie in Pericolo Critico (CE) che costituiscono il 2,4% di quelle a rischio di estinzione. Allo stesso raggruppamento appartengono altre 5 specie, di cui 3 appartenenti al medesimo ordine degli *Accipitriformes* (Gipeto, Capovaccaio, Aquila di Bonelli) e 2 a quello dei *Passeriformi* (Forapaglie comune, Bigia padovana).

Come proponimento, la presente ricerca mira ad incrementare le conoscenze sulla genetica e sulla storia evolutiva del Grifone sardo mediante la caratterizzazione e l'analisi del DNA mitocondriale (mtDNA), per fornire strumenti utili alla salvaguardia della specie.

In riferimento a questo marcatore, quando la ricerca ha avuto inizio, erano già stati sequenziati i geni per tRNA Gly (AF076359.1) e ND2 (AY987080.1), un tratto della regione di controllo (CR) (DQ908993.1) e dei geni Cyt B (AY987261), COX I (U83772.1) e 12S rRNA (U83718.1). Nel loro insieme questi loci costituiscono circa il 24% dell'intero mitogenoma.

La scelta del marcatore mitocondriale è motivata dal fatto che il mtDNA possiede caratteristiche uniche, non riscontrabili nel DNA nucleare (nDNA), come il tasso di sostituzione molto elevato e l'assenza di ricombinazione, essendo ereditato esclusivamente per via materna. Presenta inoltre una struttura estremamente compatta, ridotte dimensioni che nei vertebrati non superano le 20 mila paia di basi (kb). Lo studio della variabilità a livello di sequenze nucleotidiche e/o proteiche del mtDNA consente di ripercorrere le linee filetiche materne fino all'identificazione di un ipotetico antenato comune, effettuare studi comparativi sulla biodiversità e stimare la distanza genetica sia a livello intraspecifico che intra-genere. Queste peculiarità conferiscono al mitogenoma grande praticità nella manipolazione ed elevato potere risolutivo nello studio delle relazioni filogenetiche tra gruppi di individui, e lo hanno reso negli anni la molecola più utilizzata nelle indagini evolutive.

L'analisi delle mutazioni riscontrate nella regione *D-loop* ha consentito l'identificazione diretta della specie. Tale regione presenta una velocità di sostituzione estremamente elevata, poiché libera da vincoli funzionali, e si presta in maniera ottimale per descrivere le relazioni filogenetiche tra *taxa* strettamente correlati.

I dati di sequenza relativi alla porzione codificante del gene ND2 sono stati invece utilizzati per studiare le relazioni evolutive che intercorrono tra le differenti specie di *Gyps* analizzate, ed effettuate le datazioni molecolari dei principali eventi di speciazione avvenuti all'interno del gruppo.

Considerato che l'areale delle sub-popolazioni selvatiche di Grifone in Italia è limitato attualmente alla sola Sardegna; che tutte le altre colonie presenti sul territorio nazionale sono di più recente introduzione e derivanti da esemplari provenienti da altri areali del mediterraneo, più solidi in termini numerici come quello spagnolo; l'obiettivo finale di questa tesi è

stata la caratterizzazione molecolare del mtDNA di un certo numero di individui sardi per studiare la storia evolutiva della specie, la sua collocazione tassonomica nel genere, lo stato delle popolazioni attualmente nidificanti in Sardegna e i rapporti con altre colonie del bacino del mediterraneo.

Per inquadrare l'argomento in un contesto geograficamente più ampio, che fornisca una panoramica sullo stato delle colonie nidificanti nell'area del bacino del Mediterraneo, sono state analizzate sequenze di campioni provenienti da altre colonie stanziali, come quella spagnola e quella cipriota, quest'ultima strettamente interconnessa da un punto di vista storico con la popolazione di Grifoni residente a Creta.

La raccolta di queste informazioni è ritenuta di estrema utilità per tutelare la variabilità genetica e promuovere la conservazione della specie, simbolo, insieme al Muflone, della fauna selvatica della Sardegna.

I dati ottenuti vanno ad integrarsi con altri raccolti negli anni precedenti dal gruppo di ricerca del tutor sulla variabilità genetica degli ovi-caprini, la cui presenza in Sardegna è storicamente legata alla colonizzazione e alla permanenza del Grifone sull'isola.

2. Introduzione

2.1 Il Grifone

La Sardegna è stata popolata in passato da tre specie di avvoltoi: il Grifone (*Gyps fulvus*), l'Avvoltoio monaco (*Aegypius monachus*) e il Gipeto (*Gypaetus barbatus*). Attualmente solo il Grifone è presente nell'isola grazie alla messa in atto, a partire dagli anni '70 del secolo scorso, di una serie di interventi di salvaguardia, ripopolamento e conservazione.

La specie *Gyps fulvus* appartiene al genere *Gyps*, della famiglia *Accipitridae*. È caratterizzato da una colorazione marrone scuro negli immaturi e marrone tendente al beige negli adulti, la testa e il collo sono nudi ma presentano un caratteristico collare di piumino lanoso con alla base un collare di penne biancastre o marroni, a seconda dell'età dell'esemplare. Ha un'apertura alare di 240-280 cm e lunghezza di circa 100 cm, e un peso compreso tra i 7 ed i 12 kg, fino ad un massimo di 15. Le zampe sono corte e tozze e il becco seppur robusto non è adatto alla caccia (Aresu e Shenk, 2003) (Fig.1).



Figura 1 – Individuo adulto di Grifone sardo (*Gyps fulvus fulvus*)

È un necrofago obbligatorio; la sua alimentazione è composta per la maggior parte di carogne di animali domestici, ma anche di selvatici di piccole dimensioni. Per questa peculiarità svolge un importante ruolo ecologico, contribuendo al mantenimento della pulizia dell'ecosistema.

Il Grifone è una specie sociale che vive in monogamia permanente, raggiunge la maturità sessuale soltanto verso il quinto-sesto anno di vita e ha bisogno di uno stretto contatto tra conspecifici per favorire la selezione sessuale e garantire il successo riproduttivo (Donazar, 1993).

La deposizione dell'unico uovo avviene tra la prima decade di gennaio e la fine di marzo-aprile, con il culmine tra metà gennaio e metà febbraio. Covate sostitutive sono molto rare. L'incubazione dura 48-54 giorni e l'involto del giovane avviene tra la prima decade di luglio e la fine di settembre, dopo una permanenza nel nido di circa 110-120 giorni (Glutz V. Blotzheim *et al.*, 1971; Donazar, 1993; Baumgart, 2001).

I giovani, nei primi mesi successivi al loro involto, dipendono per la loro alimentazione dai genitori ai quali restano legati, talvolta, sino all'inizio del successivo ciclo riproduttivo.

L'*habitat* di nidificazione del Grifone in Sardegna era costituito da aree costiere (da 40 m a 300 m sul livello del mare nel Bosano e nell'Algherese) e da zone di collina e montagna sino a quote di circa 1250 m (Supramonte di Oliena sino agli anni '80 del secolo scorso), generalmente poco antropizzate e ricche di pareti rocciose (rocce vulcaniche, calcarei, graniti, scisti) con terrazze, cenge e cavità. La conformazione geomorfologica e l'esposizione dei siti delle colonie favoriscono lo sviluppo di correnti termiche ascensionali che l'animale sfrutta per prolungate permanenze in volo a quote elevate e con il minimo dispendio energetico (Donazar, 1993).

In Sardegna nidifica in piccole colonie tra 2 e 12 coppie, situate negli ambienti rocciosi con pareti verticali o fortemente inclinate dell'entroterra, e in falesie marittime ricche di cavità, sporgenze e cenge. I due nuclei rimanenti (Bosano e Algherese), dove attualmente la specie si riproduce, sono distanti in linea d'aria circa 40 km (Aresu e Shenk, 2003).

L'areale storico in Sardegna comprendeva intorno agli anni '30 del novecento quasi tutti i sistemi montuosi dell'isola, con una popolazione stimabile in circa 800-1.200 individui, ridotta progressivamente a circa 70 esemplari intorno al 1980, a causa di un complesso di fattori. Tra questi è stato decisivo l'uso di sostanze tossiche, sotto forma di esche avvelenate, nella lotta del pastore-agricoltore contro volpi e cani randagi (Schenk, 1976;

1986). La specie si è estinta nella Sardegna centro-orientale nella prima metà degli anni '80 del secolo scorso.

Grazie ai programmi di conservazione e ripopolamento con animali di provenienza spagnola e francese, appartenenti alla stessa sottospecie *Gyps fulvus fulvus* presente in Sardegna, alla fine del 1996 la popolazione sarda ha raggiunto il numero di 42 coppie territoriali con circa 125 individui, concentrati nel settore nord-occidentale dell'isola (Schenk *et al.*, 1992; Hablitzl, 1783; Aresu *et al.* 1997).

Negli ultimi 10 anni la situazione è diventata nuovamente critica: dalle 42 coppie presenti nel 1997 si è passati a 28 nel 1998 e a 23 nel 1999, di cui 19 nel Bosano e 4 nell'Algherese. Tra il 2000 e il 2006 è stata registrata una buona ripresa nel Bosano, con 30 coppie territoriali, mentre nell'Algherese si è verificato un ulteriore tracollo facendo registrare soltanto la presenza di 1-2 coppie. Tra luglio 2006 e aprile 2007 sono venuti a mancare nel Bosano 10-11 coppie territoriali e un totale di 35-40 esemplari. Molto probabilmente anche questa consistente perdita d'individui va attribuita ad avvelenamenti e/o intossicazioni.

Attualmente sono presenti in Sardegna, come unica colonia naturale d'Italia, circa 30 coppie territoriali e 18 *juvenilis*, distribuiti esclusivamente nei territori tra Bosa, Montresta (NU), Villanova Monteleone (SS) e lungo la costa alta dell'Algherese, valori che corrispondono alla situazione di circa 20 anni fa (Schenk *et al.* 2007).

Le cause principali di questa drastica riduzione sono rappresentate da disturbi antropici diretti e indiretti, nello specifico l'uso di bocconi avvelenati, utilizzati illegalmente per il controllo della popolazione di volpi e cani randagi, e di insetticidi contro specie infestanti come cavallette e zanzare. Altri componenti importanti sono le modificazioni dell'habitat e la diminuzione del tasso di mortalità di animali domestici, come conseguenza del miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie nel settore zootecnico e della riduzione della pastorizia allo stato brado (Aresu *et al.* 2003).

Un'altra minaccia è costituita dalla recente diffusione di farmaci in zootecnia, in particolare degli antinfiammatori non steroidei (FANS) contenenti il principio attivo del *diclofenac*, risultato mortale per gli

avvoltoi. Nel subcontinente indiano le tre specie di avvoltoi più diffuse (*Gyps bengalensis*, *Gyps indicus*, *Gyps tenuirostris*) hanno subito un calo demografico sino al 95% a partire dagli anni '90 del secolo scorso, proprio a causa del *diclofenac* utilizzato per la cura di bufali e capre in allevamenti intensivi (Risebrough *et al.*, 2004; Rhys Green *et al.*, 2004).

Il rischio di declino e di estinzione di popolazioni di avvoltoi nel sud asiatico ha attivato diverse iniziative di conservazione da parte di organizzazioni non governative in alcuni paesi asiatici (*Asian Vulture Population Project*, 2004; *Wildlife Conservation Society Cambodia et al.*, 2005; *Ministry of Environment & Forests, Government of India*, 2006). Analoghi problemi, attribuibili al *diclofenac*, potrebbero verificarsi anche per *Gyps africanus* (Oaks *et al.*, 2004).

Tra le cause dirette, invece, è possibile annoverare la caccia indiscriminata da parte di bracconieri e collezionisti di trofei e uova, il clamore delle battute di caccia, l'escursionismo e la caccia fotografica nelle vicinanze dei nidi. I disturbi, spesso favoriti da pubblicazioni sull'esatta ubicazione dei siti di nidificazione, costituiscono motivo di abbandono temporaneo della covata (uovo e/o *pullus*) che diventa facile preda dei Corvi imperiali; continui disturbi di carattere antropico hanno determinato in Sardegna l'abbandono di colonie nidificanti e di singoli nidi.

Anche la crescita abnorme delle infrastrutture eoliche che ha interessato l'Europa, in modo particolare l'Italia meridionale e la penisola iberica, dagli inizi dello scorso secolo, ha determinato un impatto negativo sull'avifauna ed in particolare sui grandi rapaci come il Grifone.

Recenti studi condotti in Spagna sull'impatto eolico hanno evidenziato come la specie *Gyps fulvus* risulti in media maggiormente esposta a questo pericolo rispetto alle altre; si parla infatti di 1,33 morti per turbina ogni anno contro gli 0,41 riferiti a tutte le altre specie di rapaci (Ferrer *et al.*, 2011). Questa forte diversità nella mortalità può essere attribuita alla differente probabilità di collisione che dipende da fattori come la lunghezza delle ali tipica dei grandi uccelli, il comportamento in volo e le condizioni meteorologiche nei dintorni delle turbine eoliche (de Lucas *et al.*, 2008). Dopo consistenti riduzioni del numero delle coppie, già dalla metà degli

anni '70, il WWF ha finanziato dei programmi di conservazione dei rapaci che prevedevano la costruzione di carnai per evitare l'ingestione di bocconi avvelenati o altre sostanze tossiche propagate lungo la catena alimentare. È stata anche promossa una campagna di sensibilizzazione dell'opinione pubblica locale; questi interventi sono stati utili per ridurre almeno in parte il calo della specie. Nel 2013 è stato registrato un successo riproduttivo con un indice dell'85% che non si osservava dal 2005. Il motivo di questo aumento potrebbe essere in parte attribuibile al maltempo, che ha limitato le attività causa di disturbo e che si ripercuotevano in maniera negativa sulla riproduzione.

2.2 DNA mitocondriale

2.2.1 Struttura e funzioni

Il mtDNA è una molecola a doppio filamento, superavvolta e a struttura circolare (Fig. 2).

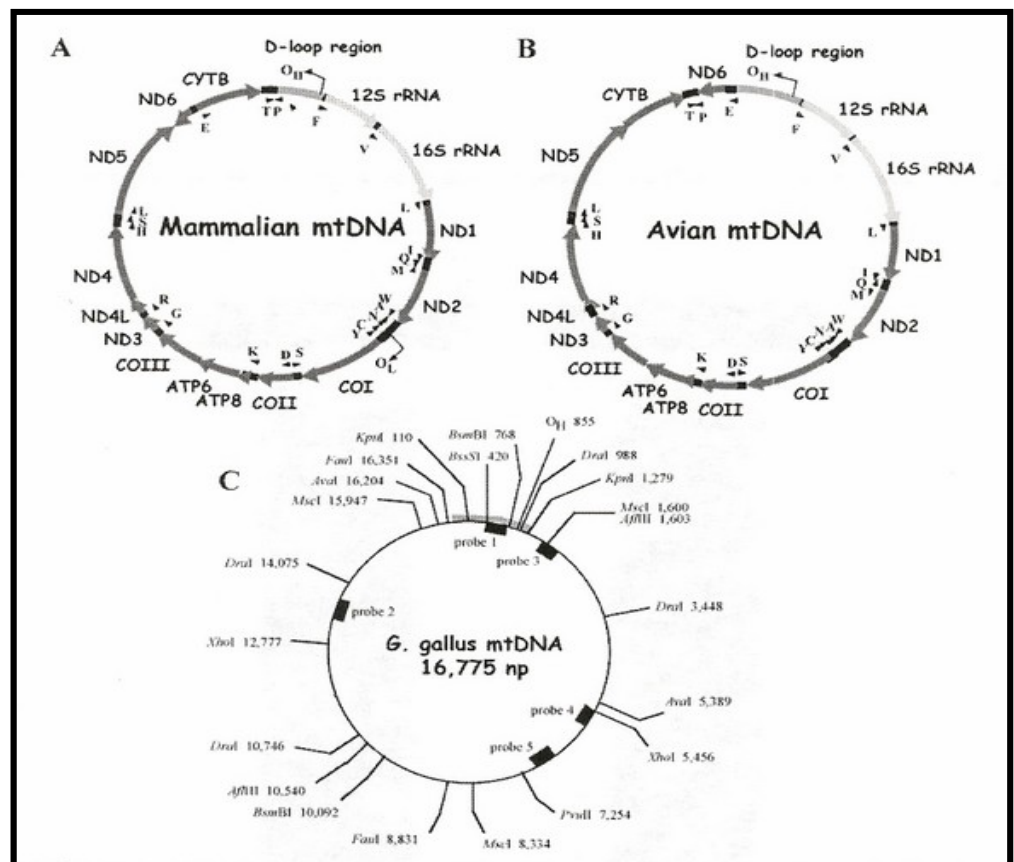


Figura 2 - Organizzazione del genoma mitocondriale

Luca Decandia

Studio della variabilità genetica nel Grifone Sardo (*Gyps fulvus*) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale
 Tesi di dottorato in International PhD school in Biomolecular and Biotechnological Sciences (Biochemistry, Physiology and Molecular Biology). Università degli Studi di Sassari

La molecola nei vertebrati ha una lunghezza media di circa 18 kb ed ha un contenuto in G+C che varia dal 36% al 44%.

I due filamenti hanno una diversa composizione in basi: il filamento pesante (H-heavy) è più ricco di guanine, il filamento leggero (L-light) di citosine.

Viene ereditato dalla progenie esclusivamente per via materna e non è sottoposto a fenomeni di ricombinazione genica; per questa ragione è ideale per investigare rapporti antenato/discendenti mediante la stima della distanza genetica non solo tra specie diverse ma anche all'interno della stessa specie (Pereira, 2000).

La sintesi dei due filamenti è unidirezionale e ha origine da punti specifici. L'origine della sintesi del filamento H si trova nell'ansa D e, solo dopo che il filamento H è stato sintetizzato per due terzi della sua lunghezza usando come stampo il filamento L, si ha il dislocamento del vecchio filamento H e si ha accesso all'origine di replicazione del filamento L, la cui sintesi avviene in direzione opposta (Clayton, 1992).

Una piccola porzione del DNA è caratterizzata da una struttura a tripla elica, *D-loop*, poiché un breve segmento del filamento H viene replicato una seconda volta. Questa regione contiene anche il promotore per la trascrizione dei due filamenti.

Presenta una sola regione non codificante, la CR o *D-loop*, mentre le altre regioni costituiscono 37 geni di cui: 22 codificano per tRNA, 2 per rRNA e 13 codificano per proteine. Sono tutti geni privi di introni, strettamente impaccati e presentano regioni di sovrapposizione. Le sequenze codificanti di alcuni geni, in modo particolare ATPASI6 e ATPASI8, mostrano una certa sovrapposizione; nella maggior parte degli altri casi, le sequenze codificanti di geni vicini sono contigue o separate da una o due basi non codificanti. Nonostante sia geneticamente conservato, l'ordine dei geni all'interno del mtDNA ha dimostrato di variare tra i differenti *taxa* (Saccone *et al.*, 2000).

I geni che codificano per proteine vanno a costituire le subunità dei complessi enzimatici multimerici del mitocondrio. Questi complessi fanno parte della catena di trasferimento degli elettroni associato alla formazione

di un gradiente protonico transmembrana, che genera l'energia elettrochimica necessaria per la produzione di ATP nella fosforilazione ossidativa.

I geni ND1, ND2, ND3, ND4, ND4l, ND5 e ND6 vanno a codificare per le subunità della *NADH deidrogenasi*. I polipeptidi derivati dai geni CO1, CO2 e CO3 costituiscono altrettante subunità del IV complesso *citocromo c ossidasi*. Le ATPASI6 e ATPASI8 vanno a far parte del complesso V *ATP sintasi*. Il gene Cytb codifica per una delle subunità del III complesso *citocromo B*.

Le analisi condotte sul mtDNA degli uccelli hanno permesso di identificare differenze nell'organizzazione strutturale delle regioni fiancheggianti la CR, rispetto ai mammiferi. Infatti, mentre in questi ultimi il D-loop è collocato tra 2 geni per tRNA (Phe e Pro), negli uccelli è fiancheggiato da geni codificanti per proteine; questa caratteristica strutturale, esclusiva della classe, rafforza la sua già accertata origine monofiletica (Desjardins *et al.*, 1990).

Negli uccelli sono stati osservati diversi riarrangiamenti nell'ordine dei geni, tra cui il probabile ordine ancestrale ritrovato per la prima volta nel pollo (*Gallus gallus*), che corrisponde a Cytb - tRNA^{Thr} - tRNA^{Pro} - ND6 - tRNA^{Glu} - CR - tRNA^{Phe} - rRNA 12S (Desjardins e Morais, 1990).

È stata osservata una configurazione che passa da 'CR - tRNA^{Pro} - tRNA^{Thr} - Cytb - tRNA^{Glu} - ND6 - ND5' a 'CR - tRNA^{Glu} - ND6 - tRNA^{Pro} - tRNA^{Thr} - Cytb - ND5', e l'ordine alternativo dei geni 'Cytb - tRNA^{Thr} - CR - tRNA^{Pro} - ND6 - tRNA^{Glu} - Control Region 2 - tRNA^{Phe} - rRNA 12S' (Gibb *et al.*, 2007) (Mindell *et al.*, 1998). In ogni caso, è stato evidenziato come l'ordine alternativo dei geni possa essere comparso in maniera indipendente all'interno della classe degli *Aves*. Questi eventi evolutivi risalirebbe al periodo in cui è avvenuta la separazione fra uccelli e coccodrilli, datata 254 milioni di anni fa (MYA) (Janke e Arnason, 1997). (Fig.2)

2.2.2 Control Region

Il D-loop è la parte più variabile del mtDNA, probabilmente a causa della mancanza di vincoli dovuti alla codifica di prodotti funzionali

(Crochet, 2000). È pertanto frequentemente usata negli studi di popolazione per la sua alta variabilità, mentre geni codificanti proteine, come il Cytb, sono generalmente utilizzati per l'analisi filogenetica dei *taxa* a livello delle specie (Pereira, 2000).

Una delle caratteristiche principali di questa regione negli avvoltoi è la sua lunghezza dovuta alla presenza di regioni ripetute in tandem: la lunghezza varia fra individui di specie diversa e della stessa specie e addirittura, in uno stesso individuo è possibile la coesistenza di differenti assetti, fenomeno conosciuto come eteroplasmia (Roques *et al.*, 2004).

L'organizzazione generale della CR negli avvoltoi è molto simile a quella degli altri uccelli e dei mammiferi. Può essere divisa in tre domini: due domini laterali, noti come regioni ipervariabili (HV) I e II, centrale (C).

HVI è la regione con il tasso di sostituzione più elevato di tutto il mtDNA, mentre C è una delle regioni più conservate. I domini I e II, che contengono i principali elementi regolatori come i promotori della replicazione per l'elica L e H e i blocchi di sequenze conservate, evolvono rapidamente in maniera specie-specifica generando eterogeneità sia nella lunghezza che nella composizione di basi (Baker and Marshall 1997; Saccone *et al.*, 1993).

In corrispondenza delle due HV sono stati individuati blocchi di sequenze conservate, denominati CSB (*conserved sequence box*) e TAS (*termination associated sequence*).

L'analisi comparativa della composizione in nucleotidi (nt) tra CR e porzione codificante, ha evidenziato nel D-loop una maggior frequenza della coppia A + T rispetto a G + C; il dominio C è ricco in C-T mentre il HVII ne è povero, con un'alta percentuale di nucleotidi A-T (Baker e Marshall, 1997).

Nella porzione terminale al 5' di HVI è presente una sequenza interrotta di poli-C, caratteristica che si conserva in molte specie. Sebbene sia potenzialmente in grado di formare una struttura a forcina stabile, la sua funzione non è stata mai determinata. In questo dominio sono stati inoltre identificati due lunghi blocchi conservati, ETAS1 ed ETAS2, potenzialmente coinvolti nel controllo della sintesi del filamento H.

Nonostante la sequenza ETAS1 sia comune in molte specie di vertebrati (Sbisà *et al.*, 1997), le regioni conservate ETAS2, CSB2 e CSB3 risultano assenti in molte di loro.

2.3 Analisi filogenetica

L'analisi filogenetica rappresenta lo studio delle relazioni evolutive tra gli organismi e la loro classificazione in base alle specie di appartenenza. Ad esempio, specie che esibiscono a livello molecolare un elevato grado di similarità sono, in linea generale, accomunate da un più elevato rapporto di parentela. Viceversa, due organismi sono tanto più dissimili quanto maggiore è il tempo di divergenza dal loro comune progenitore.

L'evoluzione molecolare studia la velocità e i tipi di cambiamenti che hanno luogo nel materiale genetico e nei suoi prodotti, attraverso il confronto della struttura primaria di acidi nucleici e proteine. Il numero di differenze accumulate nel corso dell'evoluzione tra due sequenze omologhe, durante il tempo che le separa dal loro progenitore comune, esprime la distanza genetica, valore che viene normalizzato relativamente alla diversa lunghezza delle sequenze prese in esame, esprimendola come numero di sostituzioni per sito.

Il calcolo della distanza genetica tra coppie di sequenze si esegue impiegando differenti modelli matematici, che si basano su assunzioni comuni, quali il modo di evoluzione dei siti e la probabilità che una determinata sostituzione accada, la probabilità con cui avvengono le mutazioni in ciascun sito e la composizione nucleotidica delle sequenze oggetto di studio.

Nel 1965 Zuckerkandl e Pauling dimostrarono per la prima volta che le proteine evolvono in maniera proporzionale alla distanza evolutiva degli organismi a cui appartengono; in altre parole si comportano come “orologi molecolari”. La scoperta dell'orologio molecolare segna una data molto importante per gli studi di evoluzione, permettendo di misurare la distanza evolutiva tra gli organismi viventi e offrendo nuovi strumenti per lo studio dell'evoluzione biologica.

Le relazioni evolutive tra gli organismi sono illustrate mediante rappresentazioni grafiche, gli alberi filogenetici, in modo da connetterle attraverso la ricerca di un comune antenato, come nel caso delle specie o di più elevati raggruppamenti tassonomici (Gregory, 2008).

Un albero filogenetico è un grafo costituito da nodi e rami. I nodi rappresentano le unità tassonomiche e i rami definiscono le relazioni tra queste in termini di discendenza e di progenitore. I nodi interni rappresentano i progenitori, quelli esterni le specie attuali da essi originatesi; queste ultime vengono definite unità tassonomiche operative o OTUs (*operational taxonomic units*).

La lunghezza dei rami, in un albero elaborato sotto assunzione dell'orologio molecolare, rappresenta il numero di mutazioni che hanno avuto luogo nel corso dell'evoluzione.

Gli alberi filogenetici possono essere rappresentati con o senza radice.

In un albero con radice esiste un nodo particolare, detto radice, da cui un percorso univoco conduce a tutti gli altri nodi. La lunghezza del percorso è pari al tempo evolutivo e la radice è l'antenato comune di tutte le OTUs descritte nell'albero.

Un albero senza radice descrive esclusivamente le relazioni evolutive tra le OTUs considerate senza fornire alcuna informazione sul percorso evolutivo in funzione del tempo. Solitamente gli alberi sono prodotti con radice quando si assume valida l'ipotesi dell'orologio molecolare mentre, supponendo una differente velocità lungo i rami dell'albero, si usano modelli matematici che producono alberi senza radice. L'impiego di un *outgroup*, cioè una specie esterna al gruppo che si è con certezza separata per prima dalle altre oggetto di studio, determina l'assegnazione della radice agli alberi che ne sono privi. I metodi per la determinazione degli alberi filogenetici possono essere classificati in due soli tipi principali: metodi basati sulla matrice delle distanze e metodi di massima parsimonia.

I metodi basati sulla matrice delle distanze, calcolano le distanze evolutive (solitamente il numero di sostituzioni nucleotidiche o amminoacidiche). La matrice delle distanze risultante viene successivamente utilizzata per la determinazione dell'albero filogenetico.

Tra quelli proposti per la determinazione di un albero filogenetico a partire dalla matrice delle distanze il più utilizzato è il metodo del *Neighbor-Joining* che consente di ottenere un albero senza radice ammettendo che la velocità di sostituzione nucleotidica possa variare lungo i rami dell'albero (Saitou e Nei, 1987).

Il metodo del *Neighbor-Joining* ricostruisce un albero filogenetico a partire dalla matrice delle distanze genetiche calcolate per tutte le possibili coppie di OTUs in esame. Il punto di partenza è la creazione di un albero a stella, nel quale tutte le specie discendono da un unico nodo centrale; in seguito, sono ricercati sequenzialmente i vicini (*neighbor*) che minimizzano la lunghezza totale dei rami. Il principio del metodo si basa sull'individuazione dell'albero senza radice che minimizzi la somma delle lunghezze dei vari rami.

Tra i metodi di calcolo basati sull'analisi dello stato dei caratteri (sequenze) osservato in un gruppo di OTUs, invece, quello più utilizzato è l'approccio di massima verosimiglianza (Maximum-likelihood),

Al fine di valutare la significatività delle misure effettuate attraverso i vari metodi per lo studio dell'evoluzione molecolare viene solitamente utilizzata la metodologia di simulazione denominata *bootstrap* (Felsenstein, 1985). L'analisi delle sequenze di *bootstrap* consiste nell'effettuare un certo numero di ricampionamenti del multi-allineamento estraendone a caso i siti.

Una volta che si è determinato l'albero filogenetico, affinché si possano stimare i tempi di divergenza è necessario che sia valida l'assunzione dell'orologio molecolare, ovvero che la velocità di sostituzione nucleotidica sia costante lungo tutti i rami dell'albero per i siti in esame; sia noto il tempo di divergenza tra almeno una coppia di OTUs presenti nell'albero (ad esempio da stime paleontologiche) oppure sia nota la velocità di sostituzione nucleotidica.

2.4 Network

Un network filogenetico, in linea generale, può essere definito come un grafico utilizzato per rappresentare relazioni evolutive (sia in maniera astratta o esplicita) di un insieme di *taxa*. I network filogenetici possono

essere utilizzati in due modi: possono essere impiegati come uno strumento per la visualizzazione ottimale di dataset altrimenti incompatibili, nel qual caso si parla di un network astratto; oppure, possono essere utilizzati per la rappresentazione di una presunta storia evolutiva che coinvolge eventi reticolati, nel qual caso il network è definito esplicito (Huson *et al.*, 2011).

Per definizione, la maggior parte (se non tutti) i tipi di network filogenetici senza radice sono astratti. Tuttavia, i network con radice possono essere sia astratti che espliciti, a seconda di come vengano costruiti e interpretati. Possono essere calcolati impiegando una vasta gamma di dati, come allineamenti di sequenza multipli o matrici della distanza.

Come per gli alberi filogenetici, la costruzione di un network prevede l'applicazione di differenti metodi.

Il metodo del *minimum spanning network*, basato sui caratteri e utilizzabile per l'analisi aplo-tipica, prevede il confronto di sequenze, sulle quali viene costruita una matrice in cui sono indicati i punti di mutazione che separano un aplotipo dall'altro. Si parte raggruppando i *taxa* che sono accomunati dal numero di mutazioni minore fino a creare una struttura che comprenda tutti i *taxa* analizzati.

Il metodo *median network* prevede l'introduzione d'ipotetici nodi ancestrali ed è adatto per dataset che presentano una variabilità bassa, utilizzati principalmente nelle analisi popolazionistiche e filogeografiche. Poiché in questo tipo di network le mutazioni parallele possono portare a strutture complesse, è stato introdotto il concetto del *reduced median network*, con il quale si cerca di semplificare la rete assumendo appropriati eventi mutazionali paralleli.

Anche il metodo *median joining* (MJ) è adatto per le sequenze strettamente correlate, evolute senza ricombinazioni, ed è ampiamente utilizzato negli studi filogeografici e di popolazione, di solito basati sull'utilizzo dell'mtDNA (Huson *et al.*, 2011). Il metodo di MJ inizia con alberi di ampiezza minima, il tutto combinato in un unico network reticolato. Puntando alla parsimonia, sono aggiunte in seguito alcune sequenze consenso, chiamate *median vectors*, considerando tre sequenze tra loro vicine alla volta. Questi *median vectors* possono essere biologicamente

interpretati come sequenze non campionate eventualmente esistenti o sequenze ancestrali ormai estinte (Bandelt *et al.*, 1999).

3. Materiali e metodi

Il campionamento effettuato ha permesso di raccogliere complessivamente materiale biologico (piume, tessuto, sangue, DNA) da 24 esemplari di *Gyps fulvus fulvus*, così suddivisi in base alla provenienza geografica: 20 sardi, di cui 1 museale, 1 spagnolo e 3 ciprioti.

E' stato prelevato circa 1 ml di sangue intero da 19 grifoni sardi. Gli animali si trovavano presso il Centro di Recupero Fauna di Bonassai, situato in agro di Olmedo (SS), dove erano stati ricoverati in seguito a lesioni, ferite o traumi accidentali di varia natura.

Sull'esemplare museale è stata invece eseguita mediante bisturi la rimozione di una piccola sezione di tessuto, limitata ad un'area di circa 3-4 mm² e non più spessa di 1, da uno dei cuscinetti carnosì. L'animale fu abbattuto nei primi anni '70 del secolo scorso, prima del ripopolamento con esemplari spagnoli, ed è oggi custodito presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari.

Dell'unico individuo proveniente dalla Spagna era già disponibile, al momento del campionamento, il DNA genomico, precedentemente estratto da sangue intero dalla Dott.ssa Valentina Satta (Dipartimento di Medicina Veterinaria – Università di Sassari).

Per quanto riguarda gli esemplari ciprioti, sono state prelevate dalla zona toracica piume appartenenti a 3 individui, un giovane e due adulti, tenuti in cattività presso lo "Zoo Garden" di Limassol (Cipro).

Il reperimento dei campioni è stato reso possibile grazie alla collaborazione in atto con i Professori Salvatore Naitana e Giovanni Leoni, del Dipartimento Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Sassari, e con il Dott. Elephterios Hadjisterkotis, del Ministry of the Interior (Republic of Cyprus), avente sede a Nicosia.

3.1 Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato isolato e purificato mediante differenti metodiche a seconda del tessuto di partenza di cui si disponeva:

1. applicazione della procedura descritta da Sambrook *et al*, (1989), che prevede l'impiego di solventi organici (Fenolo/Cloroformio) per l'allontanamento dei contaminanti, sui campioni di sangue intero.

Dato che i globuli rossi degli uccelli sono nucleati, il protocollo è stato ottimizzato con alcune modifiche che garantissero un miglioramento in termini di resa e qualità finale del DNA estratto. Il materiale di partenza era costituito dalla sola frazione dei globuli rossi. Sono state allestite aliquote di 5 µl a cui sono stati aggiunti 200 µl di proteinasi K (10 mg/ml) in SDS e 500 µl di *Lysis buffer* (10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% SDS). Le varie aliquote sono state incubate a 37°C over night e in seguito divise in tre frazioni a cui sono stati aggiunti due volumi di *Lysis buffer* e un volume di fenolo-cloroformio-isoamilalcol (25:24:1). La soluzione è stata resa omogenea agitando i campioni per inversione e mediante vortex.

I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione per 5' a 14000 rpm. In questo modo è stato possibile separare due fasi: una acquosa contenente il DNA e una fenolica contenente le proteine. La fase acquosa è stata prelevata e trattata con un pari volume di fenolo ed è stato poi ripetuto il passaggio in centrifuga a 14000 rpm per 5'.

Si è quindi proceduto con due lavaggi, il primo in etanolo 100% per favorire la precipitazione del DNA, ed un secondo con etanolo 70% per reidratarlo gradualmente. Nell'ordine si sono aggiunti due volumi di etanolo al 100%, con passaggio in centrifuga per 10' a 14000 rpm. Allontanato l'etanolo per svuotamento, il pellet è stato risospeso in 500 µl di etanolo 70% e sottoposto a centrifuga per 10' a 14000 rpm. L'etanolo è stato allontanato e il pellet di DNA è stato risospeso in TE 1X;

2. Forensic Kit (INVITROGEN), basato sull'impiego di microsferre magnetiche capaci di variare la carica a seconda del pH del mezzo in cui sono sospese, per l'estrazione da tessuto;

3. GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma - Aldrich), basato sull'utilizzo di particolari colonnine da centrifuga, *spin columns*, costituite da una membrana filtrante in grado di adsorbire il DNA e lasciar

eluire gli elementi contaminanti presenti, per isolare il materiale genetico dalle piume.

Il controllo del DNA estratto è stato effettuato mediante due letture spettrofotometriche: a 260 nm per verificare la concentrazione del DNA in soluzione e a 280 nm per valutare il picco d'assorbimento delle proteine. L'analisi è stata condotta utilizzando lo strumento ND-8000 (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE).

Per consentire una stima della purezza dell'eluato si calcola il rapporto $A_{260/280}$, valori compresi tra 1,5 e 1,9 permettono di escludere un'eventuale contaminazione da proteine.

Un ulteriore controllo della purezza viene attuato mediante il calcolo del rapporto $A_{260/230}$. Contaminanti come il fenolo assorbono alla lunghezza d'onda di 230. Un valore compreso tra 2,0 e 2,2 garantisce la purezza del campione, valori inferiori indicano invece la presenza di sostanze contaminanti. Dopo aver calcolato la concentrazione, 1 μ l di ciascuna soluzione di DNA è stato sottoposto ad elettroforesi su gel d'agaroso allo 0,8% in tampone TBE 1X (89 mM TRIS, 89 mM acido borico, 2,5 mM Na₂EDTA a pH 8,3). Tale procedura, comunemente nota come "sizing", consente di verificare l'integrità della molecola mediante visualizzazione sul gel di un'unica banda compatta al termine della corsa.

3.2 Amplificazione tramite PCR del DNA

Per le reazioni di amplificazione è stata utilizzata la seguente miscela: Tampone 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, BSA 0,2 mg/ml, Primer 0,2 μ M ciascuno, DNA 0,3 μ g, Taq DNA polimerasi 2 U (Gene Spin Taq Pol), H₂O fino ad un volume finale di 50 μ l.

L'amplificazione ed il sequenziamento del mitogenoma di *Gyps fulvus* ha richiesto l'utilizzo di 31 coppie di primer (Tab. 1). Inizialmente, in assenza di sequenze specifiche sono stati impiegati primer degenerati, la cui sequenza è indicata nei lavori di Sorenson e collaboratori (1998 e 2003), mentre le altre coppie sono state disegnate su sequenza specifica, ottenuta dopo sequenziamento nucleotidico, mediante ausilio del software web-primer (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>).

Tabella 1 – Coppie di primer impiegate e strategie di amplificazione

REGIONE	PRIMER	POSIZIONE PRIMER FORWARD	POSIZIONE PRIMER REVERSE	SEQUENZA PRIMER FORWARD (5' → 3')	SEQUENZA PRIMER REVERSE (5 → 3')	PROFILI TERMICI (35 CICLI)
tRNA-Phe/rRNA 12S	L1263 H1859	Dal nt 19 al nt 34	Dal nt 632 al nt 655	YAAAGCATGRCACTGAA	TCGDTTRYAGRACAGGCTCCTCTA	95°50" 61°50" 72°1' (35 cicli)
rRNA 12 S/tRNA- Val	L1754 H2294	Dal nt 507 al nt 528	Dal nt 507 al nt 528	TGGGATTAGATACCCCACTATG	TYTCAGGYGTARGCTGARTGCTT	95°50" 65°50" 72°1' (35 cicli)
tRNA-Val/rRNA 16S	L2260 H2891	Dal nt 1003 al nt 1025	Dal nt 1645 al nt 1666	CAWGGTAAGYRTACYGGAARGTG	TGRTGGCTGCTTDARGGCCHAC	95°50" 67°50" 72°1' (35 cicli)
rRNA 16S	L2725 H3292	Dal nt 1467 al nt 1485	Dal nt 2038 al nt 2059	CGAGCYKGGTGATAGCTGG	TGATTRYGCTACCTTYGCACGG	95°50" 67°50" 72°1' (35 cicli)
rRNA 16S	L3218 H3784	Dal nt 1945 al nt 1968	Dal nt 2529 al nt 2548	CGMCTGTTTACAAAAACATMRCC	CGGTCTGAACTCAGATCACG	95°50" 65°50" 72°1' (35 cicli)
tRNA-Leu/ND1	L3722 H4170	Dal nt 2445 al nt 2465	Dal nt 2913 al nt 2935	GGTTTACGACCTCGATGTTGG	CCWACNAYRTDGGNCCYTTDCG	95°50" 60°50" 72°1' (35 cicli)
ND1	606F 606R	Dal nt 2764 al nt 2784	Dal nt 3349 al nt 3369	TTCAAATCCTCTCCCTAGCCC	ATCATATCATTGTGAGGGGCC	95°50" 60°50" 72°1' (35 cicli)
ND1/tRNA- Ile/tRNA-Gln	L4500 H5201	Dal nt 3222 al nt 3243	Dal nt 3915 al nt 3934	GTNGCMCAAACNATYTCHTAYGAAG	CCATCATTTTCGGGGTATGG	95°50" 63°50" 72°1' (35 cicli)
tRNA-Gln/ND2	L5143 H5766	Dal nt 3871 al nt 3895	Dal nt 4518 al nt 4541	GAACCTACACARAAGRGATCAAAAC	GGATGAGAAGGCTAGGATTTKCG	95°50" 62°50" 72°1' (15 cicli) 95°50" 59°50" 72°1' (20 cicli)

Luca Decandia

Studio della variabilità genetica nel Grifone Sardo (Gyps fulvus) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale

Tesi di dottorato in International PhD school in Biomolecular and Biotechnological Sciences (Biochemistry, Physiology and Molecular Biology). Università degli Studi di Sassari

REGIONE	PRIMER	POSIZIONE PRIMER FORWARD	POSIZIONE PRIMER REVERSE	SEQUENZA PRIMER FORWARD (5' → 3')	SEQUENZA PRIMER REVERSE (5 → 3')	PROFILI TERMICI (35 CICLI)
ND2	L5758 H6313	Dal nt al nt	Dal nt 5067 al nt 5089	GGCTGAATRGGMCTNAAYCARAC	CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC	95°50'' 58°50" 72°1' (15 cicli) 95°50'' 55°50" 72°1' (20 cicli)
ND2/tRNA-Trp- Ala-Asn-Cys- Tyr/CO1	985F 985R	Dal nt 4949 al nt 4968	Dal nt 5915 al nt 5933	ATCAACAAGCATCACAAACCG	TATTGGGAGAGGGCAGGTG	95°50" 59°50" 72°1' (35 cicli)
CO1	L7036 H7548	Dal nt 5764 al nt 5786	Dal nt 6301 al nt 6323	GGNACNGGNTGAACHGTNTAYCC	GTDGCNGANGTRAARTADGCTCG	95°50" 62°50" 72°1' (35 cicli)
CO1	744F 744R	Dal nt 6231 al nt 6252	Dal nt 6955 al nt 6976	CCATTGGATTCTAGGCTTCA	TTGAAACCAGTGTACGGAGGT	95°50" 59°50" 72°1' (35 cicli)
COx1/tRNA-Ser- Asp/CO2	L7987 H8628	Dal nt 6718 al nt 6740	Dal nt 7333 al nt 7358	TCHGAYTAYCCWGAYGCNTAYAC	TCRTAGSTTCARTATCAYTGRIGNCC	95°50" 60°50" 72°1' (35 cicli)
CO2	L8386 H9235	Dal nt 7119 al nt 7141	Dal nt 7943 al nt 7967	GCNTCVTCNCCHATYATRGAAGA	TCRAAGAAGCTTAGGTTTCATGGTCA	95°50" 57°50" 72°1' (35 cicli)
tRNA- Lys/ATP8/ATP6	L8929 H9726	Dal nt 7662 al nt 7684	Dal nt 8486 al nt 8508	GGHCARTGYTCAGARATYTYGYGG	AGRTGNCCDGCTGTDAGRTTNGC	95°50" 60°50" 72°1' (35 cicli)
ATP6/CO3/tRNA- Gly	1172F 1172R	Dal nt 8394 al nt 8414	Dal nt 9545 al nt 9565	AAGGCACCCCAACACCTCTAA	TAGGGCAAGTGTAAGGTGAC	95°50" 58°50" 72°1' (35 cicli)

Luca Decandia

Studio della variabilità genetica nel Grifone Sardo (Gyps fulvus) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale

Tesi di dottorato in International PhD school in Biomolecular and Biotechnological Sciences (Biochemistry, Physiology and Molecular Biology). Università degli Studi di Sassari

REGIONE	PRIMER	POSIZIONE PRIMER FORWARD	POSIZIONE PRIMER REVERSE	SEQUENZA PRIMER FORWARD (5' → 3')	SEQUENZA PRIMER REVERSE (5 → 3')	PROFILI TERMICI (35 CICLI)
tRNA-Gly/ND3	L10635 H11837	Dal nt 9373 al nt 9395	Dal nt 10268 al nt 10290	CAYCAYTTYGGNTTYGAAGCHGC	AGRGTDCGYTCRAATGHRATRTARAA	95°50" 57°50" 72°1' (35 cicli)
ND3/tRNA-Arg/ND4L/ND4	716F 716R (nested)	Dal nt 9760 al nt 9780	Dal nt 10456 al nt 10475	CACTACCATGAGCCATCCAGC	TGAGTGGGGTAGTCAGCAGG	95°50" 60°50" 72°1' (35 cicli)
ND4	L11458 H12344	Dal nt al nt	Dal nt 11007 al nt 11031	TCHACHCGNACNCAYGGYTCHGA	CTATRTGRCTDACDGADGARTADGC	95°50" 57°50" 72°1' (35 cicli)
ND4/tRNA-Hys-Ser-Leu	1010F 1010R	Dal nt 10906 al nt 10925	Dal nt 11895 al nt 11915	CTAAAGCCACGTAGAAGCC	GGGAGGAGAATTGGTATGAGG	95°50" 58°50" 72°1' (35 cicli)
ND5	L12976 H13563	Dal nt 11767 al nt 11791	Dal nt 12334 al nt 12353	CAAGAACTGCTAAYTCYTGCATCTG	TGNAGDGCDCDGTTRTTDGC	95°50" 63°50" 72°1' (35 cicli)
ND5	1810F 1810R	Dal nt 12108 al nt 12130	Dal nt 13969 al nt 13989	CTTCTTTCCCATGCACTATTTCG	GCTAAGGATGTGTCTGCGGTG	95°50" 61°50" 72°1' (35 cicli)
Cytb	L14996 H379	Dal nt 13901 al nt 13923	Dal nt 14264 al nt 14283	ATCTCHGCHTGATGAAAYTTYGG	AGGGTTTGTCCGATGATGG	95°50" 55°50" 72°1' (15 cicli) 95°50" 52°50" 72°1' (20 cicli)

Luca Decandia

Studio della variabilità genetica nel Grifone Sardo (Gyps fulvus) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale

Tesi di dottorato in International PhD school in Biomolecular and Biotechnological Sciences (Biochemistry, Physiology and Molecular Biology). Università degli Studi di Sassari

REGIONE	PRIMER	POSIZIONE PRIMER FORWARD	POSIZIONE PRIMER REVERSE	SEQUENZA PRIMER FORWARD (5' → 3')	SEQUENZA PRIMER REVERSE (5 → 3')	PROFILI TERMICI (35 CICLI)
Cytb	L312	Dal nt	Dal nt	CGTCCTACCATGAGGACAAA	GGGGTGAAGTTTCTGGGTC	95°50'' 57°50" 72°1' (15 cicli)
	H15646	14197 al nt 14216	14558 al nt 14577			
Cytb	L15556	Dal nt	Dal nt	CTGYGACAAAATCCCATTCCA	GCGYTGTTGGAYTTGTGTA	95°50'' 57°50" 72°1' (15 cicli)
	H821	14446 al nt 14466	14724 al nt 14743			
Cytb/tRNA Thr/D-loop 1	636F 636R	Dal nt 14753 al nt 14772	Dal nt 15457 al nt 15477	TTCGACCTCTCTCCCAACT	ATAGATAACCTGGTCCGAGAC	95°50" 56°50" 72°1' (35 cicli)
D-loop 1	598F 598R	Dal nt 15292 al nt 15312	Dal nt 15869 al nt 15889	TGTTCTAAATCTCCCCTCGG	GCAAAACAAAGTGCATCAGTG	95°50" 59°50" 72°1' (35 cicli)
D-loop 1 tRNAPro/ND6	911F 911R	Dal nt 15633 al nt 15654	Dal nt 16473 al nt 16493	GCGCCTCTGGTCTTATAICA	ATGATCTGGTGCTGGTTGTG	95°50" 60°50" 72°1' (35 cicli)
ND6/D-loop 2	2094F 2094R	Dal nt 16576 al nt 16596	Dal nt al nt	CCGCCAATCACCTCAAGCTTC	TGAGGGTGTGGCTGAGCAA	95°50" 61°50" 72°2'30'' (35 cicli)
D-loop 2	1464F 2094R	Dal nt 16912 al nt	Dal nt al nt	AACCATCTACCCCAGACATC	TGAGGGTGTGGCTGAGCAA	

Luca Decandia

Studio della variabilità genetica nel Grifone Sardo (*Gyps fulvus*) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale

Tesi di dottorato in International PhD school in Biomolecular and Biotechnological Sciences (Biochemistry, Physiology and Molecular Biology). Università degli Studi di Sassari

3.2.1 Primer degenerati

I primer degenerati presentano una sequenza che non è determinata univocamente; la miscela è infatti costituita da oligonucleotidi presenti in concentrazione equimolare, la cui sequenza nucleotidica varia in composizione per una o più posizioni. La presenza delle degenerazioni riduce la specificità del primer aumentando quindi le possibilità di appaiamento. Il loro impiego è utile nel momento in cui si studiano sequenze di DNA ignote di un organismo partendo dalla sequenza nota omologa di un altro organismo.

L'utilizzo di un primer che presenta due siti degenerati quattro volte, due siti tre volte oppure tre siti degenerati due volte comporta, per ogni singola reazione di PCR, la presenza di 1152 differenti versioni dello stesso primer (Tab. 2).

Nel primo ciclo di PCR, le molecole di primer che si appaiano perfettamente allo stampo di DNA, o che differiscono al massimo per una o due basi, sono in grado di innescare la reazione di polimerizzazione.

Nei successivi cicli, le molecole di primer che presentano un disappaiamento (*mismatch*) di due, tre o quattro basi risultano comunque in grado di appaiarsi ai prodotti generati nel ciclo precedente. Nelle reazioni di polimerizzazione successive, tutti i primer sono coinvolti nell'amplificazione e nell'ottenimento del prodotto di reazione.

In linea di principio, rispetto ad un primer perfettamente complementare allo stampo, non sembrano esserci riduzioni nella quantità di prodotto di PCR (Sorenson, 2003).

Tabella 2 - Possibili nucleotidi alternativi in posizione degenerata

CODICI IUPAC- NUCLEOTIDI			
R	A o G	N	Qualsiasi base
Y	C o T	B	C o G o T
S	G o T	D	A o G o T
W	A o T	H	A o C o T
K	G o T	V	A o C o G
M	A o C		

I primer specifici, ossia disegnati per complementarità su una sequenza bersaglio, sono certamente utili quando si è già a conoscenza della sequenza stessa, avendo la certezza che questa non differisca tra gli individui o le specie da sequenziare.

Nell'analisi del mtDNA, l'utilizzo di primer degenerati piuttosto che specifici presenta un vantaggio aggiuntivo, in quanto risultano meno soggetti all'appaiamento preferenziale alle copie nucleari del mtDNA o numts (*nuclear copy of mtDNA*). Poiché le copie nucleari mostrano generalmente un tasso di evoluzione più basso rispetto alle sequenze mitocondriali, spesso sono più simili alle sequenze ancestrali se paragonate a quelle di mtDNA attualmente esistenti. L'appaiamento preferenziale dei primer alle sequenze ancestrali nucleari, ed una loro amplificazione, causa un'inclusione non prevista di dati anomali insieme a quelli di origine mitocondriale. Al contrario, i primer degenerati non sono soggetti a questi errori di appaiamento, cosicché le copie più numerose e predominanti nel prodotto finale di PCR possano essere quelle di origine mitocondriale (Sorenson, 2003).

3.3 Controllo e purificazione dei prodotti di PCR

Il controllo del prodotto di PCR è stato eseguito mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,2% in tampone TAE 1X a cui è stato addizionato bromuro di etidio. La corsa è avvenuta a voltaggio costante (75V) in presenza di standard di pesi molecolari (DNA Molecular Weight Marker VI, Roche Diagnostics). Ai 50 µl di amplificato sono stati addizionati 10 µl di *Loading buffer* composto da blu di bromofenolo allo 0,25% e saccarosio al 40% per le loro funzioni di tracciante e addensante rispettivamente.

Le bande d'interesse sono state in seguito tagliate e purificate grazie all'utilizzo di colonnine filtranti DNA extraction kit Montage™ (Millipore), che permettono la separazione dal gel di frammenti nucleotidici compresi tra le 100 e le 10000 basi se sottoposte a centrifugazione ad 8000 rpm per 15 minuti.

3.4 Sequenziamento nucleotidico

Le reazioni di sequenza sono state realizzate utilizzando il kit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 (Applied Biosystems)* basato sul metodo

dei dideossi-ribonucleotidi trifosfati (ddNTP) messo a punto da Sanger e collaboratori (1977).

La miscela di sequenza conteneva 2 μ l di tampone, 2 μ l della miscela BigDye Terminator (DNA polimerasi, dNTPs, ddNTPs marcati con quattro fluorocromi, a differente emissione), 3,2 pmol di primer, 5-40 ng di DNA purificato e H₂O tridistillata fino ad un volume di 20 μ l.

Il file termico impiegato per la reazione prevedeva una denaturazione iniziale a 96°C per 1' e 25 cicli dei seguenti step: 10'' a 96°C, 5'' a 50°C, 4' a 60°C.

I prodotti della reazione di sequenza sono stati addizionati con SDS 0,2% per eliminare eventuali aggregati del *BigDye* e successivamente purificati con l'utilizzo di colonnine *Postreaction Clean-up Columns* (Sigma - Aldrich). Le colonnine consentono l'allontanamento di sali, primer, ddNTPs non incorporati che interferirebbero durante il sequenziamento provocando un eccesso di segnale.

Una volta avvenuta la purificazione, il campione è stato caricato su piastra e aggiunto a formammide in rapporto 1:2, denaturato per 4' a 96°C e infine sottoposto a sequenziamento nucleotidico.

3.5 Analisi dei dati

Il dati grezzi ottenuti dopo sequenziamento sono stati processati mediante il software *Sequencing Analysis 5.2* (*Applied Biosystems*) e gli elettroferogrammi ottenuti sono stati visualizzati con il software FinchTV (<http://www.geospiza.com/finchtv.html>) per verificare la correttezza della chiamata delle basi.

Le sequenze omologhe utilizzate nell'analisi sono state reperite tramite accesso alle banche dati genomiche online utilizzando il software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Il confronto fra le sequenze è stato eseguito mediante impiego del software di allineamento multiplo ClustalX v. 2.1 (Larkin *et al.*, 2007).

Le stime sul numero di siti polimorfici (S), il numero di aplotipi (H), la diversità aplotipica (*h*), la diversità nucleotidica (π), e il numero medio di differenze a coppie (*pairwise differences*, d) sono state ottenute utilizzando il pacchetto software DnaSP 5.10 (Librado *et al.*, 2009).

Luca Decandia

Studio della variabilità genetica nel Grifone Sardo (Gyps fulvus) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale
Tesi di dottorato in International PhD school in Biomolecular and Biotechnological Sciences (Biochemistry, Physiology and Molecular Biology). Università degli Studi di Sassari

La presenza di una struttura genetica all'interno della popolazione è stata determinata con l'algoritmo di clustering basato sul modello Bayesiano implementato in BAPS v5.2 (Corander, 2007).

I modelli di differenziazione genetica a livello di popolazione sono stati valutati con il software Arlequin 3.5.1.3 (Excoiffer *et al.*, 2010), che utilizza una matrice per le distanze genetiche Tamura - Nei (Tamura *et al.*, 1993), impostando un valore di gamma secondo il miglior modello di evoluzione ottenuto con Mega6 (Tamura K. *et al.*, 2013).

Le analisi filogenetiche sono state condotte utilizzando i *tools* bioinformatici Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) e Tree-Puzzle 5.2 (Schmidt *et al.*, 2002).

Le relazioni genetiche tra aplotipi sono state analizzate con il pacchetto software Network 4.5.0.1 (www.fluxus-engineering.com), dotato di implementazioni del metodo *Median Network* e di algoritmi *Median Joining* (MJ).

4. Risultati

4.1 Caratterizzazione strutturale

La ricerca svolta ha consentito di caratterizzare per la prima volta la struttura nucleotidica dell'intero genoma mitocondriale di *Gyps fulvus*. La sequenza completa, di lunghezza pari a 17865 paia di basi (bp), è stata determinata mediante 31 reazioni di amplificazione. Ciascun frammento è stato quindi sottoposto a sequenziamento nucleotidico, impiegando gli stessi primer utilizzati per le PCR (Tab. 1).

L'identificazione strutturale dei singoli geni è stata realizzata attraverso l'allineamento con una sequenza di riferimento di *Aegyptius monachus* (NC_022957.1), appartenente alla famiglia *Accipitridae*. La numerazione adottata è la medesima della sequenza di riferimento, secondo la quale il numero uno è rappresentato dal primo nucleotide del gene tRNA-Phe.

L'intera struttura del mitogenoma è composta da 13 geni codificanti per proteine, 22 tRNA e due rRNA: dei 13 geni codificanti per proteina, dieci iniziano con il codone ATG, uno con GTG (CO1), uno con ATT (ND3) e uno con CTA (ND6). TAA rappresenta il codone di stop maggiormente impiegato; i geni Cytb ed ND6 utilizzano il codone AAT mentre ND4, CO3 ed ND2 terminano, rispettivamente con i codoni TAT, CTT e CCT.

Confrontato con altri genomi mitocondriali animali, anche quello di *Gyps fulvus* presenta due copie del tRNA per la leucina, generate probabilmente in seguito ad un evento di duplicazione in tandem (Higgs *et al.*, 2003).

In accordo con altre specie appartenenti alla famiglia *Accipitridae*, come *Aegyptius monachus* e *Spilornis cheela*, presenta due regioni di controllo, denominate *D-loop 1* e *D-loop 2*. La prima è fiancheggiata dai geni per i tRNA-Thr e tRNA-Pro, mentre la seconda è fiancheggiata a monte dal gene per il tRNA-Glu e a valle dal gene per il tRNA-Phe (Tab. 3)

Tabella 3 - Caratteristiche del genoma mitocondriale di *Gyps fulvus*

GENI	LUNGHEZZA IN BASI	CODONE DI INIZIO	CODONE DI STOP	BASI SPAZIATRICI	DAL NT AL NT
tRNA-Phe	70				1 → 70
rRNA 12S	986				71 → 1056
tRNA-Val	72				1038 → 1109
rRNA 16S	1628			c	1102 → 2729
tRNA-Leu	74			ccatctaca	2710 → 2783
ND1	978	ATG	AGG		2793 → 3770
tRNA-Ile	73			agtcttagcac	3769 → 3841
tRNA-Gln	72				3853 → 3924
tRNA-Met	69				3924 → 3992
ND2	1045	ATG	CCT	ccacct	3993 → 5037
tRNA-Trp	73				5038 → 5110
tRNA-Ala	69			at	5111 → 5179
tRNA-Asn	73			cc	5182 → 5254
tRNA-Cys	67				5257 → 5323
tRNA-Tyr	71			t	5323 → 5393
CO1	1551	GTG	AGG		5395 → 6945
tRNA-Ser	74			taat	6937 → 7010
tRNA-Asp	69			cc	7015 → 7083
CO2	684	ATG	TAA	t	7086 → 7769
tRNA-Lys	71			c	7771 → 7841
ATP8	167	ATG	TAA		7843 → 8009
ATP6	684	ATG	TAA		8000 → 8683
CO3	784	ATG	CTT		8683 → 9446
tRNA-Gly	69				9447 → 9535
ND3	352	ATT	TAA	at	9536 → 9887
tRNA-Arg	69			c	9890 → 9958
ND4L	304	ATG	TAA		9960 → 10263
ND4	1378	ATG	TAT		10257 → 11634
tRNA-His	70			g	11635 → 11704
tRNA-Ser	65			a	11706 → 11771
tRNA-Leu	71				11771 → 11841
ND5	1815	ATG	TAA	at	11842 → 13656
Cytb	1145	ATG	AAT	ct	13802 → 14946
tRNA-Thr	68				14947 → 15014
<i>D-loop 1</i>	1204				15017 → 16220
tRNA-Pro	74			tttttccctccttcttccc ccc	16221 → 16292
ND6	522	CTA	AAT		16315 → 16836
tRNA-Glu	71				16834 → 16904
<i>D-loop 2</i>					16905 → 17865

Luca Decandia

Studio della variabilità genetica nel Grifone Sardo (*Gyps fulvus*) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale
Tesi di dottorato in International PhD school in Biomolecular and Biotechnological Sciences (Biochemistry,
Physiology and Molecular Biology). Università degli Studi di Sassari

4.2 Confronti di sequenza

4.2.1 ND2

L'intera sequenza del gene ND2 di 11 individui sardi è stato amplificato mediante due PCR, che hanno fornito altrettanti frammenti parzialmente sovrapposti. I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio insieme con un marker di pesi molecolari, per valutarne la specificità e la dimensione, che si è rivelata essere, come atteso, di circa 600 bp per ciascun frammento.

Dopo la purificazione da gel, gli amplificati sono stati sequenziati, utilizzando gli stessi primer impiegati per le PCR. Le sovrapposizioni di sequenza tra segmenti contigui hanno permesso di ottenere la struttura nucleotidica completa del gene, che è risultato essere lungo 1045 bp.

4.2.2 Control Region

Le tre reazioni PCR necessarie all'amplificazione del D-loop 1, effettuate su 24 campioni di *G. f. fulvus*, hanno permesso di ottenere altrettanti frammenti, di lunghezza compresa fra le 500 e le 800 bp circa, per un totale di circa 1900 bp, come dedotto dal confronto in elettroforesi con uno standard di pesi molecolari.

Ciascun amplificato è stato quindi sottoposto a sequenziamento nucleotidico, utilizzando gli stessi primer impiegati per l'amplificazione. Le sovrapposizioni di sequenza tra segmenti contigui sono state sfruttate per ricostruire la struttura nucleotidica completa del gene, che è risultato essere lungo 1204 bp. Per verificarne l'identità, ogni frammento, è stato allineato con sequenze omologhe mediante BLAST.

4.3 Analisi filogenetica

Le indagini evolutive sono state effettuate su due data set distinti e differenziate in base al tipo di marcatore utilizzato (Tab. IV - V). Le sequenze omologhe non caratterizzate in questo studio sono state scaricate dalle banche dati genomiche in seguito ad una ricerca effettuata mediante BLAST.

4.3.1 ND2

La regione codificante del genoma mitocondriale è soggetta a vincoli di carattere funzionale: evolvendo più lentamente della *Control Region*, non possiede lo stesso potere risolutivo a livello di specie, ma risulta più sensibile nel discriminare fenomeni evolutivi avvenuti all'interno del genere.

A causa della scarsa disponibilità di sequenze complete mitogenomiche di *Gyps fulvus*, o quantomeno di specie del genere *Gyps*, non è stato possibile condurre l'analisi filogenetica sfruttando l'intero mtDNA come unico marcatore. Se da un lato questa scelta, peraltro obbligata, comporta la perdita d'informazione molecolare, dall'altro consente di estendere il data set ad un maggior numero di componenti, e consente di validare il dato in termini statistici.

Il primo marcatore selezionato, il gene ND2, ha permesso di ottenere risultati in linea con i dati riportati in letteratura, relativamente alla storia evolutiva dei *Gyps* (Johnson *et al.*, 2006). ND2, insieme a Cytb, rappresenta uno dei marcatori molecolari maggiormente impiegati negli studi di filogenesi poiché, in virtù di un tasso di sostituzione intermedio tra tutti i geni mitocondriali, approssima in maniera ottimale l'evoluzione del mitogenoma nel suo insieme (Johnson *et al.*, 2006).

L'analisi è stata effettuata sia sulla sequenza nucleotidica che su quella proteica, dando come risultato alberi filogenetici aventi topologia sovrapponibile. In Figura 3 è riportato l'albero calcolato sulla sequenza amminoacidica con il metodo del *Maximum Likelihood* (ML), sotto l'assunto del modello evolutivo mtREV24.

Pur non essendo completamente risolto, l'albero presenta indici di *Quartet Puzzling Value* (QPV) altamente significativi (71-98), fatta eccezione per il nodo da cui si sono separati il cluster *G. bengalensis* - *africanus* (GBAP1-GAXX2) da *G. coprotheres* - *indicus* - *tenuirostris* - *rueppellii* - *fulvus*

(GRFG1-GCFF1-GTAN1-GIAI1/FFES3-GFFG1) (QPV=53).

E' probabile che l'evento in questione sia stato molto repentino e che la perdita di risoluzione sia unicamente imputabile al tasso evolutivo troppo lento del marcatore utilizzato.

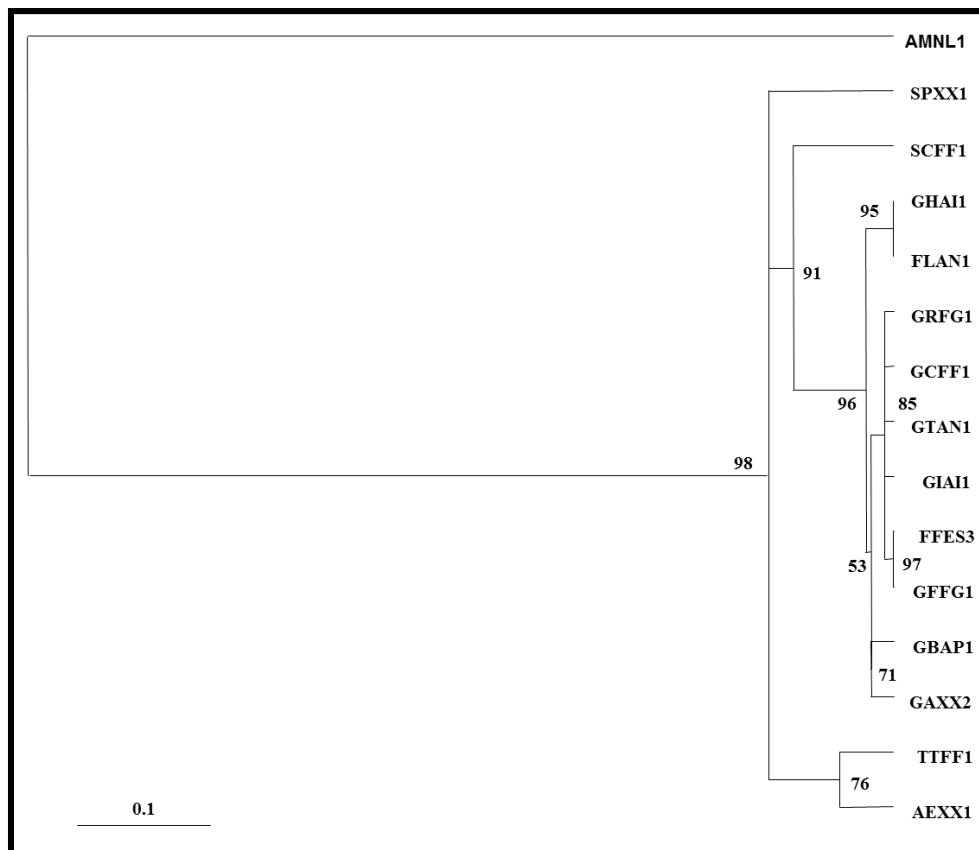


Figura 3 - Albero filogenetico su amminoacidi ND2 costruito con il metodo ML e modello evolutivo mtREV24

Nel raggruppamento dei *Gyps*, che risulta monofiletico, è possibile identificare due linee evolutive, una che conduce verso le specie asiatiche *G. himalaiensis* e *G. fulvescens*, l'altra verso le restanti presenti nell'analisi. Questo secondo clade a sua volta si struttura in due sotto-cluster, uno dei quali evolutivamente più antico rispetto a tutti gli altri, che comprende le specie *G. bengalensis* e *G. africanus*, di provenienza asiatica la prima e africana la seconda (QPV=71).

Come atteso, il Grifone sardo mostra una stretta correlazione con la specie *Gyps fulvus*. Tra tutte le specie esterne al genere, *Sarcogyps calvus* risulta quella più vicina evolutivamente ai *Gyps*, mentre il genere *Aegyptius* appare

maggiormente affine a *Torgos*.

La specie utilizzata come *outgroup* nell'analisi è *Alligator mississippiensis*, rappresentante la classe dei rettili. Questo ha permesso di calibrare l'albero per le datazioni molecolari utilizzando come riferimento la divergenza tra la linea evolutiva degli uccelli e dei coccodrilli, datata circa 254 milioni di anni fa (MYA, Million Years Ago) (Janke e Arnason, 1997). Questo valore rappresenta una media tra la datazione relativa alla separazione tra uccelli e coccodrilli, pari a circa 242 MYA se viene considerato costante il tasso di divergenza, e la separazione tra uccelli/coccodrilli pari a circa 266 MYA se si considera la divergenza basata su dati paleontologici tra mammiferi e uccelli/coccodrilli, impiegando come punto di calibrazione la separazione tra cetacei e artiodattili corrispondente a circa 60 MYA (A/C-60) (Arnason e Gullberg, 1996).

Sulla base della lunghezza dei rami, proporzionale al numero di differenze accumulate durante il percorso evolutivo compiuto, è stato possibile datare i principali eventi di speciazione avvenuti all'interno del raggruppamento monofiletico d'interesse.

La separazione fra i generi *Sarcogyps* e *Gyps*, appartenenti entrambi alla famiglia *Accipitridae*, rappresenta il fenomeno più antico tra quelli datati, e risalirebbe a circa 5,88 MYA. La formazione del genere *Gyps* sarebbe avvenuta verosimilmente 1,62 MYA, mentre fenomeni di più recente insorgenza, come la separazione fra i generi *G. africanus* e *G. bengalensis*, e la comparsa dei generi *G. tenuirostris*, *G. indicus* e *G. coprotheres*, si stima siano avvenuti rispettivamente 1,51 MYA e 540 mila anni fa (KYA).

Tabella 4 - Sequenze amminoacidiche ND2 costituenti il data set

SPECIE	PROVENIENZA	CODICE IDENTIFICATIVO	CODICE DI ACCESSO
<i>Aegyptius monachus</i>	-	AEXX1	AY987085
<i>Alligator mississippiensis</i>	-	AMNL1	NP_007563
<i>Gyps africanus</i>	-	GAXX2	DQ908988
<i>Gyps bengalensis</i>	Pakistan	GBAP1	AY987078
<i>Gyps coprotheres</i>	Sud Africa	GCFE1	AY987081
<i>Gyps f. fulvescens</i>	Nepal	FLAN1	DQ908984
<i>Gyps fulvus</i>	Gambia	GFFG1	AY987080
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES3	NP
<i>Gyps himalayensis</i>	India	GHAI1	DQ908983
<i>Gyps indicus indicus</i>	India	GIAI1	DQ908989
<i>Gyps rueppellii</i>	Gambia	GRFG1	DQ908987
<i>Gyps tenuirostris</i>	Nepal	GTAN1	DQ908982
<i>Sarcogyps calvus</i>	Sud Africa	SCFE1	AY987083
<i>Spilornis cheela</i>	-	SPXX1	NC_015887o
<i>Torgos tracheliotus</i>	Sud Africa	TTFF1	AY987086

4.3.2 Control Region

L'indagine sulla regione di controllo è stata condotta utilizzando un data set più ampio, grazie alla maggior disponibilità di sequenze (Tab. V).

E' stato selezionato come marcatore solo un tratto di 395 bp, su 1204 complessive costituenti la regione, corrispondenti al dominio ipervariabile I (HVS I) del *D-loop* 1. La scelta ha consentito di massimizzare il numero di sequenze omologhe da includere nella comparazione, incrementando significativamente la qualità dell'analisi in termini statistici.

L'albero filogenetico è stato calcolato con il metodo ML, selezionando il modello evolutivo HKY+G (Fig. 4).

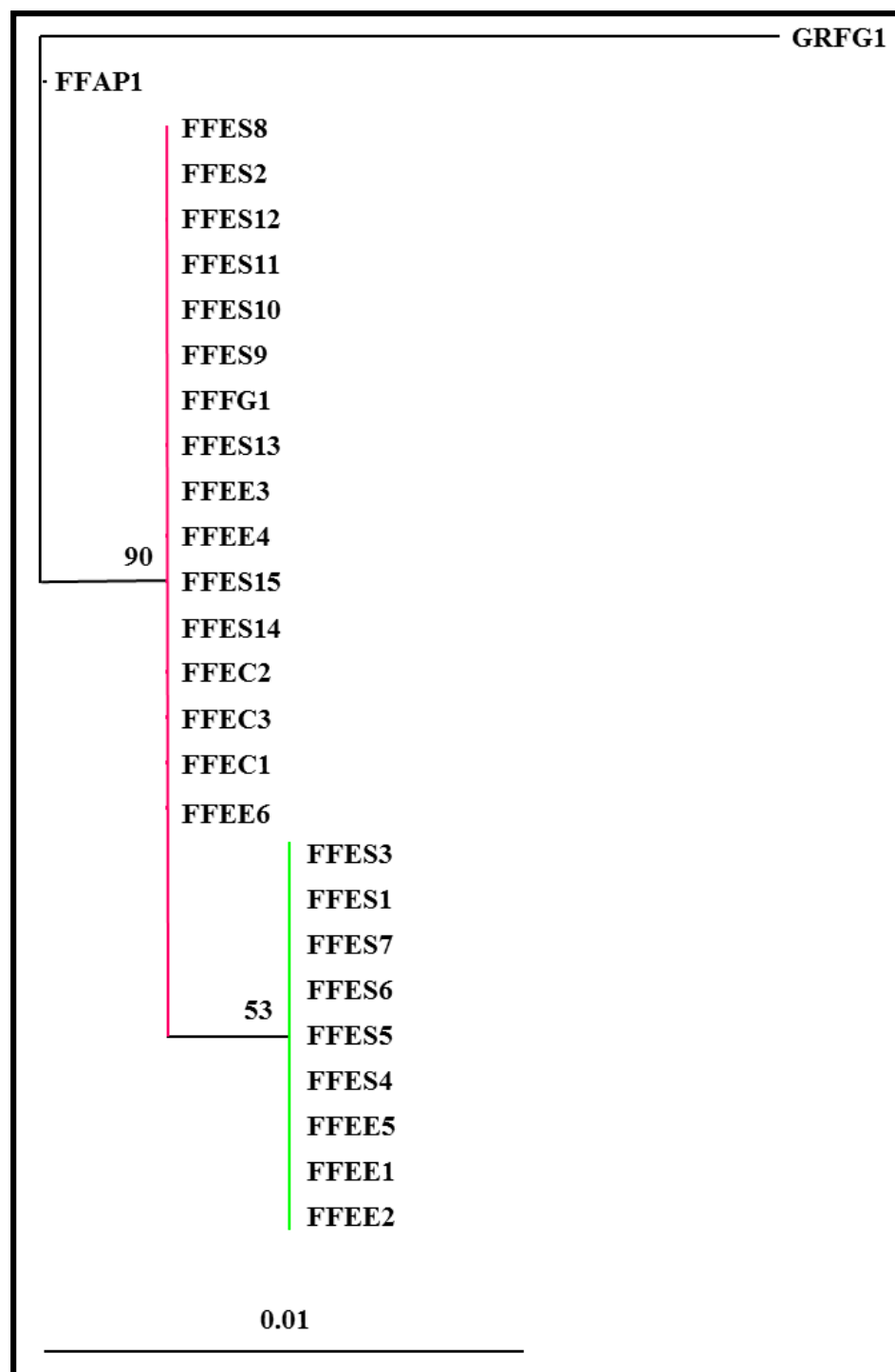


Figura 4 - ML tree calcolato sulla regione *D-loop*

Il cladogramma, generato sulla base di 27 sequenze appartenenti alla sottospecie *Gyps fulvus fulvus*, di cui 24 da campioni caratterizzati in questo studio, raggruppa le diverse OTUs in unico *cluster* derivante da un progenitore comune. La specie *G. rueppellii* è stata inserita come *outgroup*.

Il gruppo si divide in due cladi ben separati; uno comprendente

l'esemplare museale FFSE1, ed un altro, più cospicuo numericamente, del quale fa parte il *Gyps fulvus* di provenienza spagnola. Quest'ultimo raggruppamento risulta evolutivamente più antico rispetto all'altro.

Tutti gli indici QVP sono statisticamente significativi nonostante l'albero non sia completamente risolto.

Tabella 5 - Sequenze *D-loop* costituenti il data set

SPECIE	PROVENIENZA	CODICE IDENTIFICATIVO	CODICE DI ACCESSO
<i>Gyps rueppellii</i>	Gambia	GRFG1	DQ909001.1
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Pakistan	FFAP1	DQ908993.1
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Gambia	FFFG1	DQ908994.1
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES1	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES2	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES3	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES4	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES5	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES6	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES7	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES8	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES9	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES10	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES12	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES13	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES14	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFES15	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFEE1	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFEE2	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFEE3	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFEE4	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFEE5	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Sardegna	FFEE6	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Spagna	FFES11	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Cipro	FFEC1	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Cipro	FFEC2	NP
<i>Gyps fulvus fulvus</i>	Cipro	FFEC3	NP

Luca Decandia

Studio della variabilità genetica nel Grifone Sardo (*Gyps fulvus*) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale
Tesi di dottorato in International PhD school in Biomolecular and Biotechnological Sciences (Biochemistry, Physiology and Molecular Biology). Università degli Studi di Sassari

Per chiarire le relazioni fra i differenti raggruppamenti identificati nel ML e misurare la variabilità genetica interna alla popolazione studiata, il campione è stato analizzato mediante il *software* DnaSP.

Il cluster principale nel quale convergono tutti i *Gyps fulvus* analizzati costituisce l'aplogruppo originario, identificativo della specie, all'interno del quale si distinguono tre aplotipi (Hap) corrispondenti alla partizione delle sequenze in cluster genetici distinti ottenuta nell'analisi con il ML (Tab. 6).

La variabilità aplotipica *h* rilevata nella popolazione esaminata è pari a 0,520 (in un intervallo compreso tra 0 ed 1) (Tab. 6).

Tabella 6 - Classificazione delle sequenze per aplotipo di appartenenza

APLOTIPO	COMPOSIZIONE APLOTIPICA	PROVENIENZA	N° INDIVIDUI
Hap1	FFES11 (RIP), FFES8, FFES2, FFES12, FFES10, FFES9, FFFG1, FFES13, FFEE3, FFEE4, FFES15, FFES14, FFEC2, FFEC3, FFEC1, FFEE6	Sardegna (11) Cipro (3) Gambia (1) Spagna (1)	16
Hap2	FFES1 (SP), FFES3, FFES7, FFES6, FFES5, FFES4, FFEE5, FFEE1, FFEE2	Sardegna	9
Hap3	FFAPI	Pakistan	1

Questo valore è indicativo di una buona variabilità in termini di aplotipi presenti, che peraltro mostrano tra loro un basso numero di differenze nucleotidiche ($\pi = 0,00139$).

Il dato risulta apparentemente in controtendenza con quanto atteso se si considera l'isolamento geografico delle popolazioni esaminate, in particolar modo quelle nidificanti in Sardegna e a Cipro, e la scarsa propensione degli avvoltoi ad attraversare grosse distese d'acqua. Una spiegazione plausibile che giustifichi la ridotta variabilità nucleotidica tra gli aplotipi presenti può essere ricercata in eventi casuali da cui sia scaturita una deriva genetica, colli di bottiglia come quelli subiti in seguito a repentini cali demografici, e non ultimo, un forte effetto del fondatore dovuto all'introduzione di esemplari provenienti da altre regioni per favorire la ripresa delle colonie in difficoltà.

Questo giustificerebbe anche il basso livello di risoluzione ottenuto dall'albero filogenetico, nonostante il marcatore impiegato mostri in linea teorica un alto grado di variabilità che ben si presta agli studi intraspecifici.

Per valutare la significatività statistica della strutturazione genetica dei tre aplotipi, è stata condotta un'analisi utilizzando l'algoritmo di *clustering* basato sul modello bayesiano implementato in BAPS 5.2 (Fig. 5).

Il test tuttavia non ha prodotto indici di supporto statisticamente significativi, probabilmente a causa di un evento di speciazione incipiente ma non ancora del tutto conclamato.

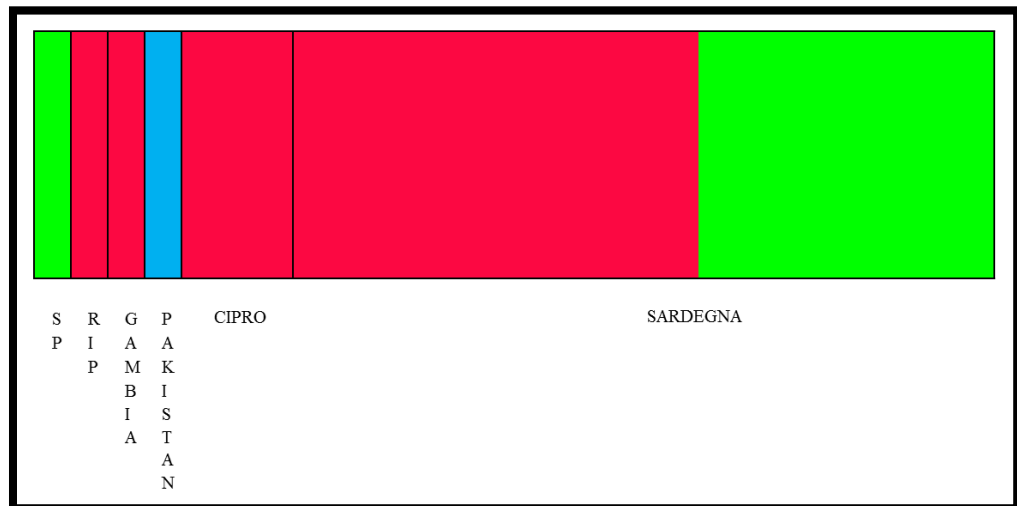


Figura 5 - Struttura genetica della popolazione dedotta dall'analisi bayesiana

L'Hap1, risultato essere il più diffuso geograficamente tra le aree considerate, presenta al proprio interno l'esemplare FFEE11 di provenienza spagnola, denominato RIP, insieme ad altri esemplari campionati in Sardegna, a Cipro e in Gambia.

La composizione di questo gruppo potrebbe essere spiegata attraverso la teoria dello *stepping-stone* (Leck, 1980). Secondo questo modello, un certo numero di esemplari appartenenti ad una popolazione si sarebbe spostato dalla sede originaria attraverso fenomeni di migrazione parziale, caratterizzata dalla copertura di brevi distanze. Gli individui coinvolti interromperebbero quindi le abitudini migratorie in favore della colonizzazione di nuovi territori, divenendo ivi stanziali fino a determinare veri e propri eventi di speciazione.

La presenza dell'Hap1 in Sardegna, inoltre, può essere facilmente ricondotta al ripopolamento delle colonie isolate con esemplari spagnoli. Il fatto che questo tipo di assetto genetico sia stato identificato in esemplari provenienti da diverse regioni del bacino mediterraneo (Spagna, Gambia e Cipro), lascia supporre che sia molto comune anche in Spagna, sebbene non

esistano dati popolazionistici che consentano di validare l'ipotesi.

L'individuo FFES1, denominato SP, è risultato appartenere all'Hap2, insieme ad altri 8 esemplari di provenienza sarda. Considerando che si tratta di un esemplare museale antecedente al programma di ripopolamento attuato a partire dagli anni 70 del secolo scorso, e quindi verosimilmente non ibridato con Grifoni spagnoli per via della distanza e delle barriere geografiche interposte ai contatti tra le colonie, è ipotizzabile che sia un diretto discendente del nucleo originariamente presente in Sardegna. In conformità a questa ipotesi, l'Hap2 rappresenterebbe il corredo mitocondriale ancestrale di cui rimangono ancora alcune vestigia in una certa percentuale di esemplari sopravvissuti ai cali demografici, che sono stati in grado di trasmettere il loro patrimonio genetico, preservandolo dall'estinzione. Infatti l'areale originario in Sardegna comprendeva intorno agli anni '30 del secolo scorso quasi tutti i sistemi montuosi dell'isola, con una popolazione stimabile tra gli 800 e i 1.200 individui, ridotti poi a circa 70 intorno al 1980, calo numerico inevitabilmente accompagnato una drastica perdita della variabilità genetica.

L'elaborazione dei dati di sequenza mediante *Median Joining Network* (MJN) ha fornito indicazioni in linea con quelle ottenute dalle precedenti analisi, condotte con differenti metodiche (Figg. 3, 4 e 6).

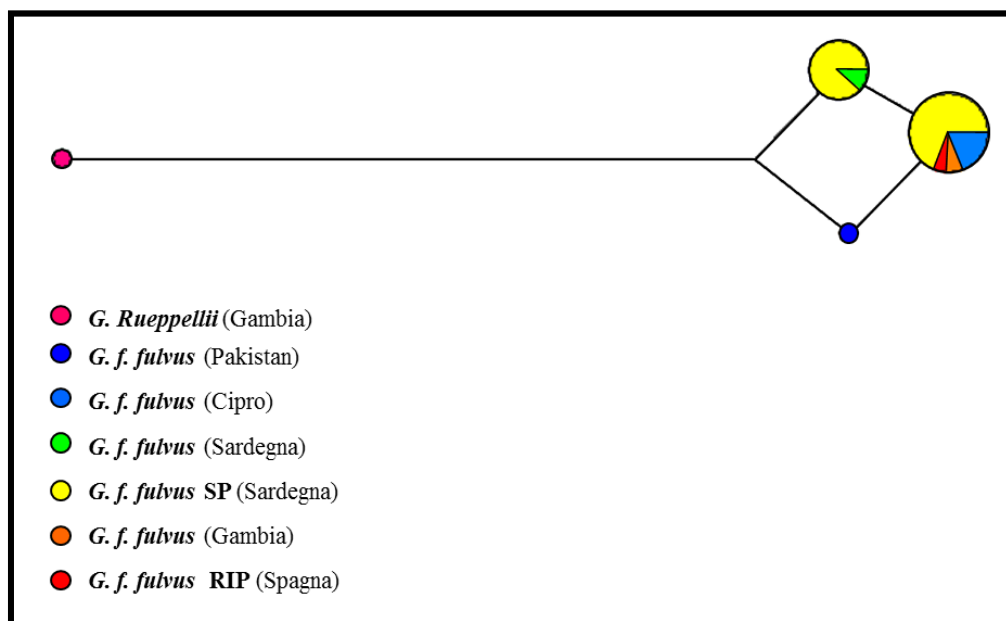


Figura 6 – *Median Joining Network* delle sequenze *D-loop*

La specie *G. rueppellii* è stata utilizzata come taxon esterno alla specie.

I *G. fulvus* si dividono in tre gruppi, corrispondenti sia ai cluster genetici del ML che agli Hap precedentemente identificati tramite DnaSP e BAPs.

Anche da questa indagine, il livello di diversità nucleotidica (π) risulta basso, essendo caratterizzato dalla presenza di una sostituzione tra i differenti Hap di *G. fulvus*.

Hap1 e 3 risultano interconnessi e tra loro variabili unicamente al nucleotide 195 dell'allineamento, mentre Hap1 e 2 differiscono in posizione 37. La specie *G. rueppellii* presenta invece 5 SNPs rispetto ai tre Hap dei *G. fulvus*, a conferma di una ridotta variabilità anche a livello inter-specifico.

Non si osserva alcuna strutturazione geografica tra le regioni, con l'eccezione dell'Hap3, presente solo nell'individuo pakistano e non condiviso con altre popolazioni. Il dato tuttavia è sicuramente influenzato in maniera determinante dal ridotto numero di sequenze rappresentanti Spagna, Gambia e Cipro, e necessita di essere validato con ulteriori analisi su un data set più ampio e proporzionato geograficamente rispetto alle aree di provenienza dei campioni.

Il calcolo delle differenze a coppie (*Pairwise Differences*) è stato effettuato con il software Arlequin 3.5, impiegando il modello evolutivo Tamura - Nei per valutare l'*indice di fissazione*, una misura della differenziazione di una popolazione valutata sulla base della struttura genetica.

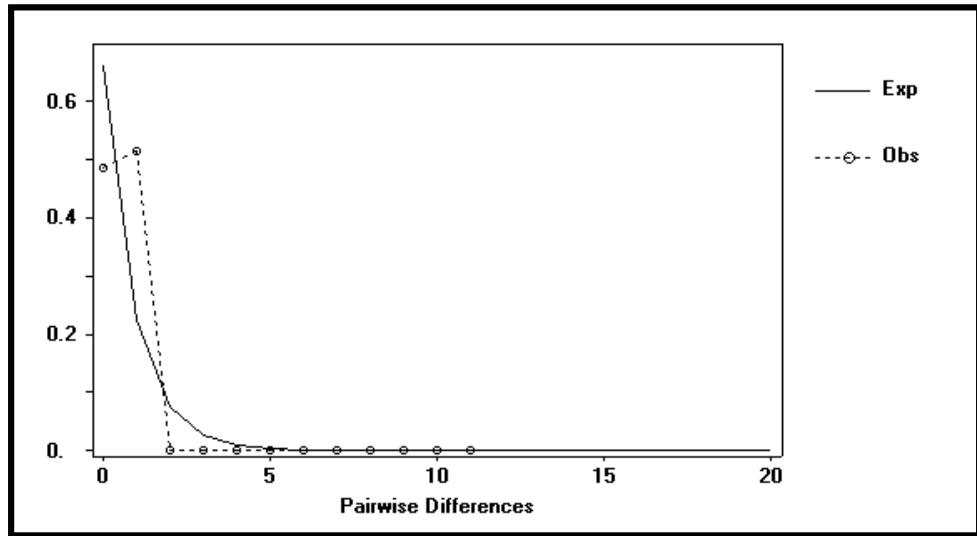


Figura 7 – Numero medio di differenze a coppie

Una popolazione modello, che ha raggiunto l’equilibrio, presenta una distribuzione normale, rappresentata da un grafico con un andamento di tipo gaussiano, dove la maggior parte degli individui tendono a concentrarsi attorno al valore medio. Dal grafico, invece, è possibile osservare come la popolazione in esame risulti essere in espansione, mostrando, infatti, la porzione di curva che si approssima al valore centrale.

5. Discussione

La specie *Gyps fulvus* ha subito un declino considerevole nell'ultimo secolo: in tre generazioni (circa 50 anni) la popolazione italiana si è ridotta dell'83,6%, passando dai 580 individui stimati nel 1955 ai 95 nel 2005, e il numero di coppie è diminuito del 96,9% (Gustin *et al.*, 2009).

In Sardegna le misure di conservazione sono iniziate negli anni Settanta e, negli ultimi decenni, sono stati immessi circa 60 soggetti consentendo, dal 1986 al 1996, di raddoppiare il numero delle coppie e di migliorare i parametri che caratterizzano la biologia riproduttiva di questa popolazione.

Attualmente l'avvoltoio Grifone vive in Sardegna come nidificante, unico caso in Italia, del quale attualmente si contano trenta coppie territoriali.

Sulla base di questi dati, *Gyps fulvus* è stato inserito nella categoria delle specie in Pericolo Critico (CE) che costituiscono, nel loro insieme, il 2,4% di quelle a rischio di estinzione.

A tal fine è quanto mai necessario approfondire le conoscenze relative alla genetica e alla storia evolutiva della specie, per fornire indicazioni utili a salvaguardarne l'identità genetica attraverso una gestione oculata che favorisca la riproduzione e l'espansione delle popolazioni nei loro areali di appartenenza.

Lo studio condotto ha permesso di ottenere la sequenza mitogenomica completa di *Gyps fulvus fulvus*, non ancora nota al momento in cui la ricerca ha avuto inizio, e di caratterizzarla strutturalmente mediante confronto con la sequenza omologa di *Aegyptius Monachus*, la più vicina filogeneticamente tra quelle disponibili.

È stato scelto di utilizzare come marcatore molecolare il mtDNA perché è abbondante nella cellula, ha dimensioni ridotte ed è quindi facilmente "manipolabile"; inoltre, essendo ereditato esclusivamente per via materna, consente di risalire lungo la linea matriarcale fino al progenitore comune di un gruppo d'individui.

Per incrementare il numero di sequenze omologhe costituenti i *dataset* per le analisi filogenetiche, data la scarsa disponibilità di mitogenomi completi nelle banche dati, sono stati selezionati due marcatori, il gene ND2 e la regione regolatrice, il *D-loop*; il primo ha permesso di studiare la filogenesi del genere *Gyps* nel suo insieme, l'altro quella della specie *G. fulvus*.

Nonostante tutte le specie di *Gyps* conosciute costituiscano un gruppo monofiletico poiché discendenti da un unico antenato comune, l'interpretazione delle relazioni filogenetiche sulla base dei dati molecolari presenta numerose difficoltà.

Secondo l'ipotesi maggiormente accreditata, l'intero genere si sarebbe originato in seguito ad un rapido e recente evento di radiazione adattativa conseguente a quella subita dai ruminanti (Johnson *et al.*, 2006). Questo tipo di fenomeno determina una veloce espansione del numero di specie all'interno di un genere con conseguente perdita, nella maggior parte dei casi, di evidenze paleontologiche del passaggio delle specie intermedie che si sono succedute tra progenitore e *taxa* attuali. In altre parole, si tratta di avvenimenti così rapidi e repentini, che spesso non c'è abbastanza tempo per accumulare quantità minime di reperti fossili sulla base dei quali ricostruire il percorso evolutivo seguito dalle specie in questione.

La scelta del gene ND2 ha permesso di studiare le dinamiche evolutive alla base della formazione delle varie specie costituenti il genere nel suo insieme. In virtù del tasso evolutivo mediamente costante caratteristico delle proteine, è stato possibile effettuare, sulla sequenza amminoacidica di ND2, la datazione molecolare dei principali eventi di separazione avvenuti nel gruppo secondo la teoria del “*molecular clock*”, che correla il numero di differenze tra proteine omologhe con il tempo trascorso dal punto di divergenza evolutiva.

I risultati presenti in letteratura, ottenuti considerando un tasso di divergenza grezzo, relativo alle regioni codificanti dei vertebrati a sangue caldo, compreso tra 1.6 e 5% di divergenza per milione di anni, hanno consentito di datare la radiazione all'incirca nel periodo corrispondente al Pleistocene, compreso tra i 2,6 e i 12 KYA (Seibold *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2006). Queste stime devono comunque essere considerate con cautela, in quanto assumono tassi di sostituzione nelle sequenze di tipo *clock-like*, noti per essere estremamente variabili sia tra geni differenti che tra i singoli *taxa* aviari (Nabholz B. *et al.*, 2009). Sulla base di queste assunzioni, la radiazione del genere *Gyps*, secondo i dati presenti in letteratura, è avvenuto tra 0.2 e 2 MYA (Johnson J.A. *et al.*, 2006). Questa stima è in accordo con i risultati ottenuti nella presente ricerca, che datano la comparsa del genere *Gyps* a circa 1,62 MYA.

Le specie *G. i. indicus*, *G. tenuirostris*, *G. coprotheres* e *G. rueppellii* risultano quelle filogeneticamente più affini a *G. fulvus*, e condividono tutte un antenato comune che viveva circa 0,54 MYA.

I raggruppamenti delle differenti specie ottenuti dall'analisi filogenetica condotta con il metodo ML sarebbero in apparente contraddizione con gli attuali areali di distribuzione degli Avvoltoi del Vecchio mondo. Ad esempio, *G. rueppellii* e *G. coprotheres*, presenti attualmente nelle regioni centro – meridionali del continente africano, risultano filogeneticamente più correlate con specie asiatiche (*G. tenuirostris* e *G. indicus*) che con specie africane (*G. africanus*). Allo stesso modo, quest'ultima mostra una divergenza evolutiva relativamente bassa se confrontata con specie asiatiche (*G. bengalensis*, *G. fulvescens* e *G. himalayensis*).

Il risultato, tuttavia, può essere interpretato tenendo conto che le varie specie di *Gyps* si cibano unicamente di carcasse, soprattutto di ungulati, dai quali dipendono e sono condizionati nei loro flussi migratori.

La comparsa del genere *Gyps* è un evento relativamente recente e si pensa sia avvenuta nella regione conosciuta come “Mezzaluna Fertile”, situata nell'area geografica compresa tra l'Anatolia Centrale e i monti Zagros nella quale, secondo evidenze archeo-zoologiche basate su parametri demografici, ebbe inizio l'addomesticamento dei bovini, dei suini e degli ovi-caprini (Zeder, 2008). Secondo alcuni ricercatori, questa associazione avrebbe avuto un'importanza fondamentale nella distribuzione geografica del genere *Gyps*, che infatti risulta sovrapponibile con quella degli ungulati appartenenti alla famiglia *Bovidae* (Johnson *et al.*, 2006).

In seguito, per investigare le relazioni filogenetiche tra gli individui caratterizzati in questo studio e appartenenti alla stessa specie, si è proceduto all'analisi del *D-loop*, che si differenzia per un elevato tasso di sostituzione nucleotidica e di conseguenza si presta in maniera ottimale per descrivere le relazioni filogenetiche tra *taxa* strettamente correlati.

Il cladogramma, generato sulla base di 27 sequenze appartenenti alla sottospecie *G. f. fulvus*, di cui 24 caratterizzate in questo studio, raggruppa le diverse OTUs in unico *cluster* derivante da un progenitore comune. La specie *G. rueppellii* è stata inserita come *outgroup* (Fig. 4).

Il gruppo si divide in due cladi ben separati; uno comprendente

l'esemplare museale FFSE1 (SP), ed un altro, più cospicuo numericamente, del quale fa parte l'esemplare di provenienza spagnola FFEE11 (RIP). Quest'ultimo raggruppamento risulta evolutivamente più antico rispetto all'altro.

Sulla base della suddivisione in cladi, sono stati individuati tre aplotipi, supportati da indici di diversità aplotipica h statisticamente significativi; in seguito, i singoli campioni sono stati raggruppati sulla base agli aplotipi di appartenenza: il primo, rappresentato dall'esemplare di riferimento "SP" di origine sarda certa, il secondo rappresentato dall'esemplare denominato "RIP", di origine spagnola, e il terzo costituito dall'unico campione proveniente dal Pakistan, identificato con la sigla "PAKISTAN".

La difficoltà nel campionamento e nel reperimento di un cospicuo numero di sequenza omologhe provenienti da esemplari di altri areali non ha consentito di indagare in maniera più approfondita l'assetto aplotipico di tutte le popolazioni mediterranee, impedendo di validare statisticamente la suddivisione in raggruppamenti su base aplotipica. E' stato comunque possibile, sulla base dei dati raccolti, formulare alcune ipotesi di tipo filogeografico.

La specie *Gyps fulvus*, il cui evento di speciazione risulterebbe essere molto più recente rispetto alla comparsa dell'antenato comune, avvenuto circa 540 KYA, si sarebbe originato nell'area anatolica ed in seguito spostato secondo il modello dello *stepping-stone*, all'Africa centro-orientale, arrivando alla costa atlantica e spingendosi fino alla penisola iberica, attraverso lo stretto di Gibilterra (Leck, 1980). In seguito si sarebbe spostato fino alle coste croate, sfruttando le rotte migratorie italiane, e alla Grecia, colonizzando così il bacino del Mediterraneo.

Si ipotizza che in Sardegna la comparsa dell'Avvoltoio grifone sia avvenuta circa 10 KYA, tappa cruciale nella storia dell'uomo, al quale si fa risalire il passaggio da un sistema di vita nomade, basato sulla raccolta e sulla caccia, ad uno sedentario basato sull'agricoltura e sull'allevamento del bestiame (Rivoluzione Neolitica) (Gupta, 2004). La grande disponibilità di cibo derivante dal consistente e rapido incremento di carcasse di ruminanti in prossimità dei nuclei abitativi, avrebbe richiamato un numero sempre maggiore di avvoltoi, fino a determinarne l'insediamento in pianta stabile nella fauna

aviaria locale. Qui sarebbe divenuto stanziale, diversificandosi nell'aplotipo caratteristico dell'isola (Hap2). L'areale originario in Sardegna comprendeva infatti fino agli anni '30 del secolo scorso quasi tutti i sistemi montuosi isolani, con una popolazione stimabile tra gli 800 e i 1.200 individui, ridotti poi a circa 70 individui intorno al 1980. Questa drastica diminuzione ha determinato un effetto a *collo di bottiglia*, che ha lasciato solo tracce dell'aplotipo caratteristico, probabilmente non quello più rappresentativo ma certamente quello che, possedendo la *fitness* più elevata, è riuscito a sopravvivere al perentorio calo demografico.

Attualmente in Sardegna coesistono due differenti aplotipi, rilevati in rapporto di 11/9 nel campione studiato; uno diffuso lungo l'area mediterranea, la cui presenza è verosimilmente conseguente al ripopolamento con esemplari spagnoli (Hap1), e un altro tipico sardo (Hap2).

In Spagna è presente l'aplotipo che mostra la più ampia diffusione, lungo il bacino del Mediterraneo; gli esemplari campionati a Cipro, infatti, possiedono lo stesso aplotipo (Hap1), ma l'esiguo numero di campioni di provenienza cipriota non consente di affermare con certezza che sia l'unico presente sull'isola, se si prende in considerazione il ruolo dell'isolamento e delle barriere geografiche cui la popolazione cipriota potrebbe risultare vincolata, nonché la stretta relazione con la popolazione di Grifoni residente a Creta.

Anche l'esemplare di provenienza gambese mostra lo stesso aplotipo spagnolo (Hap1), facendo supporre per quest'ultimo una discendenza evolutiva diretta con l'antenato originatosi nell'area anatolica e poi diffuso in Africa.

Il terzo aplotipo (Hap3), rappresentato da un unico esemplare di provenienza pakistana, non riscontrato tra gli esemplari campionati in Sardegna, potrebbe essere rappresentativo dell'area mediorientale.

L'areale di distribuzione della specie è molto ampio e, come precedentemente detto per il genere *Gyps* nel suo insieme, sembrerebbe aver seguito gli spostamenti dei caprini e dei bovini, che hanno iniziato a diffondersi dal sud-ovest asiatico muovendosi poi verso l'area mediterranea.

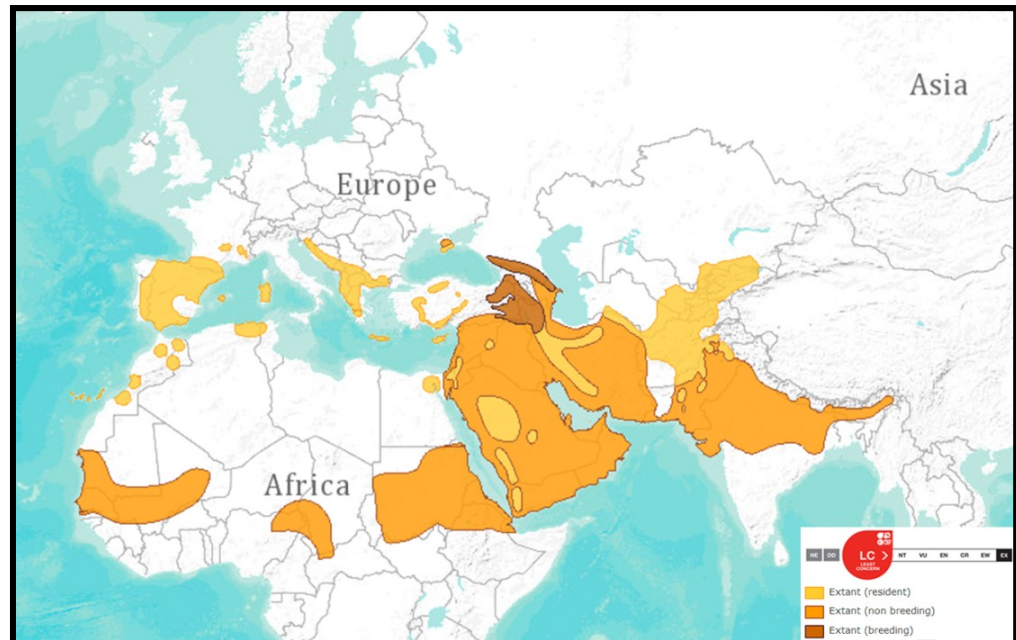


Figura 8 – Distribuzione geografica della specie *Gyps fulvus*

Dall'Asia minore, si sarebbero mossi via mare verso l'Europa, seguiti dagli avvoltoi. Per quanto riguarda gli spostamenti lungo il continente africano, i *Gyps fulvus* potrebbero essere stati attratti dalla popolazione di ungulati già presente. In questo caso sarebbe possibile considerare gli aplotipi ritrovati in Pakistan e Gambia, Hap3 e Hap1, come evolutivamente contemporanei, di derivazione dal ceppo ancestrale nato nell'area anatolica; lungo la linea temporale seguirebbe lo spostamento verso l'attuale areale spagnolo e l'ultimo aplotipo ad essersi diversificato sembrerebbe essere quello caratteristico sardo (Hap2).

L'avvento di strumenti innovativi per il sequenziamento degli acidi nucleici ha incrementato notevolmente negli ultimi anni la disponibilità di sequenze di mtDNA, rendendo possibile la messa in atto di analisi basate su data set sempre più ampi correlati con risultati ad elevata significatività statistica. Tuttavia l'interesse è focalizzato soprattutto sull'uomo, o su altre specie animali d'interesse economico, poiché sfruttate nel settore agricolo-produttivo.

Gli studi genetico-molecolari sui selvatici restano invece piuttosto limitati, sebbene di recente un numero sempre crescente di gruppi di ricerca si stia interessando all'argomento.

L'avvoltoio Grifone, considerato il suo ruolo di “*scavenger*”, è una specie ecologicamente fondamentale per qualunque ecosistema in cui convivano, uomo, animali domestici e selvatici.

I dati molecolari su *Gyps fulvus* reperibili in letteratura derivano dalla caratterizzazione di marcatori nucleari per lo più inseribili in un contesto medico-veterinario e rivolti quindi alla protezione della specie da infezioni provenienti da parassiti patogeni, in grado di minare la sopravvivenza delle colonie esistenti.

Sulla popolazione sarda non è stato ancora condotto nessuno studio basato sull'impiego di marcatori molecolari, fatta eccezione per un'analisi della variabilità allelica e del polimorfismo a livello dei microsatelliti Gf11A4, Gf3H3, Gf3F3, Gf8G1 e Gf9G1 (Satta V., 2009).

I dati e le informazioni raccolte in questa tesi rappresentano un primo contributo conoscitivo della variabilità mitocondriale in seno alla specie *Gyps fulvus*, con particolare riferimento alla sottospecie presente in Sardegna, e costituiscono un utile strumento per una gestione oculata della popolazione, il mantenimento della diversità all'interno del gruppo e la tutela della specie.

Pertanto, i dati di sequenza che si riferiscono alle altre popolazioni non sono proporzionali in termini numerici a quelli ottenuti in questa ricerca sui campioni sardi e di conseguenza non permettono di corroborare o avanzare ulteriori ipotesi riguardo la filo-geografia della specie e i suoi spostamenti nell'area mediterranea.

È quindi quanto mai opportuno, in ultima analisi, incrementare il numero di campioni di DNA, soprattutto provenienti da aree geografiche isolate e quindi verosimilmente conservate come nel caso delle colonie cretesi e cipriote, oltre che dalla Spagna, in questo momento la colonia più ampia numericamente e quindi, in linea teorica, più ricca dal punto di vista della variabilità genetica.

Disporre del quadro completo degli aplotipi presenti e della loro diffusione nel bacino del Mediterraneo, nel Nord Africano e nell'area mediorientale,

consentirebbe di investigare al meglio la diffusione della specie e l'insorgenza dei vari aplogruppi, ricollegandoli a eventi di natura storica e/o geologica.

L'aggiunta di marcatori genetici, sia nucleari che mitocondriali, anche combinati tra loro, potrebbe inoltre fornire quelle risposte ad oggi ancora mancanti che possano far chiarezza sulla storia evolutiva della specie e sulle relazioni esistenti tra i vari aplotipi identificati.

6. Bibliografia

- Aresu M., Fozzi A., Schenk H. (1997). Successo riproduttivo, ripopolamento e dinamica della popolazione del Grifone (*Gyps fulvus*) nella Sardegna nordoccidentale, 1986-1996. *Avocetta*, 21:15.
- Aresu M., Schenk H. (2003). Il Grifone, l'unico avvoltoio rimasto in Sardegna. Progetto Entulzu Bosa.
- Baker A., Marshall H. (1997). Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution In: *Avian molecular evolution and systematics* (Mindell D., ed). San Diego: Academic Press, 51–82.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. (1999). Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1):37–48.
- Baumgart W. (2001). Europas Geier. Flugriesen im Aufwind. Aula-Verlag. Wiebelsheim
- Clayton D.A. (1992). Structure and Function of the Mitochondrial Genome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 15:439–447.
- Corander J., Tang J. (2007) Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences* 205:19–31.
- Crochet P.A., Desmarais E. (2000) Slow rate of evolution in the mitochondrial *control region* of gulls (*Aves: Laridae*). *Molecular Biology and Evolution*, 1797.
- De Lucas M., Janss G.F.E., Whitfield D.P., Ferrer M. (2008). Collision fatality of raptors in wind farms does not depend on raptor abundance. *Journal of Applied Ecology*, 45:1695–1703.
- Desjardins P., Morais R. (1990). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology*, 212:599–634.
- Donazar J.A. (1993). Los Buitres Ibéricos. *Biología y conservación*. Quercus. Madrid.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10:564–567.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39 (4):783-791.

Luca Decandia

Studio della variabilità genetica nel Grifone Sardo (Gyps fulvus) attraverso l'analisi del DNA mitocondriale
Tesi di dottorato in International PhD school in Biomolecular and Biotechnological Sciences (Biochemistry, Physiology and Molecular Biology). Università degli Studi di Sassari

- Ferrer, M., de Lucas M., Janss G.F.E., Casado E., Muñoz A.R., Bechard M.J., Calabuig C.P. (2011). Weak relationship between risk assessment studies and recorded mortality in wind farms. *Journal of Applied Ecology*.
- Gibb G.C., Kardailsky O., Kimball R.T., Braun E.L., Penny D. (2007). Mitochondrial Genomes and Avian Phylogeny: Complex Characters and Resolvability without Explosive Radiations. *Molecular Biology and Evolution*, 24(1):269–280.
- Glutz v. Blotzheim U.N., Bauer K.M., Bezzel E. (1971). *Handbuch der Vögel Mitteleuropas*. 4. Frankfurt, Main, Germany: Akademische Verlagsgesellschaft
- Gupta A.K. (2004). Origin of agriculture and domestication of plants and animals linked to early Holocene climate amelioration. *Current Science*, 87(1):54-59.
- Gustin M., Brambilla M., Celada C. (2009). Valutazione dello stato di conservazione dell'avifauna italiana. Rapporto tecnico inedito su incarico del Ministero dell'Ambiente, della Tutela del Territorio e del Mare.
- Gregory T.R. (2008). Understanding Evolutionary Trees. *Evolution: Education and Outreach*, 1:121-137.
- Higgs P.G., Jameson D., Jow H., Rattray M. (2003). The Evolution of tRNA-Leu Genes in Animal Mitochondrial Genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 57:435–445.
- Huson D.H., Rupp R., Scornavacca C. (2011). *Phylogenetic Networks: Concepts, Algorithms and Applications*. Cambridge University Press.
- Janke A., Arnason U. (1997). The complete mitochondrial genome of Alligator mississippiensis and the separation between recent Archosauria (birds and crocodiles). *Molecular Biology and Evolution*, 14: 1266-1272.
- Johnson J.A., Lerner H.R.L., Rasmussen P.C., Mindell D.P. (2006). Systematic within Gyps vultures: a clade at risk. *Evolutionary Biology*, 6: 65-72.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Leck C.F. (1980). Establishment of new population centers with changes in migration patterns. *Journal of Field Ornithology*, 51:168-173.

- Librado P., Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Linhart C., Shamir R. (2002). The Degenerate Primer Design Problem. *Bioinformatics*, 18 (1): 172-180.
- Mindell D.P., Sorenson M.D., Dimcheff D.E. (1998). Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:10693–10697.
- Nabholz B., Glémin S., Galtier N. (2009). The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evolutionary Biology*, 9:54.
- Oaks J.L., Gilbert M., Munir Z., Virani R.T., Watson C.U., Meteyer B.A., Rideout H.L., Shivaprasad S., Ahmed M.J.I., Chaudhry M., Arshad S., Mahmood A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Letters to Nature*, *Nature* 427:630-633.
- Pearse D.E., Crandall K.A. (2004). Beyond FST: analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, 5:585–602.
- Pereira S.L. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4):745-752.
- Peronace V., Cecere J.G., Gustin M., Rondinini C. (2012). Lista Rossa 2011 degli uccelli nidificanti in Italia. *Avocetta*, 36:11–58.
- Rasmussen P.C., Parry S.J. (2001). The taxonomic status of the "Longbilled" Vulture *Gyps indicus*. *Vulture News*, 44:18-21.
- Rhys Green E. I., Newton S., Shultz A.A., Cunningham M., Gilbert D.J. (2004). Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. *Journal of Applied Ecology*, 41(5):793-800.
- Risebrough R., (2004). Fatal medicine for vultures. *Nature* 427:596-598.
- Roques S., Godoy J.A., Negro J.J., Hiraldo F. (2004). Organization and Variation of the Mitochondrial *Control region* in Two Vulture Species, *Gypaetus barbatus* and *Neophron percnopterus*. *Journal of Heredity*, 95(4):332–337.
- Saccone C., Gissi C., Lanave C., Larizza A., Pesole G., Reyes A. (2000). Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene*, 261:153–159.

- Saccone C., Lanave C., Pesole G., Sbisà E. (1993). Caratteristiche strutturali ed evoluzione del genoma mitocondriale nei mammiferi, 27-28.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4):406-25.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory Manual*, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 74(12):5463–5467.
- Satta V. (2009). Studio della variabilità genetica di specie animali autoctone della Sardegna. Tesi di Dottorato, Tutor Dott. Giovanni Giuseppe Leoni. Università degli Studi di Sassari. Anno Accademico 2008-09.
- Sbisà E., Tanzariello F., Reyes A., Pesole G., Saccone C. (1997). Mammalian mitochondrial *D-loop* region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205:125–140.
- Schenk H. (1976). Analisi della situazione faunistica in Sardegna. Uccelli e Mammiferi. S.O.S. Fauna, *Animali in pericolo in Italia* Ed. WWF, Camerino, 465-556.
- Schenk H. (1986). Gli ultimi Grifoni d'Italia. Situazione e prospettive. Tutela per i Rapaci. UNAVI. Roma, 27-38.
- Schenk H., Aresu M. (1992). Il ripopolamento del Grifone (*Gyps fulvus*) nella Sardegna nord-occidentale: risultati, problemi e prospettive. *Impatto 3 R, Randagismo - Ripopolamenti - Reintroduzioni*. Zangarastampa, Siracusa, 159-184.
- Schenk H., Aresu A., Naitana S. (2007). Piano d'Azione per il Grifone (*Gyps fulvus*) in Sardegna. *Legambiente Sardegna*.
- Schmidt H.A., Strimmer K., Vingron M., Von Haeseler A. (2002). Tree-Puzzle: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*, 18:502-504.
- Seibold I., Helbig A.J. (1995). Evolutionary History of New and Old World Vultures Inferred from Nucleotide Sequences of the Mitochondrial

- Cytochrome b Gene. Philosophical Transaction of the Royal Society of London, 350:163-178.
- Pereira S.L. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4):745-752.
- Sorenson M.D. (2003). Avian mtDNA primers. Boston University.
- Sorenson M.D., Ast J.C., Dimcheff D.E., Yuri T., Mindell D.P. (1998). Primers for a PCR-Based Approach to Mitochondrial Genome Sequencing in Birds and Other Vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12(2):105–114.
- Tamura K., Nei M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512–526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Zeder M.A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 105:11597–11604.