

RELAZIONE TECNICA



Analisi della variabilità ai loci microsatelliti e nel DNA mitocondriale in campioni biologici di Camoscio alpino (*Rupicapra rupicapra rupicapra*) della Provincia di Sondrio.

ngb | GENETICS

Analisi della variabilità ai loci microsatelliti e nel DNA
mitocondriale in campioni biologici di Camoscio alpino
(*Rupicapra rupicapra rupicapra*) della Provincia di Sondrio.

Documento redatto da:

Dr. Massimo Pierpaoli

m.pierpaoli@ngbgenetics.com

Indice

INTRODUZIONE.....	3
IL PROGETTO.....	4
IL CAMOSCIO: DISTRIBUZIONE E STATUS GESTIONALE.....	5
IL CONTESTO BIOGEOGRAFICO EUROPEO.....	7
I MARCATORI UTILIZZATI.....	8
IL CAMPIONAMENTO.....	10
ANALISI GENETICHE.....	12
Estrazione del DNA.....	12
Amplificazione e sequenziamento del D-loop.....	12
Amplificazione e tipizzazione dei microsatelliti.....	12
RISULTATI.....	14
Indici generali di variabilità genetica.....	14
Variabilità tra popolazioni.....	18
Analisi della struttura filogeografica.....	19
Analisi dei microsatelliti.....	22
Utilizzo a scopo forense dei microsatelliti.....	27
Conclusioni.....	30
BIBLIOGRAFIA.....	31
ALLEGATI.....	34
Allegato 1.....	35
Allegato 2.....	43

INTRODUZIONE

Lo studio della genetica di popolazione rappresenta il principale strumento a disposizione dello scienziato, o del manager, nello studio e nella gestione delle specie selvatiche. L'estesa conoscenza della variabilità e della struttura genetica di una specie e delle sue popolazioni locali, permette, infatti, di determinarne l'attuale condizione genetica e demografica, di ipotizzare la sequenza di eventi storici che ha portato a tale condizione e la presenza di eventuali fattori di rischio. L'individuazione di tali fattori di rischio, passati e presenti, sono infine il prerequisito essenziale per la definizione delle strategie di conservazione più adatte alla conservazione della specie in esame.

Una delle caratteristiche fondamentali degli esseri viventi è data dalla possibilità di adattarsi ai cambiamenti che avvengono nell'ambiente. Alla base di tale adattabilità c'è, almeno parzialmente, una risposta a livello genetico. La presenza di significativi livelli di variabilità genetica è quindi fondamentale per avere una risposta positiva alle pressioni selettive che vengono imposte dall'ambiente. L'evoluzione mediata dalla selezione naturale viene definita anche come evoluzione adattativa, essa è possibile quando l'entità della variazione ambientale è tale da non portare all'estinzione la popolazione soggetta al cambiamento, e avviene per un periodo di tempo sufficientemente lungo da fissare nella popolazione le varianti geniche responsabili dell'adattamento.

L'adattamento alla diversità di ambienti e di condizioni climatiche è quindi dovuto alla presenza in alcuni individui di varianti genetiche favorevoli. Tali varianti generalmente sono presenti con frequenze relativamente basse, ma l'elevato numero di individui normalmente presenti in una popolazione selvatica fa sì che tali frequenze aumentino abbastanza rapidamente, assicurando così la sopravvivenza della popolazione. Le popolazioni a rischio, al contrario, sono generalmente composte da un numero ridotto di individui, nell'ordine delle decine o poche centinaia, hanno bassa variabilità genetica e possono avere alti livelli di consanguineità (*inbreeding*). Ridotti livelli di variabilità genetica riducono, nel medio e nel lungo termine, la capacità di evolvere della popolazione, aumentando così la probabilità di estinzione. Nel breve periodo gli effetti della bassa variabilità genetica e dell'*inbreeding* si riflettono direttamente sui caratteri legati allo sviluppo della vita di un individuo, come la fertilità, la sopravvivenza dopo la nascita, la resistenza alle malattie.

Generalmente l'attenzione dello scienziato o del manager si concentra sulla gestione a breve e medio termine di una popolazione, in questo caso i fattori demografici (fluttuazioni ed eccessiva riduzione del numero di individui) e l'intervento diretto dell'uomo (ripopolamenti, caccia) rivestono una importanza maggiore rispetto ai fattori genetici. I mezzi messi a disposizione dalla genetica rivestono una importanza particolare nello studio della dinamica della popolazione. Attraverso lo studio degli appropriati marcatori è infatti possibile ricostruire, con un certo grado di approssimazione, la storia passata di una popolazione. Si avranno quindi informazioni sulla dimensione storica effettiva, sulle fluttuazioni e sui colli di bottiglia (*bottleneck*) che possono essersi verificati, sul tipo di incroci che si verificano, sul flusso genico tra popolazioni interconnesse.

IL PROGETTO

Il principale scopo del progetto è dato dalla creazione di una **banca dati genetica** per alcune specie di ungulati presenti sul territorio, con lo scopo di integrare il monitoraggio genetico con la gamma di strumenti gestionali attualmente utilizzati dai tecnici della Provincia e dai Comitati di Gestione dei Comprensori Alpini di Caccia. La composizione di tale banca dati è articolata in tre diversi "livelli":

- livello 1: archivio dei campioni di tessuto (muscolo) prelevati da animali abbattuti e controllati durante il regolare svolgimento della stagione venatoria. I campioni sono conservati in Etanolo 95% ad una temperatura di -20°C. Tali condizioni garantiscono la conservazione del campione per un periodo di tempo di diversi anni.
- livello 2: archivio del DNA estratto dai campioni stessi e conservato in soluzione acquosa di Tris/EDTA ad una temperatura di -20°C. Tali condizioni garantiscono la conservazione del campione per un periodo di tempo di diversi anni.
- livello 3: archivio elettronico contenete i dati grezzi ed i tracciati elettroforetici riferiti ai singoli campioni, utilizzabili come confronto in future analisi.

I risultati delle analisi effettuate permettono, inoltre, di perseguire gli scopi finali del

progetto, sintetizzabili nei seguenti punti:

- quantificare la variabilità genetica delle popolazioni campionate nella Provincia;
- stimare il numero di riproduttori (un utile confronto con una serie di censimenti);
- stabilire il numero di popolazioni (*'management units'*) che esistono per ogni specie;
- permettere una stima del livello di migrazione fra le popolazioni (individuando situazioni dove sia troppo basso e consentendo di suggerire la creazione di eventuali corridoi faunistici);
- indicare l'impatto sul pool genetico delle reintroduzioni condotte nel passato, informazione cruciale per valutare l'effetto delle reintroduzioni e stabilire eventualmente in quale modo condurle, laddove siano ancora necessarie, cioè con quale tipologia di interventi e di animali da rilasciare.

IL CAMOSCIO: DISTRIBUZIONE E STATUS GESTIONALE

Il Camoscio (*R. rupicapra*) è diffuso in tutta l'Europa centro-orientale, fino ai monti del Caucaso e della Turchia. La sottospecie alpina (*R. r. rupicapra*) è presente come forma autoctona in tutto l'arco alpino, in Germania, nei Balcani, sui Monti Tatra, sui Vosgi.

In Italia la specie è attualmente presente lungo tutto l'arco alpino, con densità differenti nelle diverse zone e senza soluzione di continuità dal Friuli-Venezia Giulia alla Liguria. L'occupazione del territorio potenzialmente adatto alla specie è rimasta invariata nell'ultimo decennio nell'arco alpino, e corrisponde circa al 100% dell'area potenzialmente idonea (Carnevali *et al.* 2009).

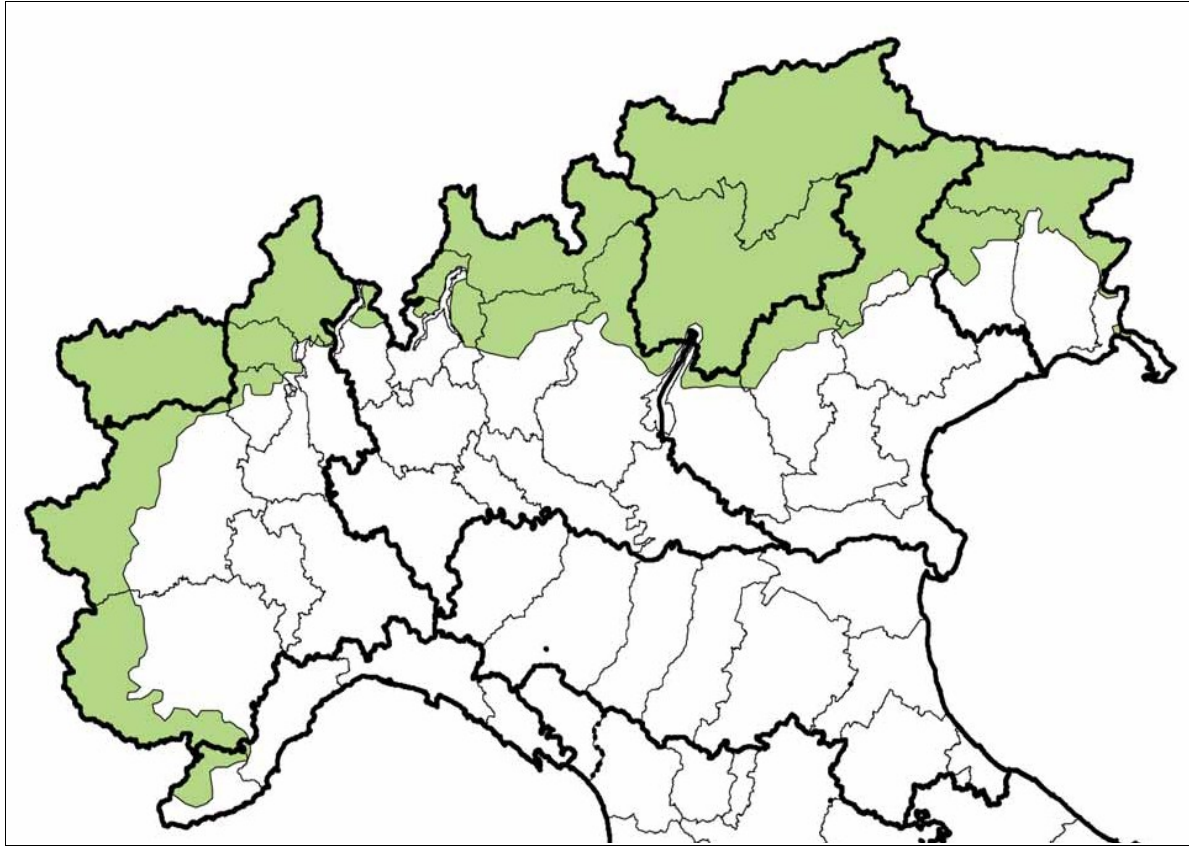


Fig. 1: distribuzione del Camoscio alpino al 2006 (Carnevali *et al.* 2009)

In Italia il Camoscio era uniformemente distribuito su tutto l'arco alpino fino alla seconda metà del '700, da quella data a causa principalmente della capillare presenza umana nel territorio, delle conseguenti trasformazioni ambientali ed alla caccia inizia il declino che si protrae fino alla metà del XX secolo. Da quella data la tendenza si inverte e l'espansione continua tutt'ora, infatti le stime di presenza complessiva sono più che raddoppiate dai circa 60.000 capi stimati nel 1980 ai circa 137.000 stimati nel 2009 (Fig. 1, Carnevali *et al.* 2009).

In Lombardia si registrano circa il 12% delle presenti totali del Camoscio sulle Alpi, ed in particolare nella Provincia di Sondrio sono presenti tra i 5000 ed i 10000 capi con densità che vanno dai 3 ai 30 capi/km² (Fig. 2, Carnevali *et al.* 2009).

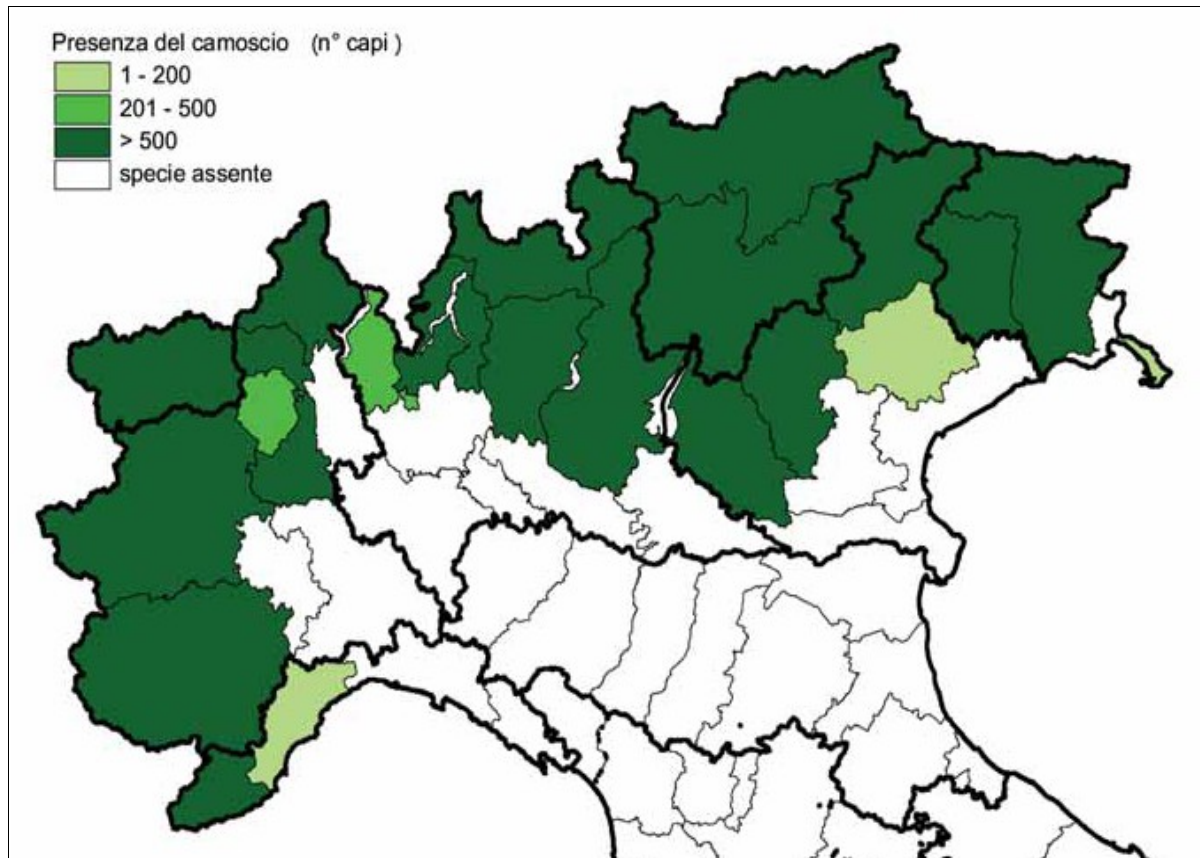


Fig. 2: presenza (n° di capi) nelle province italiane al 2005 (Carnevali et al. 2009)

IL CONTESTO BIOGEOGRAFICO EUROPEO

La distribuzione naturale delle specie viventi è influenzata, oltre che dai fattori antropogenici, anche dalle variazioni climatiche avvenute nel corso delle ere geologiche. L'alternarsi di periodi freddi (glaciali) a periodi relativamente caldi (interglaciali), in particolare, ha determinato cicli successivi di contrazione ed espansione degli areali di distribuzione.

Ad esempio, durante l'ultimo picco glaciale, durato dai circa 22 fino ai 15 mila anni fa (Brunhoff et al. 2003; Stewart e Lister 2001), i ghiacciai coprivano gran parte dell'Europa settentrionale fino ai 52° di latitudine Nord, così come le Alpi, i Pirenei, i Carpazi, il Caucaso e altre aree montagnose (Hewitt 1996; Taberlet et al 1998). Da circa 18 mila anni fa la tendenza generale è stata quella di un riscaldamento.

Nel corso dell'ultimo picco glaciale e, presumibilmente, anche durante i precedenti picchi glaciali, quasi tutte le specie europee di mammiferi sarebbero state costrette a modificare i loro areali a causa del progressivo estendersi della copertura di neve e ghiaccio.

L'ipotesi largamente accettata sostiene che la maggior parte dei taxa di climi temperati, sia vegetali che animali, come ad esempio il Camoscio sarebbero sopravvissuti nell'ultima glaciazione in uno o più rifugi isolati nell'Europa meridionale e nel Medio Oriente (penisole meridionali iberica e italiana, Grecia, Balcani meridionali, regioni ai margini del Caucaso e vicine al Mar Caspio; Hewitt 1996, 1999). I biomi predominanti che si trovavano fra i ghiacciai settentrionali e quelli alpini erano principalmente rappresentati da formazioni note con il termine di 'steppa-tundra', troppo inospitali per la maggior parte delle specie temperate (Hewitt 1996). Quando il clima è diventato più mite, le popolazioni si sono mosse da questi rifugi meridionali per diffondersi nei loro areali originali. Secondo questa ipotesi i lunghi periodi di isolamento avrebbero portato all'instaurarsi di un certo grado di differenziamento genetico fra le popolazioni dei distinti rifugi, dovuto ad una perdita casuale della variabilità genetica esistente ed alla evoluzione di nuova variabilità in condizioni di isolamento.

I risultati di analisi genetiche condotte su campioni provenienti da diverse popolazioni alpine, appenniniche ed europee (Crestanello *et al.* 2009, Soglia *et al.* 2010) indicano che le popolazioni alpine di Camoscio sono significativamente differenziate, anche a livello microgeografico. Tali autori identificano nella struttura geografica e nell'habitat tipico del camoscio le probabili cause di tale differenziamento, individuando, in particolare, nei fiumi alpini delle importanti barriere geografiche che limitano il flusso genico tra le diverse popolazioni.

I MARCATORI UTILIZZATI

Per l'esecuzione del progetto sono stati scelti due tipi di marcatori molecolari: il DNA mitocondriale (mtDNA) e i microsatelliti autosomici (STR).

Il mtDNA è una piccola molecola circolare (lunga circa 16.000 paia di basi nucleotidiche, nei mammiferi) localizzata fuori dal nucleo all'interno dei mitocondri. Per il suo elevato tasso mutazionale, la modalità uniparentale di ereditarietà (per via materna nei mammiferi)

con la relativa assenza di ricombinazione, il mtDNA è diventato il marcatore di elezione nella grande maggioranza degli studi di genetica di conservazione. Questo è dovuto anche al fatto che il mtDNA è presente in molte copie per cellula, a differenza delle due sole copie del DNA a localizzazione nucleare, rendendo possibile la sua tipizzazione anche a partire da molti tessuti biologici nei quali il numero di cellule da cui estrarre il DNA è estremamente ridotto (peli, feci, ossa, ecc.). Per la stima dei livelli di diversità genetica nelle popolazioni di una determinata specie, la regione di controllo non codificante del mtDNA (D-loop) costituisce il bersaglio preferenziale, perché il suo elevato tasso di mutazione permette di rendere manifesti eventi di differenziamento verificatisi in tempi relativamente recenti da un punto di vista evolutivo, ovvero dell'ordine anche delle migliaia e decine di migliaia di anni.

Gli STR sono una classe di marcatori appartenenti al DNA nucleare. La loro ereditarietà è di tipo mendeliano biparentale e si caratterizzano per essere costituiti da un motivo di dimensioni molto ridotte (solitamente 2-4 paia di basi) che viene ripetuto un numero variabile di volte. I diversi alleli (varianti) di un marcatore microsatellite si distinguono proprio per il numero diverso di volte in cui viene ripetuto il motivo di base. Si avranno quindi, per esempio, alleli con 20 ripetizioni ed alleli con 18 ripetizioni. Si tratta di marcatori codominanti, ovvero permettono di distinguere gli individui omozigoti, che presentano due copie dello stesso allele, da quelli eterozigoti che hanno un genotipo costituito da due alleli diversi. Fra i marcatori del DNA nucleare, gli STR sono fra quelli che hanno un tasso mutazionale più elevato (circa 10^{-4} per generazione a fronte di una media di 10^{-6}), rendendoli quindi provvisti di un elevato livello di polimorfismo. Se, per esempio, tipizziamo per un numero di marcatori STR compreso fra 8 e 20 due individui della stessa specie presi a caso, a meno che non si tratti di gemelli monozigoti, il profilo genotipico che otterremo sarà diverso. Si comprende bene il perché gli STR siano i marcatori utilizzati in campo forense nei casi di riconoscimento individuale, attribuzione di paternità, ecc. Per un'analisi statistica valida per questo tipo di studio, è consigliata la caratterizzazione di una decina di STR per ogni specie.

IL CAMPIONAMENTO

Dal momento che la specie oggetto di studio è soggetta a prelievo venatorio, per il campionamento si è deciso di avvalersi degli animali abbattuti durante la regolare stagione di caccia. Perciò, immediatamente prima dell'inizio delle stagioni venatorie del 2006-7 e 2007-8 e 2008-2009, e in stretta collaborazione con colleghi dell'Ufficio Faunistico della Provincia di Sondrio e delle associazioni venatorie, è stato distribuito ai cacciatori il kit di campionamento consistente in: 1 provetta numerata sterile con 15 ml di etanolo assoluto per la conservazione di ca 1 cm³ di tessuto; un bisturi sterile mono-uso; un paio di pinzette sterili; un questionario numerato (per indicare sesso, età, peso). I campioni di muscolo in etanolo sono stati tenuti a temperatura ambiente, ed alla fine della stagione venatoria sono stati inviati al laboratorio di analisi di NGB Genetics dove sono stati posti in congelatore. La raccolta dei campioni è stata effettuata nei comprensori Chiavenna, Morbegno, Sondrio, Tirano ed Alta Valtellina (figura 3).

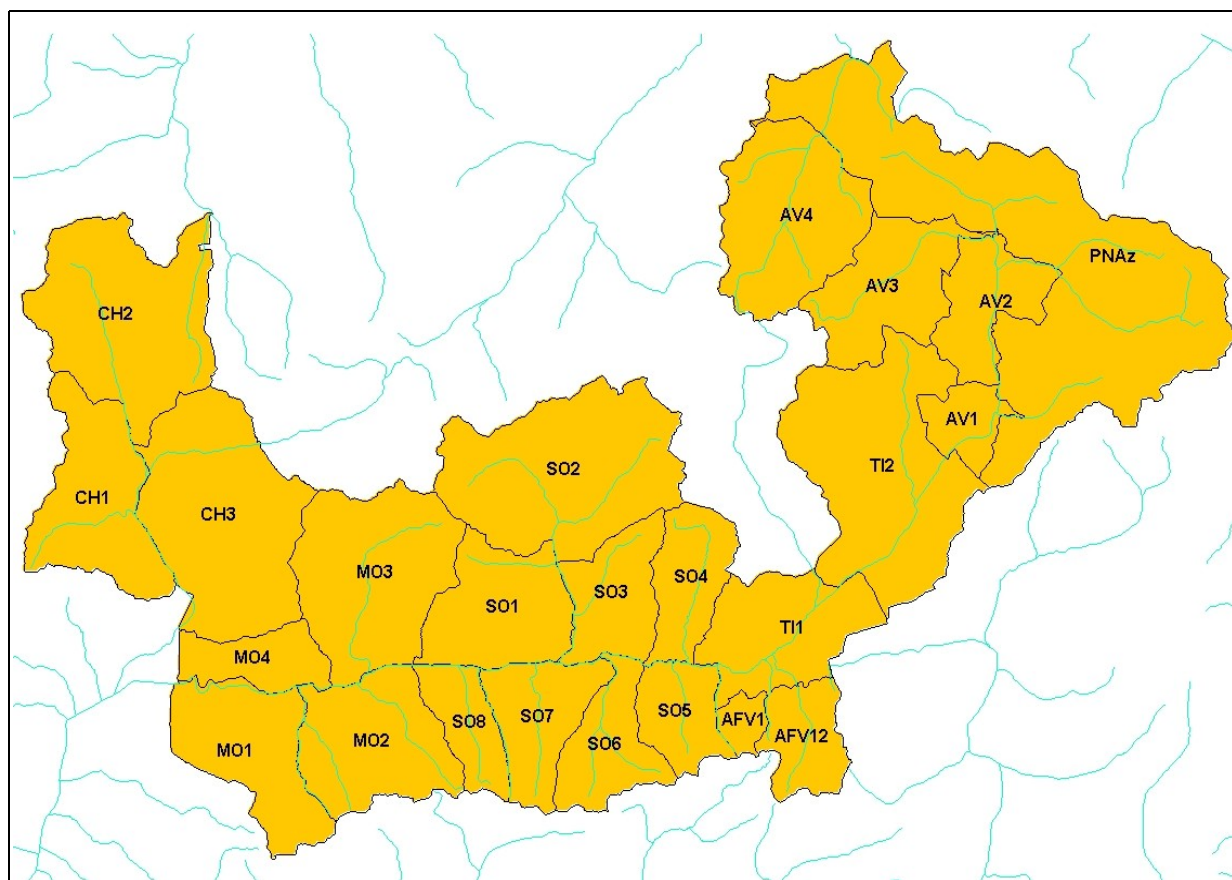


Fig. 3: comprensori della Provincia di Sondrio. Vengono indicati i confini dei comprensori ed i corsi d'acqua.

Sono quindi stati analizzati un totale di 128 campioni di Camoscio, con un minimo di 8 ed un massimo di 30 campioni in ognuno dei cinque comprensori oggetto di studio (Tab. 1)

Tabella 1

Comprensorio	Campioni ricevuti	Campioni sequenziati (D-loop)	Campioni tipizzati (STR)
Chiavenna (CH)	30	29	30
Morbegno (MO)	30	29	30
Sondrio (SO)	22	21	22
Tirano (TI)	17	8	17
Alta Valtellina (AV)	24	20	24
Non dichiarati	5	3	5
Totale	128	110	128

ANALISI GENETICHE

Estrazione del DNA

Come prima fase del lavoro è stato estratto il DNA da circa 30 mg di tessuto muscolare preservato in etanolo 95% e consegnato al laboratorio di NGB Genetics.

L'estrazione è stata fatta utilizzando il protocollo pubblicato in Miller *et al.* (1998) e modificato presso il laboratorio. Il DNA estratto è stato successivamente controllato mediante elettroforesi su gel di agarosio. Tutti i campioni hanno fornito DNA di buona qualità ed in quantità adeguata per le successive analisi genetiche.

Amplificazione e sequenziamento del D-loop

Una porzione della regione di controllo del D-loop lunga circa 450 paia di basi (bp) è stata amplificata mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) utilizzando i primers pubblicati in Vernesi *et al.* (2002).

Dopo l'amplificazione i campioni sono stati purificati mediante reazione enzimatica utilizzando gli enzimi Esonucleasi S1 e Fosfatasi alcalina (Exo-Sap).

I campioni purificati sono stati poi sottoposti a reazione di sequenziamento utilizzando il kit BigDye v1.1 (AB). Dopo la reazione di sequenziamento i campioni sono stati purificati e sequenziati mediante elettroforesi capillare su un analizzatore automatico del DNA (AB 310).

Le sequenze ottenute sono state analizzate singolarmente mediante il software Seqscape 2.6 (AB) ed allineate utilizzando il software Clustal X (Thompson *et al.* 1997), l'allineamento ottenuto è stato trasferito in un file di testo (vedi file "Allegato1_Cam_Sondrio.fas", ed Allegato 1 nel presente documento).

Amplificazione e tipizzazione dei microsatelliti

Il DNA nucleare è stato analizzato tramite l'amplificazione mediante PCR degli 11 loci microsatelliti elencati in tabella 2.

Tabella 2

Locus	Sequenza	N° basi	Riferimenti bibliografici
SRCRSP01F	ACCCTGGTTTCACAAAAGG	22	Arevalo <i>et al.</i> 1994
	TCCAGATTTTGTACCAGA CC	20	
ILSTS28F	GTCATGTCATACCTTTGA GC	27	Kemp <i>et al.</i> 1995
	CAGAAAGAAATAGAATGGACAG	26	
INRA36F	CAGAAAGAAATAGAATGGACAG	23	Vaiman <i>et al.</i> 1994
	AAAAGATGTGAGCTGGTTCTTG	23	
INRA11F	CGAGTTTCTTTCCTCGTGGTAGGC	25	Vaiman <i>et al.</i> 1992
	GCTCGGCACATCTTCTTAGCAAC	25	
SRCRSP11F	TGCCCCATCACACACATG	23	Kogi <i>et al.</i> 1995
	GTGGTTCTTTACGCTGAGCC	26	
ETH225F	GATCACCTTGCCACTATTTCT	23	Steffen <i>et al.</i> 1993
	ACATGACAGCCAGCTGCTACT	22	
ETH10F	G TTCAGGACTGGCCCTGCTAACA	24	Solinas-Toldo e Fries 1993
	CCTCCAGCCCACCTTCTCTCTC	24	
TGLA40F	GCTTCTCTGCCAACTAATATTATCC	25	Barendse <i>et al.</i> 1994
	CACCAGGTAAGCCCCTTATATATGT	25	
BOVIRBPF	CTATGATCACCTTCTATGCTTCC	23	Moore <i>et al.</i> 1991
	CCCTAAATACTACCATCTAGAAG	23	
SRCRSP08F	TGCGGTCTGTTCTGATTTAC	23	Bhebhe <i>et al.</i> 1994
	CCTGCATGAGAAAGTCGATGCTTAG	26	
SRCRSP05F	GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG	25	Arevalo <i>et al.</i> 1994
	TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	23	

I primer *forward* (F) sono stati marcati seguendo lo schema indicato in figura 4, le marcature sono state scelte in modo da massimizzare la possibilità di effettuare caricamenti multipli.

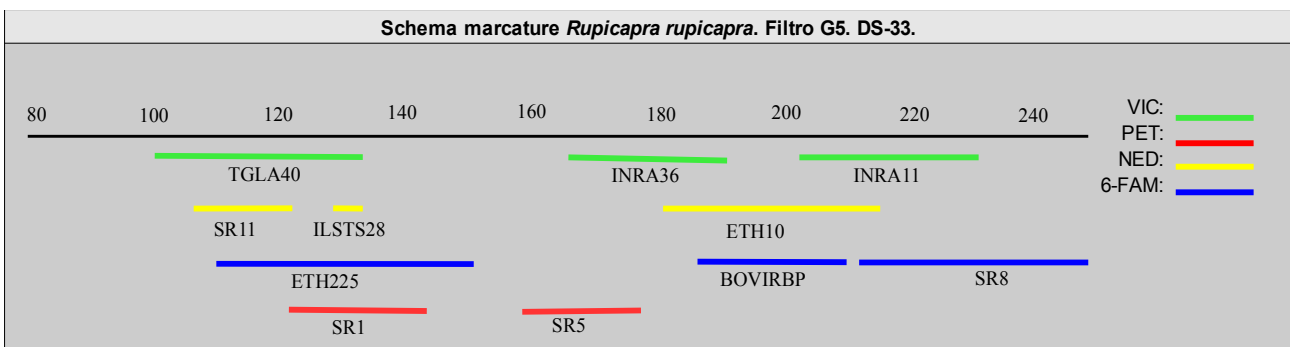


Figura 4: schema marcature e multiplex di caricamento.

Dopo l'amplificazione il DNA è stato caricato su analizzatore automatico del DNA AB 310 per l'analisi elettroforetica a capillare dei frammenti.

I genotipi dei singoli campioni sono stati determinati utilizzando i software Genescan (AB) e Genotyper (AB) e trasferiti su un foglio di calcolo (vedi file "Allegato2_TabellaSTR.xls" ed Allegato 2 nel presente documento) in cui vengono riportati per ciascun campione gli alleli identificati.

RISULTATI

Indici generali di variabilità genetica

In tabella 3 vengono riportati gli indici di variabilità genetica comunemente calcolati negli studi di genetica di popolazione. I calcoli sono stati effettuati considerando sia l'intero campione come un unico gruppo, corrispondente alla Provincia di Sondrio, o come tre gruppi, corrispondenti, rispettivamente ai campioni provenienti dalle aree a nord, ad ovest e a sud del fiume Adda. Questa suddivisione è stata effettuata dal momento che diversi autori (Crestanello *et al.* 2009, Soglia *et al.* 2010) hanno osservato una marcata strutturazione della variabilità genetica nelle popolazioni alpine di Camoscio. Tali autori indicano nella presenza di barriere geografiche (fiumi e valli) e nella marcata filopatria delle femmine di camoscio, le cause della struttura genetica osservata nelle loro ricerche, sia a livello del mtDNA che a livello dei microsatelliti. Il fatto che il campionamento della provincia di Sondrio è stato effettuato sia nei comprensori a nord che a sud del fiume Adda rappresenta una possibilità di verificare anche a livello microgeografico queste ipotesi. Nell'allegato 2 vengono indicati per ogni campione le aree di campionamento (Nord, Ovest, Sud) rispetto al fiume Adda.

Per quanto riguarda i dati riguardanti il set totale di dati, il DNA mitocondriale evidenzia che la diversità aplotipica ($H = 0.918 \pm 0.012$) e la diversità nucleotidica ($\pi = 0.012 \pm 0.0009$) si attestano su livelli elevati, tali livelli di variabilità sono confrontabili con quelli riscontrati nella vicina Provincia di Trento e nelle Alpi orientali (Pecchioli *et al.* 2006, 2009). Sono stati inoltre osservati un numero elevato di aplotipi ($k = 23$), tali aplotipi sono piuttosto differenziati, come indicano sia come il numero di siti polimorfici ($s = 26$) sia la

diversità nucleotidica (π). A livello dei microsatelliti si è evidenziato un significativo deficit di eterozigoti a livello globale, con valori di Fis significativamente maggiori di zero e tre loci in disequilibrio di Hardy-Weinberg, mentre suddividendo il campione nelle tre aree geografiche indicate precedentemente tale disequilibrio praticamente si annulla.

E' infine significativo il fatto che i campioni raccolti a sud dell'Adda mostrano livelli di variabilità minori rispetto ai campioni raccolti a nord e ad ovest, sia a livello del mtDNA che a livello dei microsatelliti (Tab. 3).

Il fatto che il numero di loci non all'equilibrio di Hardy-Weinberg sia maggiore nel campione globale (3) rispetto ai singoli comprensori (1) indica, probabilmente, la presenza di una certa sottostruttura di popolazione. Il disequilibrio osservato potrebbe, inoltre, essere spiegato con la presenza di alleli nulli o con un effetto casuale dovuto al campionamento. Analizzeremo separatamente con procedure statistiche appropriate sia l'eventuale presenza di alleli nulli sia la presenza di struttura di popolazione.

Tabella 3

Area	mtDNA				
	N	k	H \pm s.d.	s	$\pi \pm$ s.d.
Provincia SO	110	23	0.918 \pm 0.012	26	0.013 \pm 0.0009
Nord	47	15	0.899 \pm 0.022	13	0.0084 \pm 0.0009
Ovest	20	12	0.937 \pm 0.031	23	0.0163 \pm 0.0021
Sud	39	5	0.657 \pm 0.054	11	0.0130 \pm 0.0013

Tabella 3. Continua

Area	STR					
	N	ko	Ho	He	Fis	HWE
Provincia SO	128	7.36 \pm 1.07	0.616 \pm 0.198	0.649 \pm 0.204	0.05 ***	3
Nord	58	6.82 \pm 0.95	0.640 \pm 0.208	0.661 \pm 0.184	-0.006 ns	1
Ovest	27	6.63 \pm 0.82	0.663 \pm 0.209	0.645 \pm 0.207	-0.04 ns	0
Sud	43	5.46 \pm 0.80	0.556 \pm 0.217	0.576 \pm 0.211	-0.09 ns	1

Livello di significatività: * = P < 0.05, ** = P < 0.01, *** = P < 0.001, ns = non significativo. HWE: numero di loci che si scostano dalle frequenze attese secondo il principio di Hardy-Weinberg.

Box informativo 1**Indici di variabilità riportati in tabella 3 e software utilizzati per il loro calcolo**

Indici calcolati utilizzando il software **DNA SP v.5** (<http://www.ub.edu/dnasp>).

k: numero di aplotipi (alleli) mitocondriali diversi.

H: diversità genica, ovvero la probabilità che due aplotipi presi a caso dal campione siano diversi.

S: numero di siti polimorfici, ovvero numero di posizioni all'interno del D-loop dove sono state individuate delle mutazioni.

π : diversità nucleotidica, ovvero la probabilità che due nucleotidi scelti a caso siano diversi.

Indici calcolati utilizzando il software **Genepop 4.0** (<http://genepop.curtin.edu.au>) e **Genetix 4.05** (<http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>).

ko: numero medio di alleli su tutti i loci analizzati.

Ho: eterozigosità osservata, ovvero il rapporto tra individui eterozigoti ed il numero totale di individui analizzati nel campione. Un eterozigote è un individuo diploide che presenta due varianti alleliche diverse ad un determinato locus. Un omozigote è un individuo diploide che presenta due copie identiche della stessa variante allelica ad un determinato locus.

He: eterozigosità attesa, ovvero il rapporto di individui eterozigoti sul totale, è un valore teorico, calcolato secondo il principio di Hardy-Weinberg.

Fis: coefficiente di inbreeding, descrive la variabilità negli individui rispetto alla variabilità della relativa sottopopolazione, è correlato all'eterozigosità attraverso la formula $Fis = (He - Ho) / He$, Valori significativamente maggiori di zero indicano un difetto di eterozigoti nell'individuo rispetto alla sottopopolazione, si ha il contrario se i valori sono significativamente minori di zero.

Principio di Hardy-Weinberg: è un modello che permette di correlare le frequenze alleliche alle frequenze genotipiche, in una popolazione composta da individui diploidi a riproduzione sessuale, le cui generazioni non siano sovrapposte. Come molti modelli chiamati a descrivere una situazione complessa come la composizione genica di una popolazione, il principio di Hardy-Weinberg si basa su alcuni presupposti che semplificano (idealizzano) la situazione reale: gli incroci fra gli individui avvengono in maniera completamente casuale, non c'è migrazione di individui da altre popolazioni, la popolazione è costituita da un numero molto elevato di individui, da cui consegue che l'effetto della deriva genetica (*drift*) è trascurabile, non c'è selezione a carico degli individui, non c'è mutazione. Una popolazione con queste caratteristiche è detta in equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE), perché la sua composizione è costante nel tempo.

Variabilità tra popolazioni

Tutte le analisi volte a verificare l'eventuale differenziazione tra gruppi di campioni sono state effettuate considerando i tre gruppi descritti in precedenza come singole popolazioni, identificate come Nord (N), Ovest (O) e Sud (S), rispetto al fiume Adda. La differenziazione genetica tra popolazioni è stata studiata attraverso l'analisi molecolare della varianza (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), utilizzando sia gli indici classici di differenziazione genetica basati sulle frequenze alleliche e aploipiche (F_{st}), sia gli indici basati sulle distanze genetiche (R_{st} e Φ_{st}). I risultati (Tab. 4) indicano l'esistenza di una sostanziale disomogeneità tra i camosci di tutta la provincia, infatti quasi il 4% della F_{st} osservata ai microsatelliti è da imputare a differenze tra popolazioni, mentre addirittura il 20% circa della F_{st} osservata a livello del mtDNA è attribuibile alla differenziazione tra popolazioni, tutti i confronti sono altamente significativi (Tab. 4).

Il fatto che gli indici che incorporano le informazioni dovute alle mutazioni (Φ_{st} ed R_{st}) diano un valore inferiore rispetto a quello osservato calcolando la F_{st} indica che le differenze osservate non sono attribuibili a fenomeni evolutivi ma principalmente a fenomeni demografici abbastanza recenti.

Tabella 4

	mtDNA		STR	
	F_{st}	Φ_{st}	F_{st}	R_{st}
Ripartizione della varianza molecolare (%)				
Tra popolazioni (Nord, Ovest, Sud)	18.7	12.3	3.7	1.9
Entro popolazioni	81.8	87.7	96.3	98.1
Significatività	***	***	***	**

Livello di significatività: N.S.: non significativo, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

I valori delle distanze genetiche osservate tra le popolazioni (Tab. 5) indicano che le popolazioni Nord ed Ovest non sono significativamente differenziate a livello dei microsatelliti e solo debolmente differenziate a livello del mtDNA, mentre la popolazione a sud dell'Adda è significativamente differenziata dalle altre due su entrambi i marcatori. Questo risultato suggerisce che le popolazioni a sud dell'Adda possano essere

considerate geneticamente distinte dalle popolazioni a nord e ad ovest, le quali sono invece molto simili tra loro.

Tabella 5

		mtDNA (Fst)		
		Nord	Sud	Ovest
Microsatelliti (Fst)	Nord	-	0.219 ***	0.083 *
	Sud	0.045 ***	-	0.216 ***
	Ovest	0.006 N.S.	0.062 ***	-

I valori sotto la diagonale si riferiscono ai microsatelliti, i valori sopra si riferiscono al mtDNA. Livello di significatività: N.S.: non significativo, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

Analisi della struttura filogeografica

Lo studio della filogeografia, ovvero della distribuzione geografica degli aplotipi mitocondriali, rappresenta il passo successivo di un'analisi più approfondita. Nelle popolazioni naturali, infatti, si può osservare una correlazione tra le sequenze del DNA e le origini geografiche del campione. Ci si aspetta infatti di osservare che i campioni provenienti da aree limitrofe siano più simili tra di loro ed, all'aumentare delle distanze geografiche, è atteso un aumento delle differenze in termini di mutazioni o di frequenze aplotipiche. Scostamenti da questo modello possono essere indicativi della presenza di barriere geografiche, di migrazione o di rilasci effettuati utilizzando individui con alleli diversi.

Tabella 5

Aplotipo	Popolazione		
	Nord	Ovest	Sud
Hap_1	3	1	0
Hap_2	1	3	0
Hap_3	0	3	9
Hap_4	2	3	0
Hap_5	2	1	0
Hap_6	0	1	0
Hap_7	0	1	0
Hap_8	0	1	0
Hap_9	3	1	0
Hap_10	0	3	0
Hap_11	10	1	0
Hap_12	8	1	0
Hap_13	7	0	0
Hap_14	0	0	19
Hap_15	0	0	8
Hap_16	1	0	0
Hap_17	1	0	0
Hap_18	0	1	0
Hap_19	1	0	0
Hap_20	4	0	0
Hap_21	0	0	1
Hap_22	0	0	1
Hap_23	1	0	0
Hap_24	2	0	0
Hap_25	1	0	0
Totale	47	21	38

Come già evidenziato dall'AMOVA nel paragrafo precedente, la variabilità genetica osservata nei campioni della Provincia di Sondrio è distribuita in maniera particolarmente disomogenea nel territorio, tale disomogeneità è particolarmente evidente nella tabella 5, dalla quale si evince che i campioni delle popolazioni Nord ed Ovest condividono 7 aplotipi su 20 (35%), mentre la popolazione del Sud condivide un solo aplotipo su 24 (4%) con le popolazioni Nord ed Ovest.

Questi dati confermano le teorie proposte da vari autori (Crestanello *et al.* 2009, Soglia *et al.* 2010) che individuano nelle valli delle barriere geografiche che rendono difficoltosa la migrazione e riducono, quindi, il flusso genico tra le popolazioni localizzate nei lati opposti della valle stessa. Nel caso della provincia di Sondrio la valle del fiume Adda sembra rappresentare una barriera particolarmente difficile da superare. Va sottolineato che il mtDNA essendo ereditato per via materna, ci da una rappresentazione parziale della dinamica di popolazione, quella a carico delle femmine.

Diversi autori (Pecchioli *et al.* 2006, Crestanello *et al.* 2009) hanno identificato nell'arco alpino alcune popolazioni probabilmente ibride, nelle quali individui morfologicamente classificati come camosci alpini (*R. r. rupicapra*) hanno invece evidenziato aplotipi mitocondriali tipici di *R. r. pyrenaica*. Sembra plausibile che tale introgressione sia riconducibile ad eventi di reintroduzione effettuati principalmente nelle Alpi orientali utilizzando individui provenienti dalle Alpi occidentali, nelle cui popolazioni sono particolarmente diffusi aplotipi appartenenti al gruppo *R. r. rupicapra*. Allo scopo di individuare nella provincia di Sondrio eventuali individui introgressi, gli aplotipi ottenuti nel presente studio sono stati confrontati con un set di aplotipi ottenuti da Rodriguez *et al.* (2010), rappresentativi di un ampio campionamento delle varie sottospecie di Camoscio distribuite in Europa ed Asia. I risultati (Fig. 5) indicano che tutti i campioni della provincia di Sondrio appartengono alla sottospecie *R. r. rupicapra*, indicati in colore blu nella figura 5, escludendo pertanto la presenza di individui introgressi nelle aree oggetto di studio.

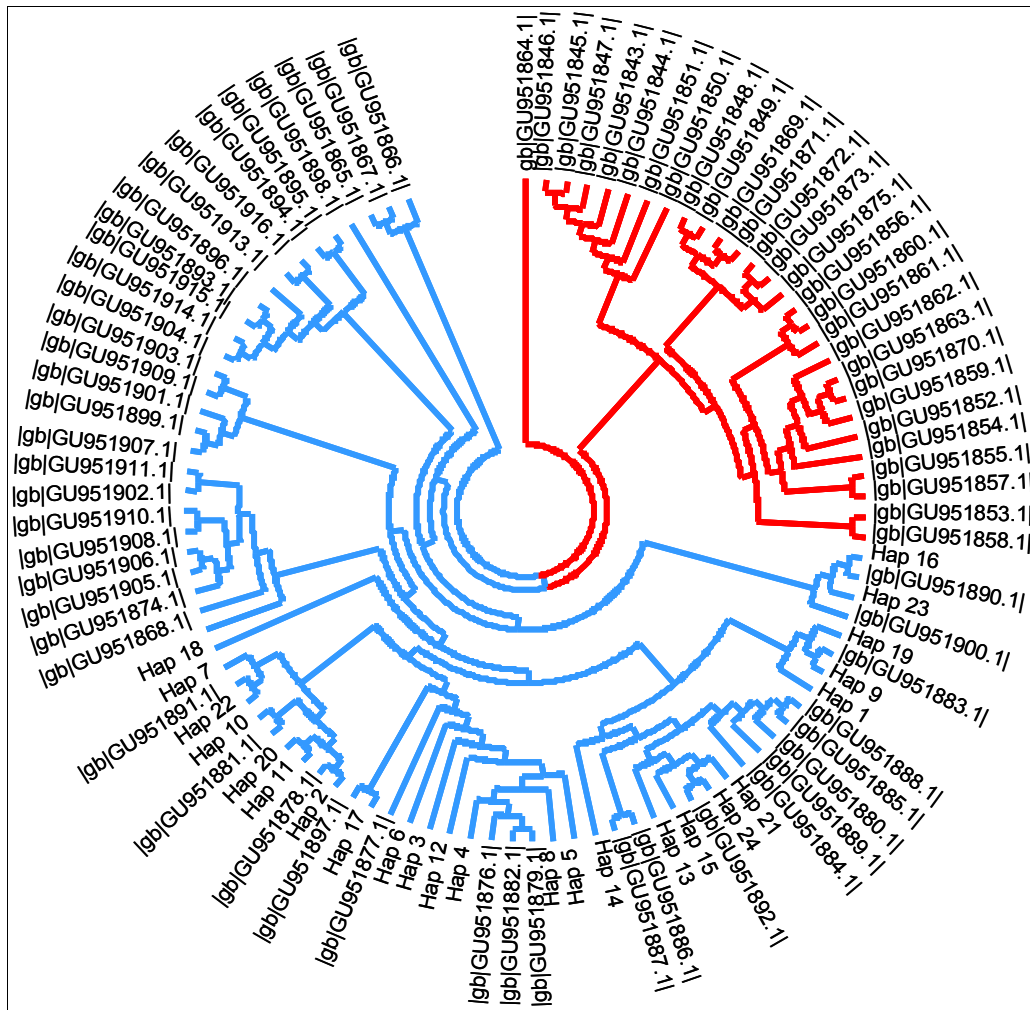


Figura 5: albero filogenetico degli aplotipi mitocondriali ottenuti nel presente studio (indicati con il prefisso "Hap") ed in Rodriguez et al. (2010, indicati con il prefisso "gb"). In blu sono indicati gli aplotipi appartenenti alla sottospecie *R. rupicapra*, in rosso gli aplotipi appartenenti alle sottospecie *R. pyrenaica*.

Analisi dei microsatelliti

Lo studio della struttura di popolazione attraverso l'analisi degli STR, è quasi sempre effettuato presumendo che le popolazioni in analisi siano in equilibrio di Hardy-Weinberg. Come evidenziato nel paragrafo "Indici generali di variabilità genetica", i valori di Fis indicano degli scostamenti significativi delle frequenze alleliche osservate da quelle predette secondo tale principio. Ciò potrebbe essere causato dalla presenza di struttura geografica, dalla presenza di alleli nulli e, infine, anche dall'effetto di eventuali introduzioni di individui alloctoni. Il primo passo per una corretta analisi degli STR è l'identificazione dei

possibili loci con alleli nulli. L'analisi, effettuata sulle popolazioni Nord, Ovest e Sud separatamente, non ha evidenziato la presenza di alleli nulli nelle tre popolazioni contemporaneamente, quindi tutti i loci sono stati inclusi nelle analisi statistiche che si basano esclusivamente sull'equilibrio di Hardy-Weinberg.

La presenza di struttura di popolazione è stata quindi verificata utilizzando l'approccio dell'analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC) e della statistica bayesiana. Tali approcci prescindono dalla definizione a priori della struttura genetica, come invece è necessario nell'AMOVA, e utilizzano i singoli individui, rappresentati dai rispettivi genotipi multilocus come unità di analisi.

In figura 6 sono illustrati i risultati dell'AFC, che ha confermato quanto osservato in precedenza con l'AMOVA, infatti è possibile apprezzare una certa distinzione tra i campioni della popolazione a Sud dell'Adda rispetto alle popolazioni a Nord e ad Ovest, le quali mostrano una distribuzione dei genotipi multilocus praticamente sovrapponibile.

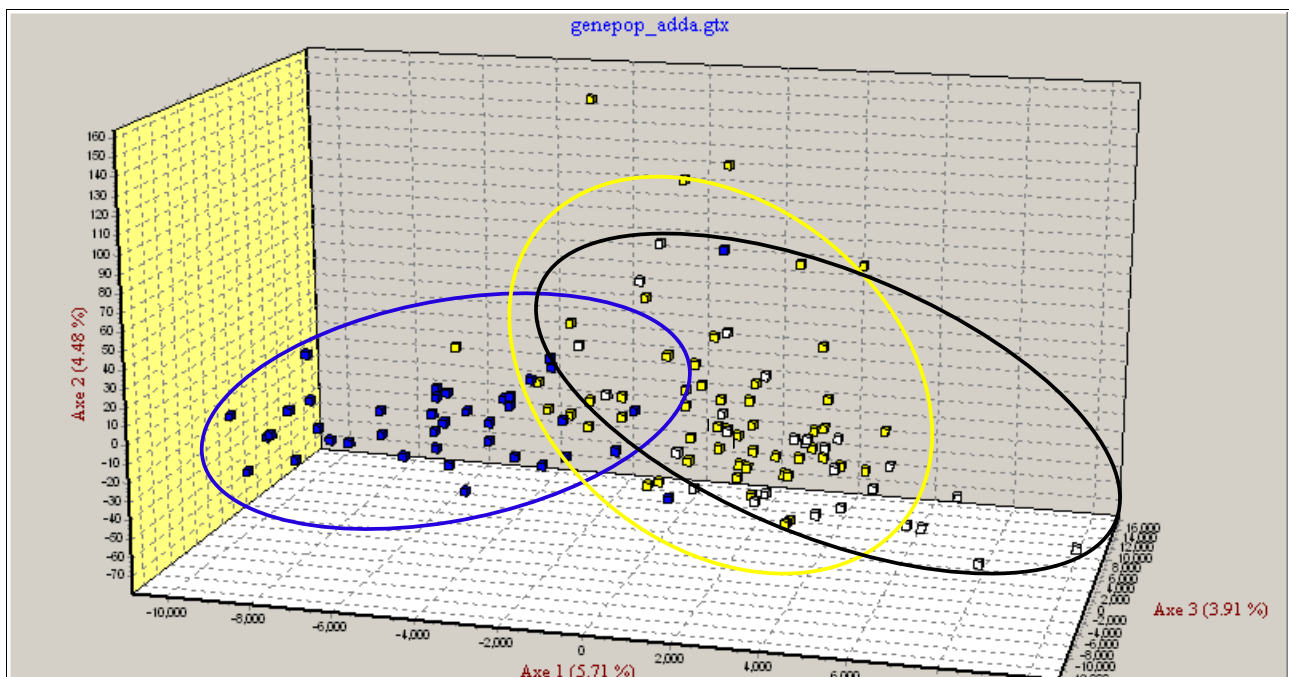


Figura 6: analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC) effettuata sui singoli genotipi multilocus. I campioni appartenenti alla stessa popolazione sono indicati con lo stesso colore. Le ellissi, tracciate arbitrariamente, servono ad evidenziare le distribuzioni dei campioni dei diversi comprensori. Colore ellissi: blu: SUD, giallo: NORD, nero: OVEST.

L'analisi bayesiana ha indicato una struttura a 2 popolazioni ($K = 2$) come la più probabile

ed adeguata per descrivere la struttura di popolazione della provincia di Sondrio. Anche questa analisi prescinde da qualunque ipotesi a priori sulla struttura di popolazione e presume che le popolazioni individuate siano in equilibrio di Hardy-Weinberg. I singoli campioni vengono così suddivisi in K gruppi, predefiniti dall'utente e la decisione finale sul modello più probabile è fatta sulla base della probabilità che il software Structure associa ad ogni valore di K. In tabella 6 sono riportate le proporzioni di appartenenza di ciascun individuo proveniente da uno dei 3 gruppi predefiniti (Nord, Ovest, Sud) in uno dei due raggruppamenti individuati dal software. Quasi l'80% dei campioni della popolazione Nord e oltre il 90% dei campioni della popolazione Ovest vengono raggruppati nel gruppo 1, mentre quasi il 90% dei campioni della popolazione Sud vengono raggruppati nel cluster 2. Questi risultati indicano chiaramente che il fiume Adda rappresenta una barriera geografica che isola le popolazioni poste sui due lati della valle.

Tabella 6

Popolazione	Gruppo 1	Gruppo 2	N° individui
Nord	0.842	0.158	58
Ovest	0.133	0.867	40
Sud	0.913	0.087	24
Sconosciuto	0.491	0.509	6

In figura 7 sono rappresentati graficamente i risultati ottenuti per $K = 2$ per ogni individuo analizzato. È evidente come la maggior parte dei campioni provenienti dalle aree a Nord e ad Ovest dell'Adda siano raggruppati in un unico cluster, distinto dal raggruppamento dei campioni provenienti da Sud.

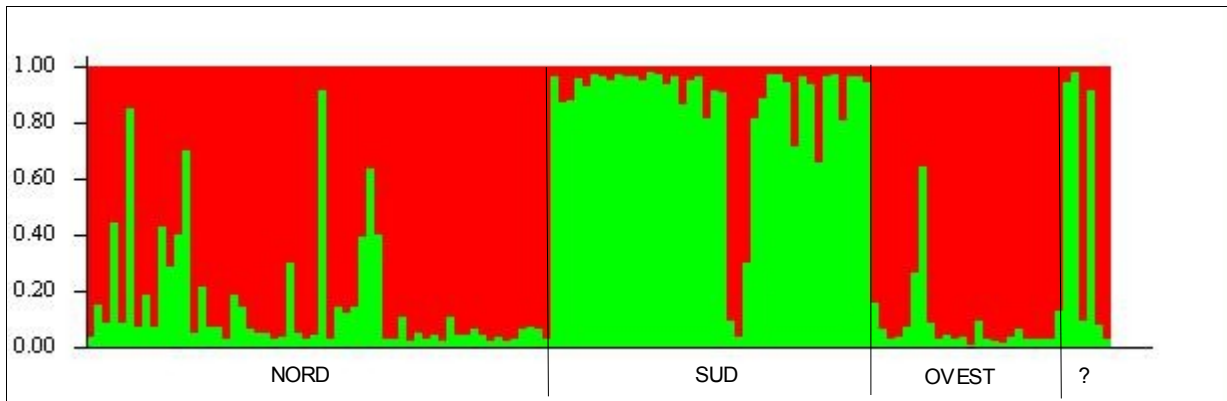


Figura 7: Proporzioni di appartenenza di ciascun individuo in uno dei due raggruppamenti, indicati in rosso ed in verde, individuati dal software Structure. Vengono indicate inoltre le popolazioni di origine.

Dalla figura 7 è inoltre possibile verificare anche la presunta appartenenza ad uno dei due gruppi dei campioni privi di identificativo di origine. In tabella 8 vengono forniti i dati identificativi di ciascun campione incognito e la relativa probabilità di associazione alle aree Nord / Ovest o Sud.

Tabella 8

Codice interno	Identificativo	Probabilità di associazione	
		Nord/Ovest	Sud
55	217 - Sondrio	0.02	0.98
65	?	0.9	0.1
78	?	0.08	0.92
98	?	0.92	0.08
128	156/09	0.97	0.03

I risultati ottenuti confermano quindi le ipotesi proposte da Pecchioli *et al.* (2006), Crestanello *et al.* (2009), Soglia *et al.* (2010) circa l'esistenza di ben definite barriere geografiche che determinano una struttura filogeografica piuttosto marcata, anche a livello microgeografico, nelle popolazioni alpine di camoscio.

Box informativo 2**Metodi e software utilizzati**

AMOVA: analisi molecolare della varianza (Excoffier *et al.* 1992). La variabilità genetica osservata viene scomposta in vari livelli gerarchici (Entro popolazione, tra popolazioni, tra gruppi di popolazioni) e le significatività delle differenze osservate vengono testate statisticamente. Software utilizzato: Arlequin 2002 (<http://anthro.unige.ch/software/arlequin>).

Fst, Φ st e Rst: indici di differenziamento genetico. Genericamente indicano la differenza di eterozigosità tra diversi gruppi gerarchici (tra individui rispetto alla popolazione). Assume valori compresi tra 0 e 1, dove 0 rappresenta l'assenza di differenziazione e 1 rappresenta il massimo della differenziazione. Secondo lo schema classico livelli di Fst inferiori a 0.05 indicano bassi livelli di differenziazione, valori di Fst compresi tra 0.05 e 0.15 indicano livelli intermedi mentre livelli superiori a 0.15 indicano grande differenziazione genetica. Gli indici classici (Fst) vengono calcolati considerando solamente le differenze delle frequenze alleliche, mentre gli indici basati sulle distanze molecolari (Rst e Φ st) considerano anche le differenze in termini di numero di mutazioni. Software utilizzato: Arlequin 2001 (<http://anthro.unige.ch/software/arlequin>).

Network di aplotipi: metodo utilizzato per valutare le relazioni tra aplotipi mitocondriali all'interno di una popolazione. E' particolarmente adatto a valutare la struttura genetica intra-popolazione dal momento che è in grado di visualizzare, attraverso la creazione di un network di relazioni tra aplotipi, anche le reticolazioni prodotte da eventi di mutazione multipla e dal fatto che coesistono, all'interno del medesimo gruppo, sia aplotipi ancestrali che aplotipi derivati per mutazione. Nel nostro caso il network è stato ricostruito utilizzando il metodo della parsimonia statistica (Templeton *et al.* 1992). Software utilizzato: TCS 1.21 (<http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html>).

Analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC): Tecnica basata sull'analisi multivariata, attraverso la quale vengono rappresentate le distanze genetiche tra i singoli individui (rappresentati dal loro genotipo multilocus, Benzécri, 1973). Ogni singolo allele di un locus rappresenta una variabile e gli individui, codificati in base alla presenza/assenza di tale variabile, vengono rappresentati in uno spazio composto da N dimensioni, dove N rappresenta il numero di variabili. Nello spazio ad N dimensioni ci saranno delle dimensioni che hanno una maggior importanza nel descrivere i rapporti tra i vari punti, da queste, tramite calcoli statistici, vengono costruiti gli assi fattoriali, che sono delle combinazioni lineari delle misure primarie. Gli individui vengono infine rappresentati da una nuvola di punti dispersi nello spazio determinato dai due o tre principali assi fattoriali. Software utilizzato: Genetix 4.05 (<http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>).

Continua. Box informativo 2.

Analisi bayesiana: permette di effettuare inferenze statistiche sulla base di modelli stabiliti a priori e di incorporare tali informazioni con i dati empirici per ottenere una distribuzione a posteriori delle variabili di interesse. Il modello qui testato prevede l'esistenza di K popolazioni (sconosciute) alle quali vengono assegnati i singoli individui in modo da massimizzare l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Gli individui possono anche essere assegnati a più di una popolazione. Verificando una serie di valori di K si determina empiricamente il numero più probabile di popolazioni e, contemporaneamente, la proporzione di appartenenza di ciascun individuo alle stesse (Pritchard *et al.* 2000). Software utilizzato: Structure 2.3 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>).

Utilizzo a scopo forense dei microsatelliti

Negli ultimi anni si è sviluppato il settore della genetica forense anche nel campo animale in casi di bracconaggio, importazione/esportazione illegale di animali appartenenti a specie protette, furto di esemplari rari o pregiati, rinvenimento di reperti di origine animale alla scena di un crimine, frode alimentare, falsificazione di pedigree. L'utilizzo dei marcatori molecolari per tali scopi impone tuttavia la validazione preliminare del set di loci STR che si intende utilizzare, ed in particolare la creazione di un database che comprenda la maggior parte degli alleli osservabili e che permetta la determinazione del numero di loci necessari per avere rilevanza statistica nelle procedure di identificazione individuale e di attribuzione della parentela. In tabella 9 sono riportati alcuni indici riassuntivi della variabilità genetica utilizzati per il calcolo del potere discriminatorio del set di loci prescelto.

Tabella 9

Locus	N° alleli	He	Ho	PIC	PE	PID	PID Sib
BOVIRBP	10	0,84	0,85	0.84	0,86	0,04	0,33
ETH10	5	0,56	0,55	0.56	0,46	0,25	0,53
ETH225	5	0,63	0,64	0,63	0,57	0,18	0,48
ILSTS28	3	0,32	0,32	0,32	0,25	0,49	0,71
INRA11	14	0,80	0,81	0,80	0,83	0,05	0,36
INRA36	8	0,82	0,84	0,82	0,82	0,05	0,35
SR1	5	0,38	0,32	0,38	0,34	0,40	0,66
SR11	6	0,70	0,64	0,70	0,65	0,13	0,42
SR5	7	0,77	0,64	0,77	0,75	0,08	0,38
SR8	13	0,86	0,74	0,86	0,89	0,03	0,32
TGLA40	5	0,38	0,39	0,38	0,35	0,40	0,32
Totale	----	----	----	----	0.99	$1.7 \cdot 10^{-10}$	$1.8 \cdot 10^{-4}$
Media \pm s.e.	7.36 ± 1.07	0.65 ± 0.06	$0,61 \pm 0.06$	----	----	----	----

Gli indici mostrano come 8 loci su 11 abbiano un *Polymorphic Information Content* (PIC) maggiore di 0.5. I loci che mostrano tali livelli di PIC sono considerati come altamente informativi, e pertanto adatti all'utilizzo per scopi di identificazione individuale. La probabilità di identità totale (PID) indica che il set di loci utilizzato è in grado di discriminare i singoli individui tramite il loro genotipo con una probabilità di $1.7 \cdot 10^{-10}$ (1.7 su 10 miliardi circa) nel caso di individui non imparentati (PID), o di $1.8 \cdot 10^{-4}$ (1.8 su 10000) nel caso di individui imparentati tra loro (PID Sib).

La probabilità di identità, in definitiva, indica la probabilità che due reperti biologici dai quali sia stato estrapolato lo stesso profilo genetico siano effettivamente riconducibili allo stesso individuo. Questo valore è quindi di fondamentale importanza nelle analisi a scopo forense, dove, ad esempio, una traccia ematica rinvenuta sul luogo di un bracconaggio debba essere confrontata con dei reperti sequestrati nel congelatore di un presunto bracconiere.

Il set di loci analizzato si è inoltre dimostrato in grado di rendere statisticamente significativi i risultati delle procedure atte a verificare i rapporti di parentela, dal momento che la probabilità di esclusione (PE) totale dei loci analizzati è pari a 0.99999.

Box informativo 3**Indici di variabilità riportati in tabella 9 e software utilizzati per il loro calcolo**

Indici calcolati utilizzando il software GenAIEx 6.1 (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx>).

Polymorphic information content (PIC) : capacità di un locus di discriminare individui diversi sulla base della distinzione degli alleli. In letteratura è a volte riportata anche come discriminating power (DP).

Power of exclusion (PE): nei test di parentela rappresenta la probabilità di escludere come genitore un individuo preso a caso dalla popolazione.

Probability of identity (PID): probabilità che due individui distinti, non legati da alcun rapporto di parentela, abbiano lo stesso genotipo multilocus.

Probability of identity siblings (PID Sib): probabilità che due individui distinti, legati da un certo grado di parentela, abbiano lo stesso genotipo multilocus.

Conclusioni

I risultati ottenuti dall'analisi di un campione di 120 camosci alpini ha evidenziato la presenza di un buon grado di differenziazione tra la popolazione localizzata a sud del fiume Adda e le popolazioni localizzate a nord. Tale risultato complementa le evidenze accumulate grazie alle ricerche effettuate negli ultimissimi anni da altri autori sulla filogeografia dei mammiferi dell'arco alpino. Tali autori (Soglia et al. 2010, Crestanello et al. 2009, Pecchioli et al. 2006) individuano nei fiumi Ticino, Adda ed Adige delle barriere in grado di strutturare in maniera significativa la distribuzione della variabilità genetica in varie specie di mammiferi. Il presente studio, tuttavia, è l'unico che analizza a livello microgeografico tale struttura. Le popolazioni a nord / ovest risultano significativamente differenziate sia al livello dei microsatelliti che al livello del mtDNA. La differenziazione a livello del mtDNA è particolarmente marcata. Tale risultato va analizzato alla luce della filopatria delle femmine di camoscio. Il mtDNA, infatti, essendo ereditato per via materna è sensibile in maniera particolare al comportamento riproduttivo delle femmine.

Considerata la presenza di questa marcata struttura filogeografica è importantissimo valutare con attenzione eventuali operazioni di traslocazione e rilascio di animali, a favore di pratiche più conservative.

Si è inoltre impostata, attraverso questo lavoro, la creazione di un database genetico, particolarmente prezioso per lo studio della biologia delle popolazioni alpine e per la loro gestione. Le tecniche molecolari stanno diventando infatti sempre più diffuse ed il loro costo è in costante diminuzione. Questo permetterà l'avvio di progetti di monitoraggio, sia su piccola che su grande scala. L'esistenza di database di riferimento è un prerequisito fondamentale per l'armonizzazione di questi futuri progetti e per l'ampliamento del database stesso. Sarebbe a tale scopo auspicabile la georeferenziazione mediante GPS dei campioni inseriti nel database, in modo da incorporare nel database anche dati di importante valore per lo studio dell'eco-etologia della specie.

Si è infine dimostrata la validità del database per l'utilizzo nella pratica della genetica forense, il cui utilizzo si sta ormai diffondendo anche in casi di bracconaggio con esiti decisamente buoni dal punto di vista della determinazione delle evidenze a carico di presunti sospetti di reati di bracconaggio o frode alimentare.

BIBLIOGRAFIA

- Arevalo E. *et al.* 1994. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-1, SR-CRSP-2, SR-CRSP-3, SR-CRSP-4 and SR-CRSP-5 loci. *Animal Genetics* 25: 202.
- Barendse W. *et al.* 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*, 6: 227-235.
- Bhebhe E, Kogi J, Holder DA, Arevalo E, Derr JN, Linn RA, Ruvuna F, Davis SK, Taylor JF. 1994. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-6, SR-CRSP-7, SR-CRSP-8, SR-CRSP-9 and SR-CRSP-10 loci. *Animal Genetics* 25: 203.
- Benzécri JP. 1973. L'Analyse des Données: T. 2, l'Analyse des correspondences. Paris: Dunod.
- Bishop M D *et al.* 1994. A Genetic Linkage Map for Cattle. *Genetics*, Vol 136: 619-639.
- Brunhoff C, Galbreath KE, Federov VB, Cook JA, Jaarola M. 2003. Holartic phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*): implications for late Quaternary biogeography of high latitudes. *Molecular Ecology*, 12: 957-968.
- Carnevali L., Pedrotti L., Riga F., Toso S. 2009. Banca Dati Ungulati. Status, distribuzione, consistenza, gestione, prelievo venatorio e potenzialità delle popolazioni di Ungulati in Italia. *Biol. Cons. Fauna*, 117: 1-168.
- Crestanello *et al.* 2009. The genetic impact of translocations and habitat fragmentation in Chamois (*Rupicapra*) spp. *Journal of Heredity*, 100: 691-708.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247-276.

- Hewitt GM. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 87-112.
- Kemp *et al.* 1995. A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers *Animal Genetics* 26: 299-306.
- Kogi J, Yeh CC, Bhebhe E, Burns BM, Ruvuna F, Davis SK, Taylor JF. 1995. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-11, SRCRSP-12, SR-CRSP-13, SR-CRSP-14 and SR-CRSP-15 loci. *Animal Genetics* 26: 449.
- Miller *et al.* 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215.
- Moore SS, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M, Hetzel DJ. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10: 654-660.
- Pecchioli E, Vernesi C, Crestanello B, Caramelli D, Bertorelle G, Hauffe HC. 2006. Progetto Faunagen. Conservazione e gestione della fauna: un approccio genetico. Report Centro Ecologia Alpina 35.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Soglia D. *et al.* 2010. Population genetic structure of Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) in the Italian Alps. *Eur. J. Wildl. Res.* 56: 845-854.
- Solinas-Toldo S, Fries R. 1993. Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mammalian Genome* 4: 720-727.
- Steffen P, Eggen A, Dietz AB, Womack JE, Stranzinger G, Fries R. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics* 24: 121-124.
- Stewart JR, Lister AM. 2001. Cryptic northern refugia and the origins of modern biota. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 608-613.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cossons J-F. 1998. Comparative phylogeography and post-glacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453-464.

- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and dna sequence data. iii. cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Toso S. 2002. Mammiferi d'Italia. Quaderni di conservazione della Natura, 14, Min. Ambiente. A cura di Spagnesi M. e De Marinis A.
- Vaiman D. *et al.* 1994. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm. Genome*. 5: 288-297.

ALLEGATI

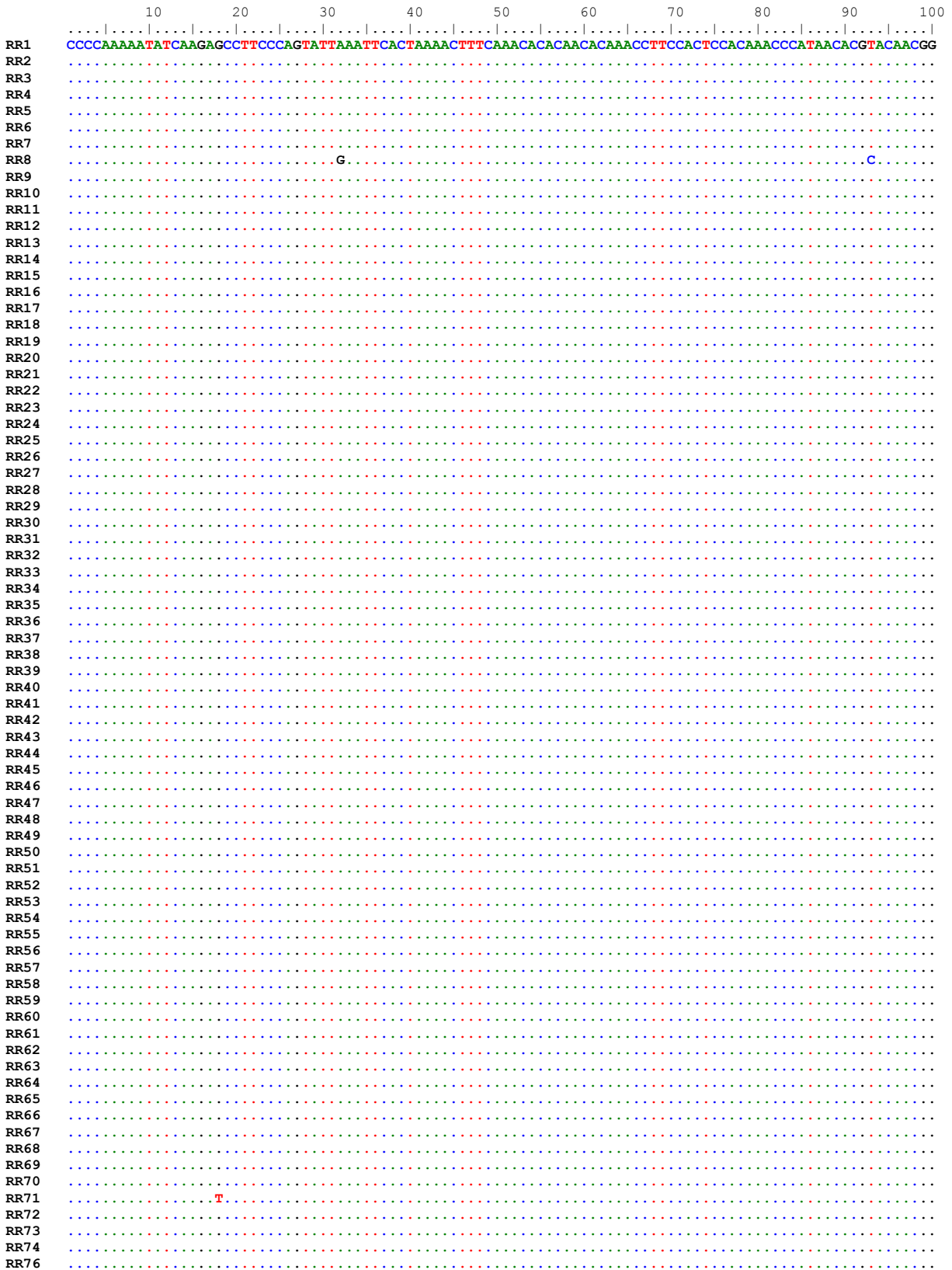
Allegato 1

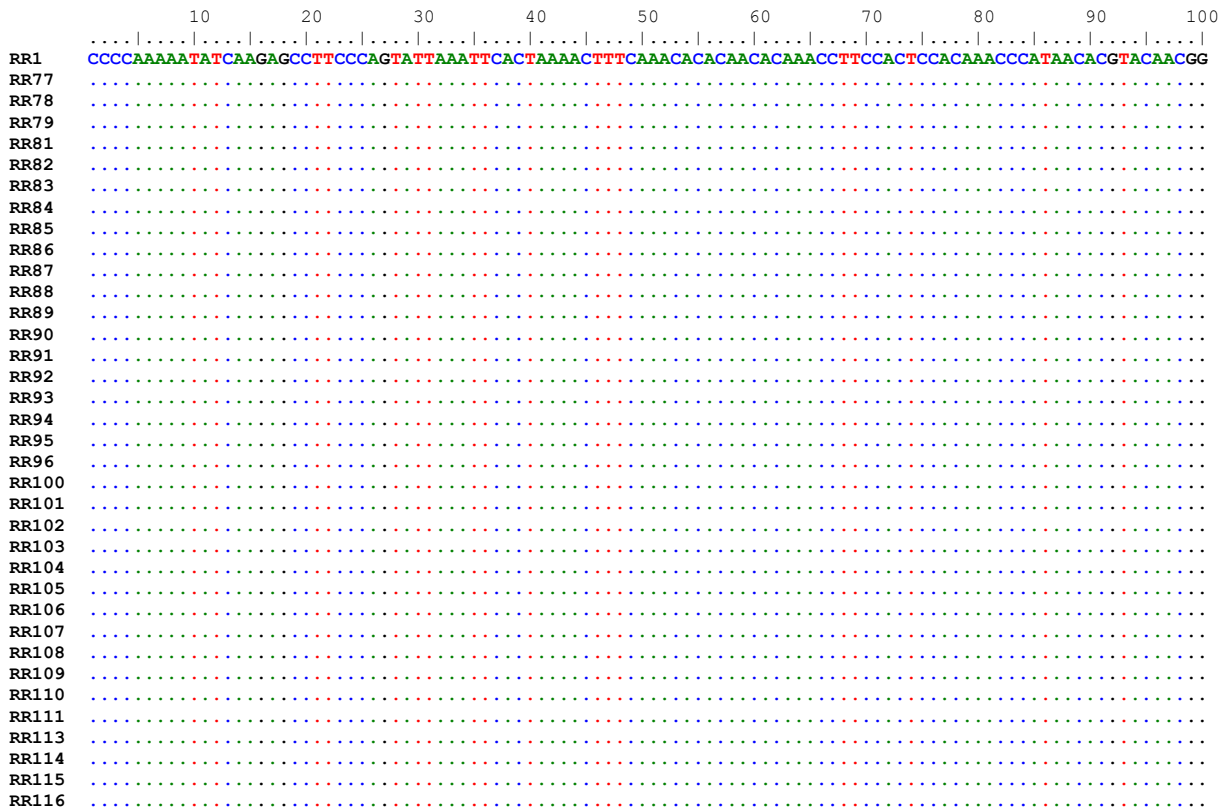
Allineamento del frammento di D-loop. I punti indicano posizioni identiche rispetto alla sequenza di riferimento RR1. I campioni sono identificati con una codifica interna la cui conversione è riportata nell'allegato 2.

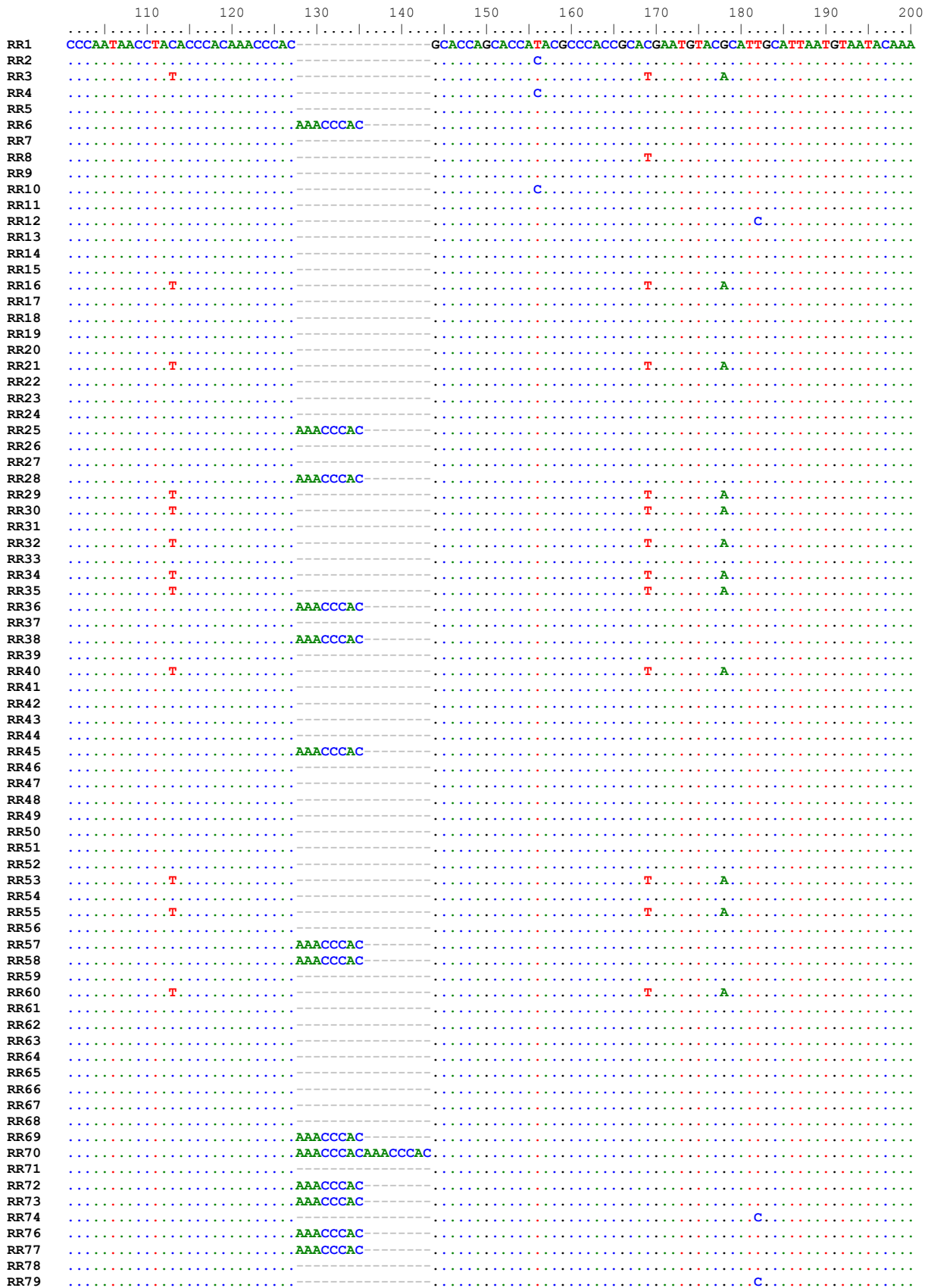
Allegato 2

Tabella alleli. Viene riportato in colonna 1 l'identificativo interno dei campioni. In colonna 4 è indicata la popolazione di origine con i prefissi N (Nord), O (Ovest), S (Sud). In colonna 5 è indicato l'aplotipo mitocondriale.

Allegato 1







	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																
RR1	CCC	AAT	AACCT	TAC	ACCC	CAAA	ACCAC	GC	ACC	AGC	ACC	TAC	GCC	CC	CGC	CGA	ATG	TAC	GC	ATT	GC	ATA	ATG	TA	AT	CAAA
RR81																										
RR82																										
RR83																										
RR84																										
RR85																										
RR86																										
RR87																										
RR88																										
RR89																										
RR90																										
RR91																										
RR92																										
RR93																										
RR94																										
RR95																										
RR96																										
RR100																										
RR101																										
RR102																										
RR103																										
RR104																										
RR105																										
RR106																										
RR107																										
RR108																										
RR109																										
RR110																										
RR111																										
RR113																										
RR114																										
RR115																										
RR116																										

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300				
RR1	CGTGGTATG	TACATAGT	TACATTAC	TGGCTTG	CCCCATG	CGGTAT	AAGCATG	TACATAGT	TATTATG	TATACGG	CATAA	TATAGT	TACAT	TAAA
RR2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR3	T	A	T	A	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T
RR4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR5	T	T	T	T	T	A	T	T	C	T	T	T	T	T
RR6	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR7	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR8	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	T
RR9	T	T	T	T	T	A	T	T	C	T	G	T	T	T
RR10	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR11	T	T	T	T	T	A	T	T	C	T	T	T	T	T
RR12	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T
RR13	T	T	T	T	T	A	T	T	C	T	T	T	T	T
RR14	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	T
RR15	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	T
RR16	T	A	T	A	T	G	T	T	C	T	T	T	T	T
RR17	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	T
RR18	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR19	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR20	T	T	T	T	T	A	T	T	C	T	T	T	T	T
RR21	T	A	T	A	T	G	T	T	C	T	T	T	T	T
RR22	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR23	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR24	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR25	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR26	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR27	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR28	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR29	T	A	T	A	T	G	T	T	C	T	T	T	T	T
RR30	T	A	T	A	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T
RR31	T	A	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR32	T	A	T	A	T	G	T	T	C	T	T	T	T	T
RR33	T	A	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR34	T	A	T	A	T	G	T	T	C	T	T	T	T	T
RR35	T	A	T	A	T	G	T	T	C	T	T	T	T	T
RR36	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR37	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T
RR38	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR39	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T
RR40	T	A	T	A	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T
RR41	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR42	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR43	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR44	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR45	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR46	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR47	T	T	T	T	T	A	T	T	C	T	T	T	T	T
RR48	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR49	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR50	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR51	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR52	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR53	T	A	T	A	T	G	T	T	C	T	T	T	T	T
RR54	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR55	T	A	T	A	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T
RR56	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR57	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR58	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR59	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T
RR60	T	A	T	A	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T
RR61	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR62	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR63	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR64	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR65	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR66	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR67	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR68	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T
RR69	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR70	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR71	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR72	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR73	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR74	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR76	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR77	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
RR78	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
RR79	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
RR1	CGTGGTATGTACATAGTACATTACATGGCTTGCCCATGCGTATAAGCATGTACATAGTATTATGTATTACGGACATAATATGTATATAGTACATAAA									
RR81	T									
RR82	T							C	T	
RR83	T	A		A		G		C		
RR84	T							C	T	
RR85	T									
RR86	T	A		A		G		C		
RR87	T							C	T	
RR88	T							C	T	
RR89	T							C	T	G
RR90	T							C	T	
RR91	T			A						
RR92	T	A		A		G		C		
RR93	T							C		
RR94	T							C	T	
RR95	T							C		
RR96	T							C		
RR100	T							C		
RR101	T							C		
RR102	T							C		
RR103	T							C		
RR104	T							C	T	
RR105	T					A				
RR106	T							C	T	
RR107	T							C	T	
RR108	T							C	T	
RR109	T							C	T	
RR110	T							C	T	
RR111	T							C		
RR113	T							C		
RR114	T							C		
RR115	T					A		C	T	
RR116	T							C	T	

	310	320	330	340
RR1	CGA	TTTCCCCTTGCATATAAGCAAGCACTGGAAGTGGTC		
RR2	T		T	G
RR3	T		T	GA
RR4	T		T	G
RR5	T		T	G
RR6	T		T	
RR7	T		T	G
RR8	T		T	
RR9	T		T	G
RR10	T		T	G
RR11	T		T	G
RR12	T		T	G
RR13	T		T	G
RR14			T	
RR15			T	
RR16	T		T	GA
RR17			T	
RR18	T		T	G
RR19			T	
RR20	T		T	G
RR21	T		T	GA
RR22	T		T	G
RR23	T		T	G
RR24	T		T	GG
RR25	T		T	
RR26	T	C	T	G
RR27	T	C	T	G
RR28	T		T	
RR29	T		T	GA
RR30	T		T	GA
RR31	T		T	G
RR32	T		T	GA
RR33	T		T	G
RR34	T		T	GA
RR35	T		T	GA
RR36	T		T	
RR37	T		T	G
RR38	T		T	
RR39	T		T	G
RR40	T		T	GA
RR41	T	C	T	G
RR42	T		T	G
RR43	T		T	G
RR44	T	C	T	G
RR45	T		T	
RR46	T	C	T	G
RR47	T		T	G
RR48	T	C	T	G
RR49	T		T	GG
RR50	T		T	G
RR51			T	
RR52	T		T	G
RR53	T		T	GA
RR54	T		T	G
RR55	T		T	GA
RR56	T		T	G
RR57	T		T	
RR58	T		T	
RR59	T		T	G
RR60	T		T	GA
RR61	T		T	G
RR62	T		T	G
RR63	T	C	T	G
RR64	T		T	G
RR65	T	C	T	G
RR66	T		T	GG
RR67	T		T	GG
RR68	T		T	G
RR69	T		T	
RR70	T		T	
RR71	T		T	G
RR72	T		T	
RR73	T		T	
RR74	T		T	G
RR76	T		T	
RR77	T		T	
RR78	T		T	G
RR79	T		T	G

```

          310      320      330      340
          |...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
RR1      CGATTTTCCCCTTGCATATAAGCAAGCACTGGAAGTGGTC
RR81     .....T.....
RR82     T.....
RR83     T.....G.....
RR84     T.....
RR85     .....T.....
RR86     T.....GA.....
RR87     T.....
RR88     T.....
RR89     T.....
RR90     T.....
RR91     T.....G.....
RR92     T.....GA.....
RR93     T.....G.....
RR94     T.....
RR95     T.....GG.....
RR96     T.....GG.....
RR100    T.....GG.....
RR101    .....T.....
RR102    T.....G.....
RR103    .....T.....
RR104    T.....
RR105    T.....G.....
RR106    T.....
RR107    T.....
RR108    T.....
RR109    T.....G.....
RR110    T.....G.....
RR111    T.....GG.....
RR113    T.....GG.....
RR114    .....
RR115    T.....G.....
RR116    T.....

```

Allegato 2

ID N G B	ID C l i e n t e	C o m p r e n. n.	P o p o l a z.	mt D N A	BOVI RBP	ETH10	ETH225	ILSTS28	INRA11	INRA36	SR1	SR11	SR5	SR8	TGLA40
1	73	AV	O	1	193 199	204 204	143 147	129 131	213 227	179 179	127 129	110 114	171 171	221 227	108 108
2	8	AV	O	2	191 193	204 204	145 147	131 131	209 221	181 183	127 131	116 116	165 173	229 235	108 108
3	247	AV	O	3	191 193	204 206	129 143	131 133	201 227	177 185	127 127	112 114	169 169	227 227	108 108
4	266	AV	O	2	197 201	210 210	147 147	131 133	201 221	177 179	127 127	112 118	165 175	227 229	108 122
5	173	AV	O	4	193 197	204 204	145 147	131 131	201 201	183 185	127 127	116 116	169 173	217 227	108 110
6	71	AV	O	5	189 193	204 206	145 145	129 131	201 211	179 185	127 129	116 116	173 175	231 239	108 108
7	31	AV	O	6	193 195	204 208	145 147	131 133	201 209	179 183	127 129	114 116	171 175	221 239	108 110
8	241	AV	O	7	191 193	204 206	145 145	131 131	201 225	183 185	127 131	112 116	169 169	227 229	108 108
9	182	AV	O	8	197 203	204 204	145 145	131 131	201 213	179 183	125 127	114 116	169 169	227 229	108 108
10	50	AV	O	2	193 197	204 204	145 147	131 131	209 209	179 179	127 131	114 116	165 173	217 239	108 110
11	258	AV	O	4	197 203	204 206	145 145	131 131	209 213	183 185	127 127	112 114	167 169	227 241	108 108
12	152	AV	O	9	193 193	204 210	145 147	131 133	201 201	179 185	127 127	112 114	165 167	219 227	108 108
13	17	CH	N	4	197 201	206 206	129 143	129 131	201 225	179 183	127 127	114 116	173 173	235 237	108 108
14	17b	AV	O	10	187 191	206 206	129 149	131 133	213 223	179 183	127 127	112 114	173 173	229 237	108 110
15	48	AV	O	10	193 199	196 204	145 147	131 131	201 213	179 183	129 129	112 118	169 171	217 217	108 110
16	230	AV	O	3	197 203	204 206	145 145	131 131	209 213	183 185	127 127	114 116	169 175	223 229	108 108
17	45	AV	O	10	207 207	206 206	129 147	131 133	201 213	183 183	127 127	114 118	165 173	237 237	108 108
18	225	AV	O	11	189 193	204 206	129 145	131 131	201 209	183 183	127 127	112 114	173 173	229 237	106 110
19	46	CH	N	1	191 207	204 204	143 147	131 131	201 227	183 185	127 127	114 118	173 175	221 227	108 110
20	1	AV	O	4	193 207	204 210	145 149	131 131	209 213	179 183	127 127	112 116	171 175	229 237	108 126
21	159	AV	O	3	191 193	206 206	143 147	131 131	211 227	169 181	127 127	118 120	156 173	227 229	108 108
22	59	CH	N	11	193 199	204 208	143 147	131 133	209 233	181 185	127 127	116 116	156 165	221 221	108 108
23	89	CH	N	11	193 207	204 204	145 145	131 131	201 227	175 185	129 129	114 116	165 169	221 221	126 126
24	5	CH	N	12	191 201	206 206	147 147	129 131	201 229	181 185	127 127	116 118	169 169	227 227	106 108
25	49	CH	N	5	189 195	204 204	143 145	131 133	201 219	179 185	129 129	116 118	167 171	221 235	108 108
26	43	CH	N	13	189 191	204 210	143 149	131 131	201 227	175 179	127 127	116 118	173 173	227 231	108 108
27	93	CH	N	13	193 203	204 206	143 145	131 131	201 233	173 183	127 127	116 118	169 173	221 227	108 108
28	1547	SO	S	14	195 201	204 204	145 145	131 133	201 201	175 181	127 127	118 118	169 169	219 221	108 110
29	2325	SO	S	3	193 193	206 206	143 145	131 131	211 221	173 185	127 131	114 116	169 171	235 239	108 108
30				3	193 195	204 206	143 145	131 131	201 205	179 181	127 127	116 118	169 175	239 241	108 108
31	9	SO	S	15	193 193	204 206	143 147	131 131	201 211	179 183	127 129	116 118	169 171	241 241	108 108
32	2256	SO	S	3	197 201	204 206	145 145	131 131	211 225	175 175	127 127	116 118	171 171	221 235	108 110
33	2243	SO	S	15	187 193	204 204	145 145	131 131	201 211	183 185	127 131	118 118	169 171	221 239	108 108
34	2282	SO	S	3	201 201	206 206	145 145	131 131	203 203	175 181	127 131	116 118	169 171	227 235	108 108
35	2294	SO	S	3	197 201	206 206	145 145	131 131	201 211	181 183	127 129	116 118	171 171	235 235	110 110
36	1156	SO	S	14	197 201	204 204	145 145	131 131	211 227	179 183	127 127	116 118	169 175	221 221	108 108
37	2293	SO	S	15	189 201	206 206	145 145	131 131	201 211	175 175	127 131	118 118	171 171	239 239	108 108
38	2236	SO	S	14	195 201	204 206	145 147	131 133	203 219	175 179	127 131	118 118	171 171	221 235	108 110
39	2150	SO	S	15	193 201	204 204	143 145	131 133	201 209	175 179	131 131	116 118	171 175	235 239	108 108

ID N G B	ID C l i e n t e	C o m p r e n.	P o p o l i a z.	mt D N A	BOVI RBP	ETH10	ETH225	ILSTS28	INRA11	INRA36	SR1	SR11	SR5	SR8	TGLA40
40	2289	SO	S	3	193 195	204 206	145 147	131 131	203 211	183 185	127 127	118 118	171 171	221 221	106 108
41	55	CH	N	13	193 193	204 206	145 147	131 131	201 223	181 183	127 131	110 116	165 169	239 241	106 108
42	41	CH	N	11	195 201	204 206	147 147	131 133	201 213	175 183	127 127	112 116	156 171	227 227	108 108
43	31	CH	N	11	189 193	204 206	145 145	131 131	201 225	179 181	127 127	116 116	171 173	221 227	106 108
44	53	CH	N	13	197 197	204 206	145 147	129 131	201 201	175 175	127 127	114 116	173 173	221 221	108 126
45	98	CH	N	5	195 201	204 204	145 147	131 133	201 213	175 179	127 127	112 118	171 173	221 227	108 126
46	60	CH	N	13	189 191	204 204	143 147	131 133	201 201	173 181	127 127	114 116	156 173	227 239	108 108
47	28	CH	N	16	197 197	204 206	129 143	131 133	201 213	173 175	127 129	114 116	156 169	221 239	126 126
48	54	CH	N	13	199 199	204 204	143 147	131 131	213 233	175 179	127 127	116 116	165 173	221 225	108 110
49	58	CH	N	12	197 207	204 204	129 145	131 131	209 219	173 181	127 127	116 118	173 173	227 235	110 110
50	61	CH	N	11	193 197	204 208	147 147	133 133	209 231	179 185	127 129	116 116	169 173	227 241	108 108
51	47	CH	N	1	193 199	204 208	143 147	131 131	201 231	173 173	129 131	114 116	156 171	221 239	108 126
52	30	CH	N	11	189 207	206 208	145 145	133 133	211 221	181 181	127 131	116 116	171 173	231 235	108 108
53	2288	SO	S	3	197 201	206 206	145 145	131 131	201 211	175 181	127 127	116 118	171 171	221 221	108 108
54	1140	SO	S	15	191 193	204 206	145 145	131 131	201 205	175 185	127 129	118 118	171 171	221 235	108 108
55	217	SO		3	195 201	204 206	145 147	131 131	201 203	185 185	127 129	116 118	171 171	221 235	108 110
56	2330	SO	S	15	197 201	204 204	143 145	131 131	201 209	183 185	127 127	118 118	169 175	235 235	108 108
57	1167	SO	S	14	193 197	206 206	143 145	131 131	201 211	175 181	127 127	118 118	169 169	221 235	108 110
58	1159	SO	S	14	193 193	204 206	143 145	131 131	209 211	175 185	127 129	116 116	169 173	219 221	108 108
59	911	SO	S	15	195 195	204 204	145 145	131 131	201 209	175 179	127 127	112 118	169 175	239 245	108 108
60	2314	SO	S	3	193 201	204 204	143 147	131 131	209 221	175 185	127 129	116 116	171 171	235 235	108 108
61	40	CH	N	11	189 199	204 204	145 145	129 133	209 227	181 183	127 127	116 118	156 171	229 229	108 108
62	29	CH	N	11	189 193	204 204	143 145	131 131	201 223	179 185	127 131	114 118	173 173	217 241	108 108
63	16	CH	N	13	189 193	204 206	143 145	131 131	201 219	179 181	127 131	114 116	173 173	227 235	108 126
64	74	CH	N	11	193 197	204 210	129 145	131 131	229 229	179 185	127 131	116 116	165 173	217 221	106 108
65				13	197 201	196 210	143 147	131 131	201 209	183 183	127 127	114 114	167 171	235 235	108 108
66	46	AV	O	12	187 197	204 206	145 147	131 133	209 229	179 183	127 127	116 116	169 173	219 231	108 110
67	92	CH	N	12	189 197	204 204	145 147	131 133	223 233	173 179	129 131	110 116	169 173	227 235	108 108
68	51	CH	N	17	195 201	204 206	129 147	131 131	221 221	175 183	127 127	112 114	169 173	231 235	108 108
69	961	MO	S	14	193 195	204 206	143 145	131 131	201 211	175 179	127 127	112 118	169 173	227 241	108 108
70	904	MO	S	18	193 195	204 204	145 145	131 133	201 221	173 179	127 129	116 118	169 169	227 239	108 108
71	757	MO	N	19	191 197	204 206	129 145	131 133	209 221	181 183	129 129	116 116	165 169	227 227	108 110
72	862	MO	S	14	193 201	204 204	145 147	131 131	201 201	173 183	127 127	116 116	169 175	221 221	108 126
73	962	MO	S	14	197 201	196 210	143 147	131 131	201 209	183 183	127 127	114 114	167 171	235 235	108 108
74	835	MO	N	9	187 197	204 206	145 147	131 133	209 229	179 183	127 127	116 116	169 173	219 231	108 110
75	926	MO	S		189 197	204 204	145 147	131 133	223 233	173 179	129 131	110 116	169 173	227 235	108 108
76	988	MO	S	14	195 201	204 206	129 147	131 131	221 221	175 183	127 127	112 114	169 173	231 235	108 108
77	880	MO	S	14	193 195	204 206	143 145	131 131	201 211	175 179	127 127	112 118	169 173	227 241	108 108
78				4	193 195	204 204	145 145	131 133	201 221	173 179	127 129	116 118	169 169	227 239	108 108
79	685	MO	N	9	191 197	204 206	129 145	131 133	209 221	181 183	129 129	116 116	165 169	227 227	108 110

ID N G B	ID C l i e n t e	C o m p r e n.	P o p o l i a z.	mt D N A	BOVI RBP	ETH10	ETH225	ILSTS28	INRA11	NRA36	SR1	SR11	SR5	SR8	TGLA40
80	2390	SO	N		193 201	204 204	145 147	131 131	201 201	173 183	127 127	116 116	169 175	221 221	108 126
81	809	MO	N	20	197 199	204 204	129 145	131 131	201 209	181 185	127 127	114 114	169 173	235 237	108 108
82	890	MO	S	14	201 201	204 206	145 147	131 131	201 209	175 185	127 127	116 116	171 171	237 245	108 108
83	898	MO	S	21	191 195	204 204	145 147	131 131	205 221	175 175	127 127	116 116	171 171	235 235	108 110
84	974	MO	S	14	193 197	204 204	145 145	131 131	203 209	173 185	127 129	118 118	171 171	221 221	108 110
85	733	MO	N	20	193 197	204 206	145 149	131 133	201 211	179 183	127 127	116 116	167 169	219 227	108 108
86	968	MO	S	3	197 201	204 204	145 145	131 131	209 211	181 185	127 127	116 116	169 169	221 239	108 108
87	858	MO	S	14	193 193	206 206	143 145	131 131	201 209	179 183	127 131	116 118	169 169	235 241	108 110
88	906	MO	S	14	195 197	204 204	145 145	131 133	205 221	175 181	127 127	116 116	171 171	235 235	108 108
89	891	MO	S	22	193 201	204 204	147 147	131 131	201 209	183 183	127 129	116 116	171 171	221 235	108 108
90	889	MO	S	14	197 201	204 204	147 147	131 133	201 221	175 185	127 127	116 116	169 175	227 227	108 110
91	893	MO	S	15	193 195	204 204	145 147	131 133	201 201	175 175	127 127	112 116	169 171	221 221	108 108
92	2245	SO	S	3	195 197	204 206	145 145	131 131	201 201	181 185	127 131	116 118	171 171	221 239	108 108
93	107	TI	N	2	189 201	196 204	129 145	131 131	201 221	177 185	127 129	114 118	169 175	227 235	108 126
94	149	TI	N	23	193 201	204 206	143 145	131 131	209 221	183 183	127 147	112 116	171 173	231 235	108 126
95	314	TI	N	12	191 191	204 204	145 147	131 131	209 213	173 175	127 ?	114 116	171 171	221 223	108 110
96	31	TI	N	12	193 201	204 210	145 145	131 131	201 209	173 175	127 127	110 112	171 171	219 221	108 126
97	86	TI	N		195 207	204 206	145 147	131 133	201 201	179 183	127 127	112 116	171 171	229 241	108 108
98					191 201	204 206	145 145	131 131	201 201	179 183	127 127	114 114	169 175	229 241	108 126
99	305	TI	N		189 197	204 206	145 145	131 133	201 201	177 179	131 131	114 114	173 175	227 229	108 108
100	674	MO	N	12	189 197	204 206	145 145	131 131	201 209	183 185	127 127	114 114	167 173	217 235	108 108
101	715	MO	N	20	201 201	204 206	143 147	131 131	201 209	185 185	127 127	114 114	169 173	227 227	108 110
102	691	MO	N	11	193 197	206 208	129 145	131 131	209 209	181 185	127 127	114 116	165 169	225 227	108 110
103	751	MO	N	20	193 197	204 206	145 145	131 131	209 223	179 181	127 127	112 118	169 173	217 231	108 108
104	942	MO	S	14	191 197	204 206	145 147	131 133	205 211	175 183	127 127	116 118	167 175	221 227	108 108
105	767	MO	N	9	201 207	204 208	129 145	131 131	201 209	173 183	127 127	112 116	173 173	219 229	108 110
106	975	MO	S	14	201 201	204 206	143 145	131 131	201 227	179 185	127 131	116 118	169 171	235 239	108 108
107	1009	MO	S	14	193 201	204 204	129 145	131 131	201 211	175 175	127 131	116 118	171 171	221 239	108 108
108	949	MO	S	14	191 201	204 204	143 145	131 131	201 227	175 183	127 129	116 118	171 175	219 239	108 108
109	21	CH	N	24	191 193	196 204	147 149	131 131	201 201	179 183	125 127	114 118	165 173	235 235	108 126
110	7	CH	N	24	189 193	196 210	145 147	131 133	201 209	181 183	127 127	114 114	173 173	227 239	108 108
111	94	CH	N	12	193 197	204 204	145 145	133 133	221 229	177 183	127 127	116 116	169 169	235 239	106 108
112	48	CH	N		189 193	204 204	145 147	131 133	201 219	179 183	127 127	116 116	165 173	231 235	108 108
113	319	TI	N	12	193 207	206 206	145 145	131 131	201 209	183 183	127 127	114 116	169 169	229 241	108 108
114	15	TI	N	1	191 193	204 210	143 145	133 133	213 213	181 183	127 127	116 118	169 171	227 231	108 126
115	311	TI	N	4	191 193	204 206	145 145	131 131	201 201	183 185	127 127	114 116	169 173	223 229	108 110
116	99	TI	N	25	193 199	196 208	145 145	131 133	209 231	179 185	127 127	112 114	173 173	221 227	108 110
117	176/0 9	TI	N		193 197	204 210	145 147	131 131	213 213	179 183	127 127	112 116	169 175	227 241	108 108

ID N G B	ID C l i e n t e	C o m p r e n.	P o p o l i a z.	mt D N A	BOVI RBP	ETH10	ETH225	ILSTS28	INRA11	INRA36	SR1	SR11	SR5	SR8	TGLA40
118	176/09	TI	N		197 197	204 206	145 145	129 131	201 201	183 185	127 127	114 114	156 165	229 241	108 108
119	71/09	Av	O		189 193	204 206	143 145	131 131	221 229	179 183	127 127	114 116	173 173	219 227	108 108
120	119/09	Av	O		193 203	196 206	129 147	131 131	201 221	177 179	127 127	112 118	165 169	227 227	108 108
121	173/09	TI	N		197 207	204 206	145 145	131 131	209 209	179 185	127 127	110 114	169 173	241 241	108 108
122	49/09	TI	N		193 207	204 204	145 145	131 131	201 209	183 185	127 127	114 116	171 173	229 231	108 108
123	164/09	TI	N		191 201	204 204	145 147	131 131	201 229	173 185	127 127	112 114	167 171	217 229	108 126
124	178/09	TI	N		187 197	204 206	145 145	131 131	209 213	185 185	127 127	116 116	169 169	229 241	108 108
125	85/09	TI	N		191 191	204 204	145 145	131 133	201 209	181 183	127 127	114 116	169 173	229 241	108 110
126	134/09	Av	O		191 197	206 208	145 147	131 131	209 223	179 185	127 131	112 120	169 169	229 235	108 108
127	128/09	Av	O		187 199	204 206	129 143	131 131	201 211	173 185	127 129	116 116	169 173	225 239	108 126
128	156/09				191 197	204 206	145 147	131 131	201 223	179 181	127 127	112 116	165 169	229 229	108 108