

Analisi della variabilità ai loci microsatelliti e nel DNA  
mitocondriale in campioni biologici di Capriolo (*Capreolus  
capreolus*) della Provincia di Sondrio



Documento redatto da:

**Dr. Massimo Pierpaoli**

[m.pierpaoli@ngbgenetics.com](mailto:m.pierpaoli@ngbgenetics.com)

NGB Genetics

Via Grieco 5/b, 40133 Bologna

## 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 tale 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 CAPRIOLO: DISTRIBUZIONE E STATUS GESTIONALE

Il Capriolo (*C. capreolus*) è diffuso in tutta l'Europa continentale, dal Mediterraneo alla Scandinavia, nel Regno Unito, nei Balcani. Il limite settentrionale della distribuzione è dato dal 67° parallelo a nord, il limite meridionale è localizzato in Turchia mentre quello orientale è dato da una linea ideale che congiunge il Lago Ladoga (Russia nord-occidentale ai confini con la Finlandia) con il Mar Nero. In Italia la specie, quasi completamente eradicata alla metà del 1900, è attualmente presente in due areali principali: l'arco alpino ed i rilievi appenninici al centro-nord (Fig 1).

Le attuali popolazioni delle Alpi occidentali e degli Appennini sono state oggetto, negli ultimi 30 anni, di massicce reintroduzioni effettuate con individui provenienti dalle Alpi orientali, dall'Europa centrale e dai Balcani. E' quindi ragionevole supporre che in tali popolazioni siano in atto fenomeni di rimescolamento ed ibridazione tra gli eventuali individui autoctoni e quelli reintrodotti successivamente. Le popolazioni delle Alpi orientali non hanno invece subito reintroduzioni, e sono pertanto da considerarsi prevalentemente naturali. In tali popolazioni l'espansione demografica e la migrazione da regioni limitrofe sono i fattori principali che determinano la struttura di popolazione osservata.

Nel centro-sud il Capriolo è rappresentato da popolazioni piccole e disgiunte, localizzate nel Parco Nazionale d'Abruzzo e nella Sila e originate da ripopolamenti effettuati negli anni 70 del XX° sec., (Toso S. 2002). A Castel Porziano (Lazio), nella Foresta Umbra (Gargano, Puglia) e nei Monti dell'Orsomarso (Calabria) si ritiene che siano presenti le ultime popolazioni rappresentative della sottospecie endemica *C. c. italicus* (Randi *et al.* 2004).

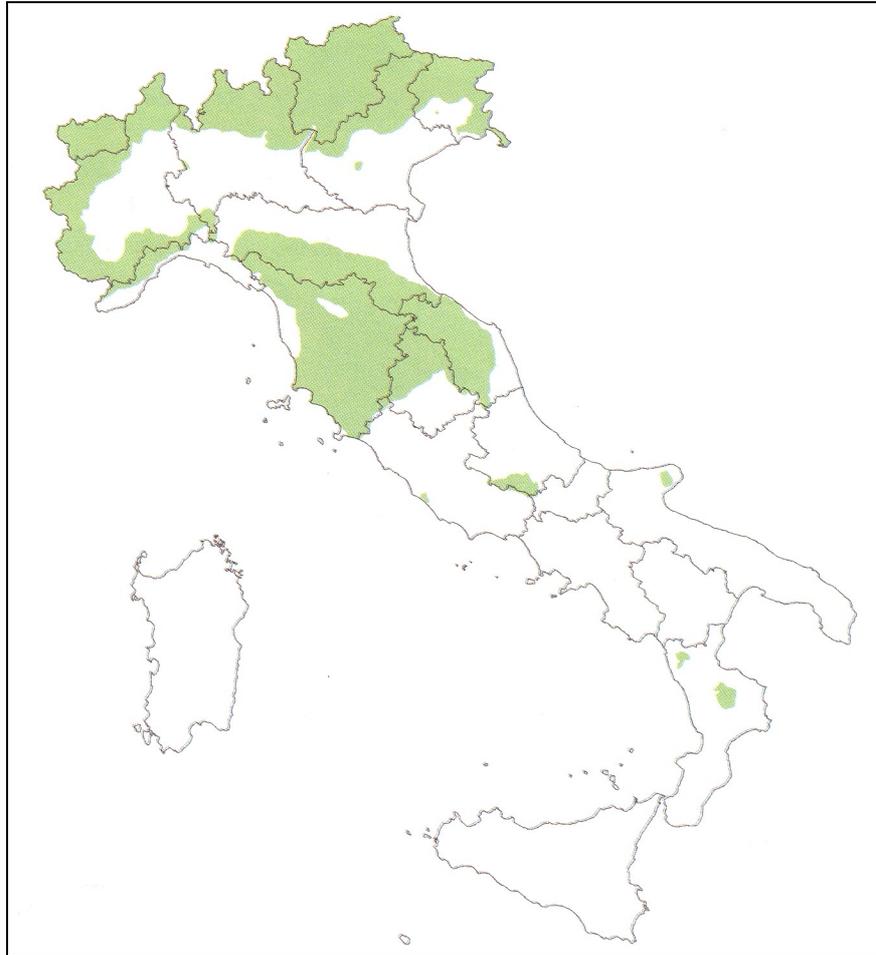
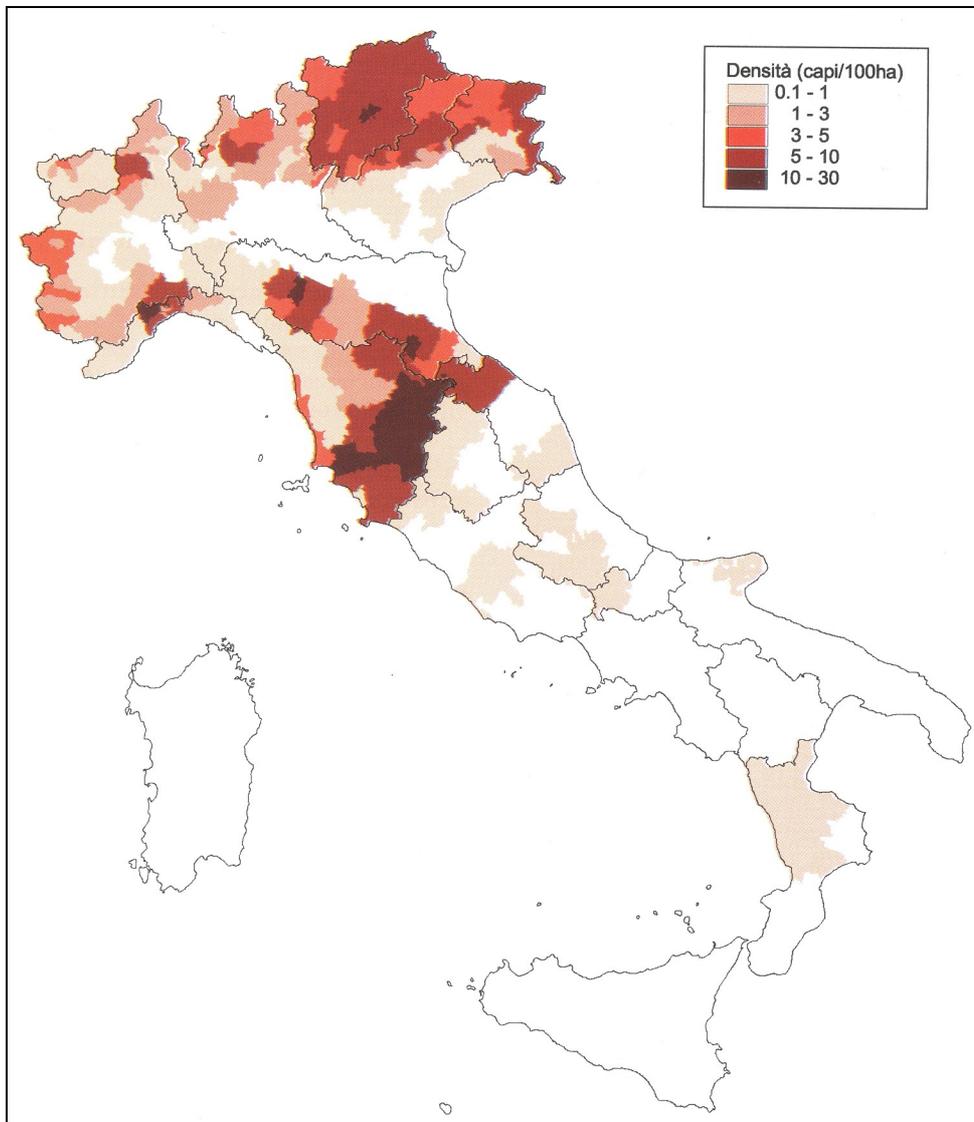


Fig. 1: distribuzione del Capriolo al 1998 (Pedrotti et al. 2001)

Come accennato l'incremento quantitativo è avvenuto sia per dispersione/migrazione sia per opera dell'uomo, sovente attraverso immissioni non documentate. Attualmente, in Italia settentrionale, il Capriolo ha occupato circa l'80% del suo areale potenziale con densità variabili, in Italia centrale la percentuale di occupazione è vicina a tali valori, mentre nel meridione non supera l'1%, con una media nazionale del 47%. Per quanto riguarda le densità si stima che l'attuale consistenza delle popolazioni non superi il 15-20% di quella sostenibile dal territorio, naturalmente con ampie variazioni territoriali (Fig. 2) Pedrotti et al. 2001). Nella parte centro-settentrionale dell'Italia il Capriolo mostra quindi uno stato di conservazione e gestione mediamente soddisfacente, in netto contrasto con la situazione verificata in Italia meridionale, dove lo stato di conservazione è particolarmente precario e sono assolutamente necessarie azioni di salvaguardia dei nuclei autoctoni esistenti, da un lato, mentre dall'altro sono necessari programmi di reintroduzione, purché effettuati in aree

dove il bracconaggio ed il randagismo canino siano effettivamente ridotti.



*Fig. 2: distribuzione e valori medi di densità del Capriolo relativi al periodo 1999-2000 (Pedrotti et al. 2001)*

## 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 cervo ed il capriolo 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 in Europa (Vernesi *et al.* 2002; Randi *et al.* 2004), suggeriscono che il modello di isolamento in aree rifugio meridionali e successiva ricolonizzazione di aree settentrionali, descritto precedentemente, possa applicarsi anche al Capriolo. Tali autori ipotizzano l'esistenza di diverse aree rifugio, probabilmente tre, localizzate nelle penisole Iberica, Italiana e nei Balcani, e di una successiva ricolonizzazione. I dati genetici tuttavia non hanno permesso di identificare con precisione l'entità dei contributi delle singole aree rifugio alla ricolonizzazione verso settentrione.

## 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 cm<sup>3</sup> 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).

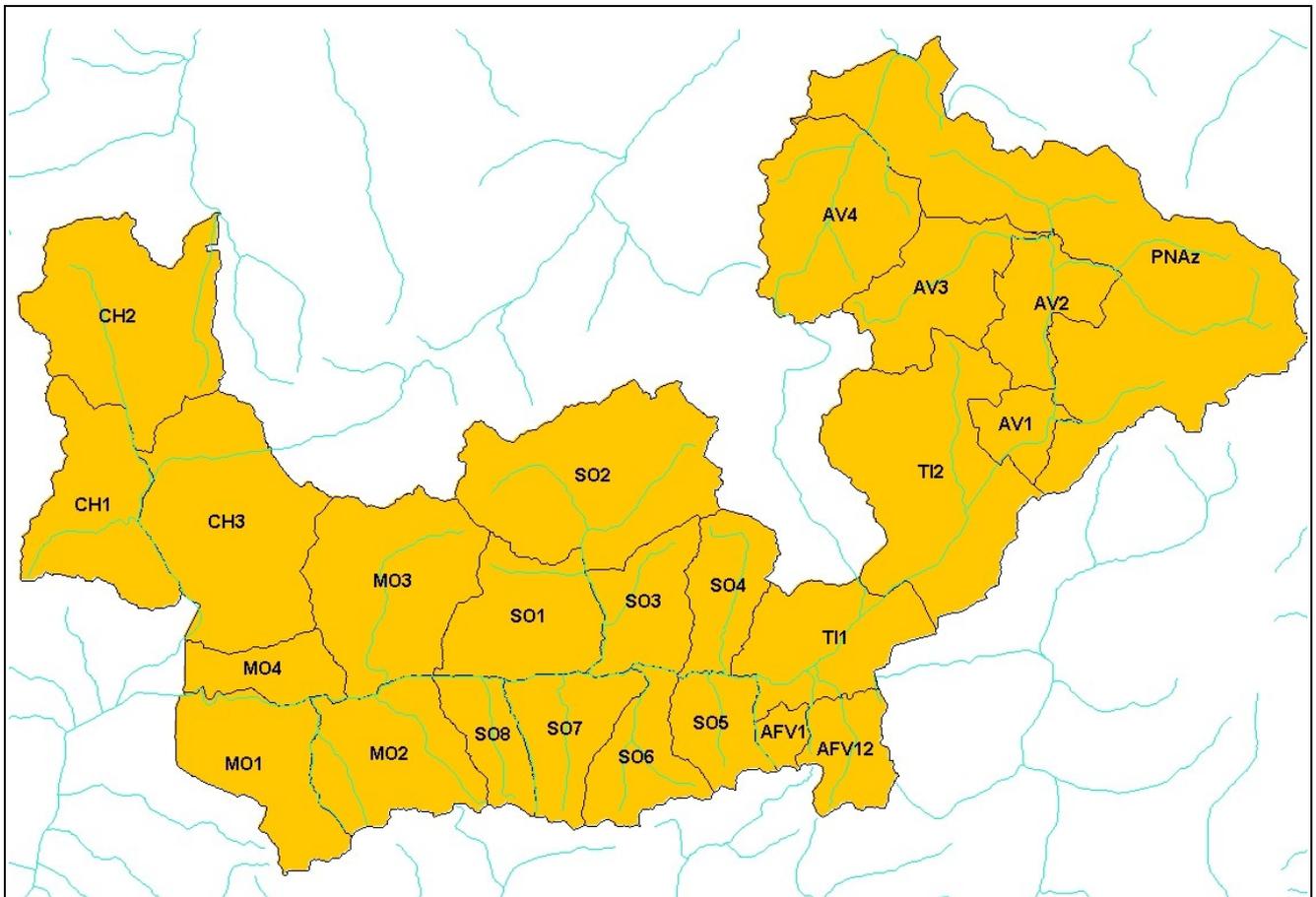


Fig. 3: comprensori della Provincia di Sondrio. Vengono indicati i confini dei comprensori ed i corsi d'acqua.

Sono quindi stati analizzati un totale di 156 campioni di Capriolo, con un minimo di 14 ed un massimo di 42 campioni in ognuno dei cinque compressori oggetto di studio (Tab. 1)

Tabella 1

Compressorio	Campioni ricevuti	Campioni sequenziati (D-loop)	Campioni tipizzati (STR)
Chiavenna (CH)	37	33	37
Morbegno (MO)	42	41	41
Sondrio (SO)	30	31	30
Tirano (TI)	15	14	14
Alta Valtellina (AV)	35	33	34
Totale	159	152	156

## 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\_Cca\_Sondrio.fas" ).

### Amplificazione e tipizzazione dei microsatelliti

Il DNA nucleare è stato analizzato tramite l'amplificazione mediante PCR dei 9 loci microsatelliti elencati in tabella 2 (Hulme *et al.* 1995, Kemp *et al.* 1995, Pierson *et al.* 1994, Røed 1998, Talbot *et al.* 1996, Wilson *et al.* 1997).

Tabella 2

Locus	Sequenza	N° basi	Riferimenti bibliografici
OarFCB304F	CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG	27	
OarFCB304R	CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	23	Talbot <i>et al.</i> , Anim. Genet. , 1996, 2, 117-119.
RT-1F	TGCCCTTCTTTCATCCAACAA	20	
RT-1R	CATCTTCCCATCCTCTTTAC	20	Wilson <i>et al.</i> , Molecular Ecology, 1997. 6:697-699.
NVHRT71F	GAGTTGGCAGGTGTAAAGG	19	
NVHRT71R	CAGTGGGGGAAATGATG	17	Roed & Midthjell, Mol.Ecol, 1998, 7:1771-1788.
NVHRT21F	GCAGCGGAGAGGAACAAAAG	20	
NVHRT21R	GGGGAGGAGCAGGGAAATC	19	Roed & Midthjell, Mol.Ecol, 1998, 7:1771-1788.
NVHRT16F	ATTCTAAGCCCAAATAATCTT	21	
NVHRT16R	TCTAAGGGGTCTGTGTCTT	19	Roed & Midthjell, Mol.Ecol, 1998, 7:1771-1788.
ILSTS058F	GCCTTACTACCATTTCAGC	20	
ILSTS058R	CATCCTGACTTTGGCTGTGG	20	Kemp <i>et al.</i> , Anim. Genet. , 1995, 26: 299-306.
ILSTS005F	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC	22	
ILSTS005R	TGTTCTGTAGTTTGTAAAGC	19	Kemp <i>et al.</i> , Anim. Genet. , 1995, 26: 299-306.
NVHRT48F	CGTGAATCTTAACCAGGTCT	20	
NVHRT48R	GGTCAGCTTCATTTAGAAAC	20	Roed & Midthjell, Mol.Ecol, 1998, 7:1771-1788.
MCM505F	ATCAGCACCATCTTAGGCCTAGA	23	
MCM505R	TGTAGATTCCCTCAATATAAAAATGGT	27	Hulme <i>et al.</i> , 1995 An. Gen. 26(5): 369-72

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.

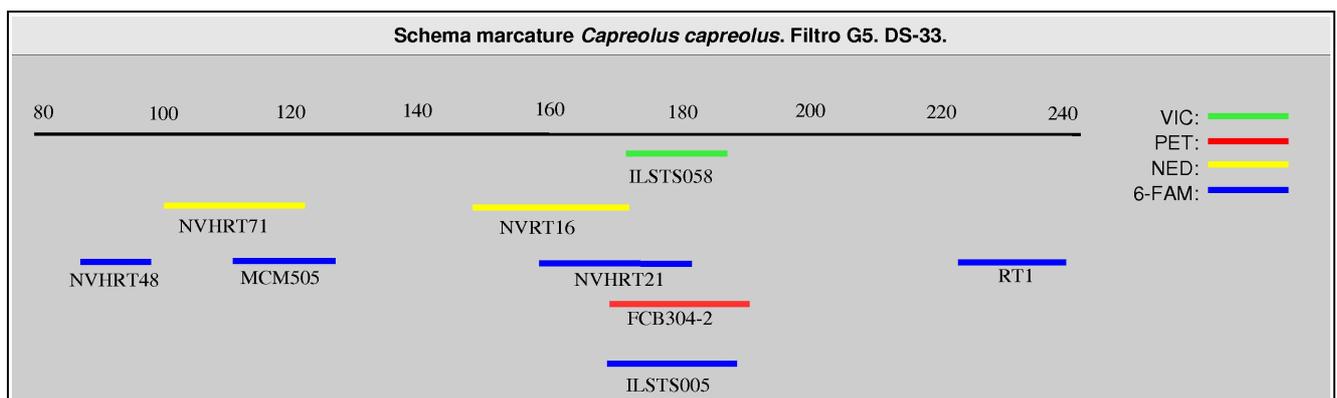


Figura 4: schema marcature e multiplex di caricamento.

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") 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 cinque gruppi, corrispondenti ai comprensori.

Per quanto riguarda i dati riguardanti il set totale di dati, il DNA mitocondriale si evidenzia che la diversità aplo-tipica ( $H$ ) è attestata su livelli medio-alti e confrontabile con quella riscontrata nelle popolazioni delle Alpi centrali (Randi *et al.* 2004), mentre la diversità nucleotidica ( $\pi$ ) è piuttosto bassa. Questa situazione suggerisce che il numero storico di riproduttori (popolazione effettiva) è piuttosto elevato nel capriolo, ma che le linee mitocondriali attuali si sono evolute in tempi piuttosto recenti, in accordo con le teorie biogeografiche descritte nel paragrafo "Il contesto biogeografico europeo", ed in accordo con i risultati ottenuti dall'analisi del *mismatch* che indica una espansione della popolazione effettiva in corrispondenza di  $\tau = 7.9$  mutazioni. Un risultato simile è stato ottenuto anche da Randi *et al.* (2004), il quale colloca l'espansione in un periodo a cavallo tra l'ultimo periodo interglaciale e l'ultima glaciazione. L'analisi del mtDNA effettuata sui singoli gruppi evidenzia una maggiore variabilità nei comprensori Val Chiavenna, Sondrio e Alta Valtellina, mentre Morbegno e Tirano sono meno variabili. L'analisi dei microsatelliti indica una sostanziale omogeneità tra i comprensori per quanto riguarda il numero di alleli e l'eterozigosità osservata. E' degno di nota un significativo deficit di eterozigoti, evidenziato dalle differenze tra eterozigoti osservati ( $H_o$ ) ed attesi ( $H_e$ ) e dai valori di Fis significativamente maggiori di zero, osservato sia nel totale dei campioni, sia nei singoli comprensori. La presenza di struttura di popolazione così come la presenza di alleli nulli, o entrambi, potrebbero spiegare tale scostamento.

Tabella 3

Area	mtDNA					STR					
	N	k	H ± s.d.	s	$\pi \pm s.d.$	N	ko ± s.d.	Ho	He	Fis	HWE
Provincia SO	152	13	0.744 ± 0.02	17	0.010 ± 0.0004	156	8 ± 3.8	0.539 ± 0.262	0.678 ± 0.21	0.2***	6
Chiavenna (CH)	33	6	0.748 ± 0.05	13	0.013 ± 0.001	37	6.8	0.559 ± 0.305	0.671 ± 0.218	0.17***	2
Morbegno (MO)	41	5	0.637 ± 0.05	13	0.010 ± 0.0008	41	6.2	0.516 ± 0.261	0.622 ± 0.226	0.17***	2
Sondrio (SO)	31	7	0.785 ± 0.05	14	0.010 ± 0.0009	30	6.2	0.515 ± 0.222	0.651 ± 0.189	0.22***	3
Tirano (TI)	14	5	0.593 ± 0.14	14	0.010 ± 0.002	14	5.7	0.572 ± 0.322	0.663 ± 0.213	0.17***	1
Alta Valtellina (AV)	33	8	0.742 ± 0.07	15	0.009 ± 0.001	34	5.8	0.553 ± 0.305	0.661 ± 0.211	0.17***	3

\*\*\*: livello di significatività  $P < 0.01$ . HWE: numero di loci che si scostano dalle frequenze attese secondo il principio di Hardy-Weinberg..

Il fatto che il numero di loci non all'equilibrio di Hardy-Weinberg (Tab.3) sia maggiore nel campione globale (6) rispetto ai singoli comprensori (1-3) indica che la variabilità genetica osservata riflette, probabilmente, la presenza di una sottostruttura di popolazione. Analizzeremo separatamente con procedure statistiche appropriate sia l'eventuale presenza di alleli nulli sia la presenza di struttura di popolazione.

**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.

**$\pi$** : diversità nucleotidica, ovvero la probabilità che due nucleotidi scelti a caso siano diversi.

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

Indici calcolati utilizzando il software Genepop 4.0 (<http://genepop.curtin.edu.au/>).

**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

La differenziazione genetica tra i diversi comprensori è stata analizzata attraverso l'analisi molecolare della varianza (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), utilizzando sia gli indici classici di differenziazione genetica basati sulle frequenze alleliche e aplotipiche ( $F_{st}$ ), sia gli indici basati sulle distanze genetiche ( $R_{st}$  e  $\Phi_{st}$ ). I risultati (Tab. 4) indicano che una piccola, ma significativa proporzione di variabilità genetica è dovuta alla differenziazione tra comprensori, in particolare circa il 6% (mtDNA) e circa il 3% (STR) della varianza totale è da attribuirsi a varianza tra comprensori.

Tabella 4

Ripartizione della varianza molecolare (%)	mtDNA		STR	
	$F_{st}$	$\Phi_{st}$	$F_{st}$	$R_{st}$
Tra comprensori	5.76	6.61	3.16	3.65
Entro comprensori	94.24	93.39	96.84	96.35
Significatività	***	***	***	***

\*\*\*: livello di significatività  $P < 0.001$

Non sono state riscontrate differenze sostanziali tra gli indici classici ( $F_{st}$ ) e gli indici basati sulle distanze molecolari ( $\Phi_{st}$  ed  $R_{st}$ ). Questo risultato non stupisce, dal momento che questi ultimi riflettono maggiormente l'effetto dell'accumulo di mutazioni, e quindi sono indicativi di fenomeni di isolamento prolungato che evidentemente non è avvenuto tra le popolazioni della provincia di Sondrio. Emerge quindi un quadro di scarsa differenziazione ed elevato flusso genico tra i caprioli all'interno della provincia di Sondrio.

### 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 osserva 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 mutazioni. Scostamenti da questo modello possono essere indicativi della presenza di barriere geografiche, di migrazione o, più probabilmente nel nostro caso, di rilasci effettuati con individui provenienti da altre località.

Lo studio della struttura filogeografica è stato condotto associando i dati ottenuti con quelli pubblicati da Vernesi *et al.* (2002), che ha analizzato campioni provenienti da diverse popolazioni in Europa (Fig. 5).

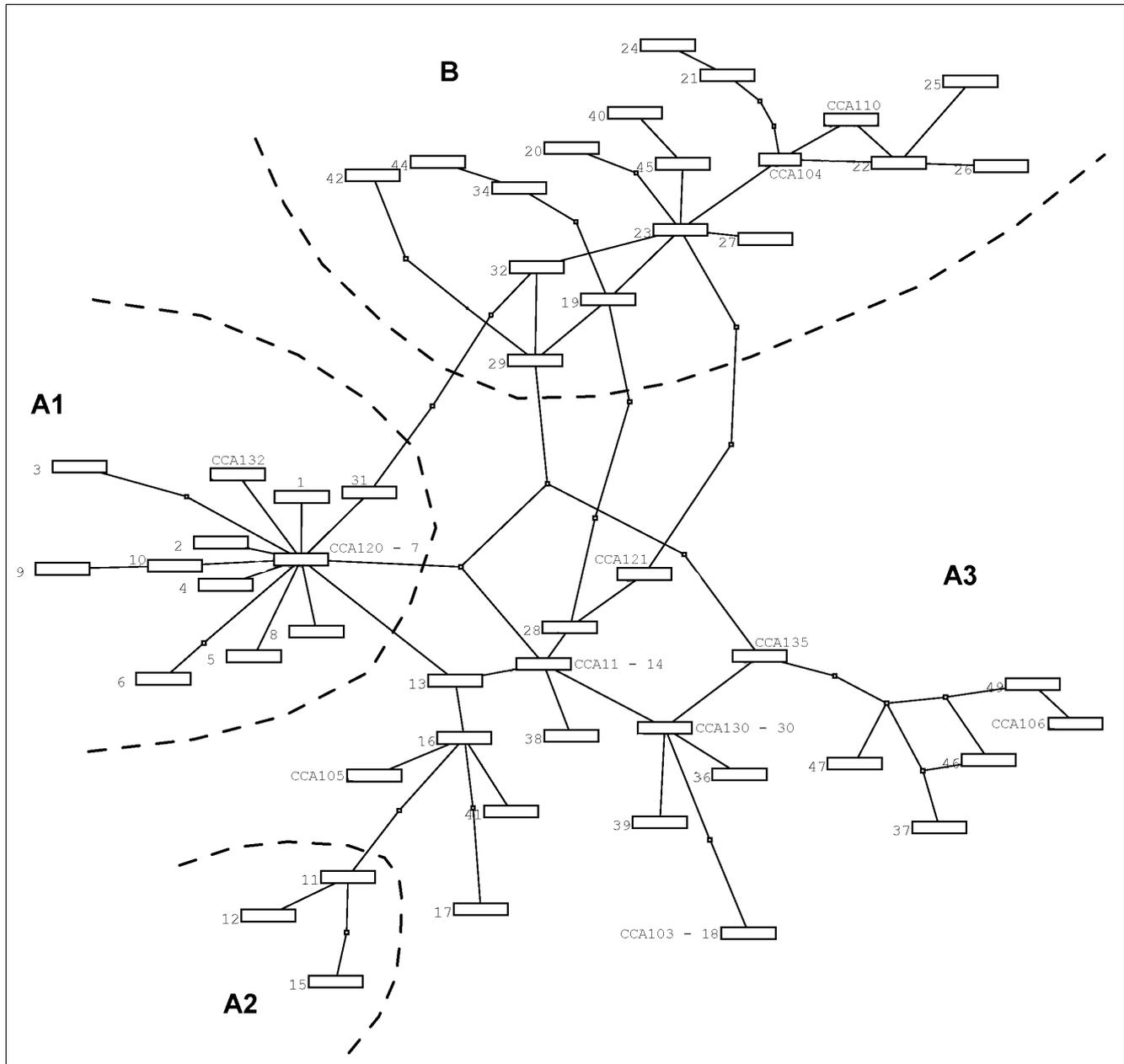


Figura 5: network costruito seguendo il metodo della parsimonia statistica utilizzando i dati della Provincia di Sondrio ed i dati ottenuti da Vernesi *et al.* (2002). Gli aplotipi identificati in questo progetto sono indicati con il prefisso CCA seguito da un numero. Gli altri aplotipi sono indicati come in Vernesi *et al.* (2002, fig. 2) ed in Pecchioli *et al.* (2006, fig. 4.2c). In caso di identità tra aplotipi sono riportate entrambe le diciture.

In tale studio erano stata evidenziata la presenza di 4 gruppi di aplotipi, associati ad aree geografiche distinte. Il gruppo A1 è caratteristico delle aree appenniniche del centro Italia,

con l'eccezione di alcuni campioni alpini o dell'Europa dell'est (Slovacchia). Il gruppo A2 è esclusivamente localizzato nel centro e sud Italia, inclusi i caprioli di Castelporziano, indicati come appartenenti alla sottospecie *C. c. italicus* (Randi *et al.* 2004). Il gruppo più ampio e territorialmente più differenziato è indicato come A3, i campioni appartenenti a tale gruppo sono stati infatti raccolti dalla Spagna alla Norvegia, includendo popolazioni alpine ed appenniniche. Il gruppo B è invece caratteristico di campioni provenienti dall'Europa centro-orientale e dalle Alpi occidentali, che sono comunque state ripopolate proprio con individui di provenienza est europea.

I campioni della Provincia di Sondrio hanno evidenziato aplotipi distribuiti in tutti i gruppi ad eccezione dell'aplogruppo A2 (*C. c. italicus*), in particolare 124 individui (82%) hanno un aplotipo riconducibile al gruppo A3, tipico dell'Europa continentale e delle Alpi. 23 individui (15%) hanno invece evidenziato aplotipi appartenenti al gruppo B, che, come abbiamo visto, sono più tipici dell'Europa centro-orientale e di alcune popolazioni alpine dove sono sicuramente avvenute delle reintroduzioni. E' pertanto lecito supporre che tali individui siano rappresentativi di eventi di introduzione mediati dall'uomo, piuttosto che da fenomeni di migrazione naturale. Verosimilmente anche i 5 individui (3%) con aplotipi appartenenti al gruppo A1 possono essere ricondotti ad introduzioni. E' interessante notare come i risultati ottenuti in questo studio siano decisamente sovrapponibili a quanto ottenuto da Pecchioli *et al.* (2006) nell'analisi di 120 caprioli della vicina Provincia di Trento. In tabella 5 sono indicate le frequenze per ciascuno aplotipo e per ogni comprensorio.

Tabella 5

Aplotipo	AV	CH	MO	SO	TI	Totale	Aplogruppo
Cca103	16	14	13	10	9	62	A3
Cca104	3	8	5	4	2	22	B
Cca105	3	4	0	0	1	8	A3
Cca106	2	5	21	10	1	39	A3
Cca110	0	0	0	0	1	1	B
Cca121	4	0	1	1	0	6	A3
Cca132	1	0	0	0	0	1	A1
Cca135	0	1	0	0	0	1	A3
Cca11	0	0	0	2	0	2	A3
Cca120	3	0	1	0	0	4	A1
Cca13	0	0	0	1	0	1	A3
Cca130	1	0	0	3	0	4	A3
Cca146	0	1	0	0	0	1	A3

### 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 delle probabili introduzioni di individui alloctoni, come suggerito nel paragrafo precedente dai dati relativi al mtDNA. Il primo passo per una corretta analisi degli STR è l'identificazione dei possibili loci con alleli nulli. L'analisi è stata effettuata sui cinque comprensori separatamente, e solo il locus ILSTS005 ha dato evidenza della presenza di alleli nulli in tutti i comprensori. Il fatto che circa il 50% di amplificazioni negative sia concentrato su tale locus avvalora inoltre questa ipotesi. Il locus ILSTS005 è stato quindi escluso dalle analisi statistiche che si basano esclusivamente sull'equilibrio di Hardy-Weinberg.

In figura 6 sono illustrati i risultati dell'analisi fattoriale delle corrispondenze, effettuata utilizzando i singoli campioni (genotipi).

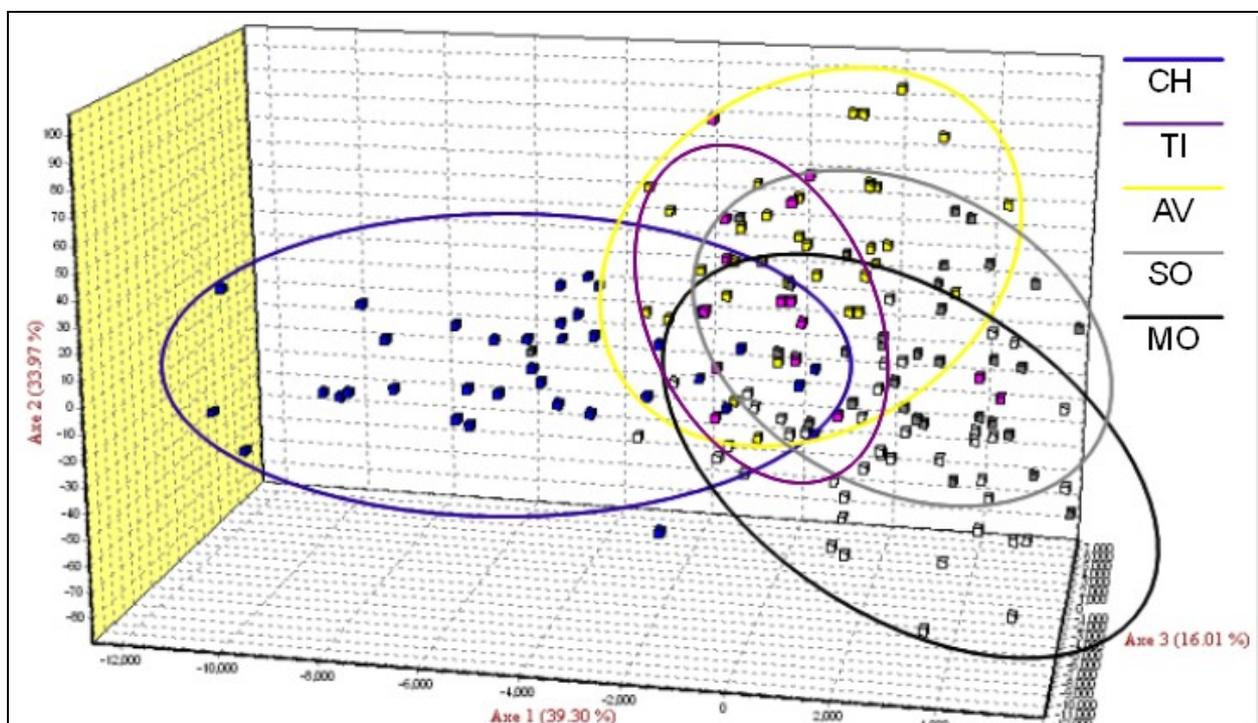


Figura 6: analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC) effettuata sui singoli genotipi multilocus. I campioni appartenenti allo stesso comprensorio sono indicati con lo stesso colore. Le ellissi, tracciate arbitrariamente, servono ad evidenziare le distribuzioni dei campioni dei diversi comprensori.

Si confermano i risultati di scarsa differenziazione ottenuti precedentemente a livello di singoli comprensori, anche se i campioni della Val Chiavenna (ellisse blu) evidenziano una certa differenziazione rispetto a tutti gli altri e contribuiscono alla maggior parte della differenziazione genetica osservata. E' comunque evidente una certa tendenza al raggruppamento da parte dei campioni provenienti da zone vicine.

L'analisi bayesiana della struttura genetica ha indicato come maggiormente probabile una struttura di popolazione basata sulla presenza di tre gruppi principali (Tabella 6).

Tabella 6

Comprensorio	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	N° individui
AV	0,58	0,3	0,13	33
CH	0,22	0,62	0,16	36
MO	0,17	0,24	0,59	41
SO	0,4	0,21	0,4	31
TI	0,34	0,37	0,29	14

Nota: il locus ILSTS005 è stato escluso dal momento che l'analisi bayesiana qui effettuata si basa esclusivamente sull'equilibrio di Hardy-Weinberg.

I campioni della Val Chiavenna vengono raggruppati principalmente (62%) nel gruppo 2, in accordo con i risultati ottenuti dall'analisi fattoriale. Il gruppo 1 è caratterizzato principalmente dai campioni dell'Alta Valtellina, mentre il comprensorio di Morbegno è quello che caratterizza maggiormente (59%) il gruppo 3. Si conferma, quindi, una certa tendenza al raggruppamento da parte di individui provenienti dagli stessi comprensori. Tuttavia i gruppi identificati sulla base delle frequenze alleliche non sono esclusivi di alcun comprensorio, è infatti da questa analisi che si evince con più chiarezza la mancanza di una ben precisa struttura di popolazione. Infatti in nessun comprensorio prevale una componente genetica in particolare.

Il rimescolamento genetico è evidente anche dall'analisi bayesiana dei singoli genotipi, i cui risultati sono illustrati nella figura 7, dalla quale appare evidente come la maggior parte degli individui si disponga in aree intermedie, lontane dai vertici del triangolo che rappresentano i gruppi potenzialmente "puri" identificati dall'analisi bayesiana. Questo indica come il genotipo degli individui intermedi possa essere attribuito a diversi gruppi. Anche i risultati ottenuti con i microsatelliti sono simili a quelli ottenuti da Pecchioli *et al.* (2006) nella Provincia di Trento. Questo indica che le dinamiche delle popolazioni locali di capriolo sono simili in province

confinanti.

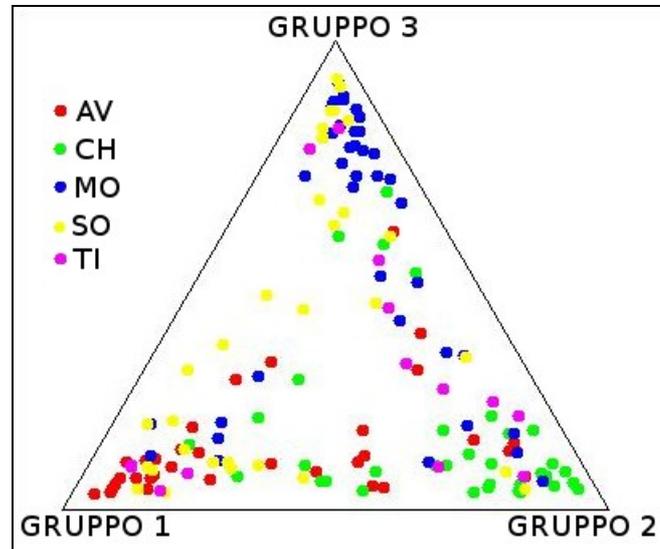


Figura 7: analisi bayesiana della struttura genetica. Gli individui sono rappresentati dai singoli punti, colorati secondo la dicitura per comprensorio di appartenenza.

La maggior differenziazione dei campioni della Val Chiavenna, evidenziata soprattutto dall'analisi fattoriale, potrebbe risiedere nel fatto che tali campioni sono localizzati nelle aree più occidentali della Provincia, quindi l'effetto della semplice distanza geografica potrebbe essere la causa principale di tale distinzione.

In conclusione è sicuramente possibile concludere che la struttura genetica delle popolazioni di capriolo sia stata e sia tutt'ora fortemente influenzata dall'intervento umano. Questo è particolarmente evidente dall'analisi del mtDNA, mentre i dati ottenuti dai microsatelliti indicano semplicemente un elevato grado di rimescolamento con alcune evidenze di differenziazione a livello locale. Questo effetto di "omogeneizzazione" della variabilità genetica operato dalle attività umane è da considerarsi sicuramente deleterio, dal momento che impedisce la fissazione di varianti genetiche selezionate dalle variazioni ambientali o da altri eventi selettivi, come, ad esempio, la diffusione di una patologia che seleziona individui più resistenti alla patologia stessa. E' quindi evidente come attività di traslocazione siano da valutare attentamente.

**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,  $\Phi$ st e Rst:** indici di differenziamento genetico. Genericamente indicano la differenza di eterozigotità 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  $\Phi$ 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 degli STR

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 7 sono riportati alcuni indici riassuntivi della variabilità genetica utilizzati per il calcolo del potere discriminatorio del set di loci prescelto.

Tabella 7

Locus	N° alleli	He	Ho	PIC	PE	PID	PID Sib
ILSTS058	6	0.490	0.442	0.489	0.441	0.300	0.580
NVRT16	8	0.788	0.653	0.788	0.777	0.075	0.375
NVRT48	3	0.344	0.340	0.344	0.290	0.462	0.693
NVRT71	4	0.383	0.187	0.383	0.297	0.429	0.666
MCM505	8	0.792	0.703	0.792	0.783	0.073	0.372
NVRT21	12	0.828	0.817	0.828	0.839	0.051	0.349
FCB304-2	16	0.881	0.813	0.881	0.912	0.026	0.316
RT1-B	9	0.815	0.741	0.815	0.817	0.059	0.357
ILSTS005	6	0.785	0.159	0.785	0.754	0.080	0.378
Totale	----	----	----	----	0.999	1.99*10 <sup>-9</sup>	0.0006
Media ± s.e.	8 ± 1.87	0.68 ± 0.07	0.54 ± 0.09	----	----	----	----

Gli indici mostrano come 7 loci su 9 abbiamo un Polymorphic Information Content (PIC) di circa 0.5 o maggiore. I loci che mostrano tali livelli di PIC sono considerati come altamente informativi, e pertanto adatti all'utilizzo per scopi di identificazione individuale. I loci NVRT 48 e NVRT71 hanno livelli medi di PIC ed un numero di alleli, rispettivamente 3 e 4, piuttosto ridotto, indice di un potere discriminatorio mediamente elevato. 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  $1.99 \cdot 10^{-9}$  (1 su 500 milioni circa) nel caso di individui non imparentati (PID), o di 0.0006 (1 su 1700) 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 scopi forensi, 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 7 e software utilizzati per il loro calcolo**

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

**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

Le analisi genetiche effettuate hanno evidenziato nella Provincia di Sondrio lo stesso *pattern* di variabilità osservato in altre popolazioni alpine. L'effetto delle traslocazioni effettuate in maniera intensiva e prolungata nel tempo è chiaramente visibile dalla distribuzione degli aplotipi mitocondriali e dal rimescolamento osservato ai marcatori nucleari STR. Il principale effetto del rimescolamento, quando viene effettuato artificialmente, è la rottura dell'equilibrio genetico stabilito da fattori demografici, biologici e dalla pressione selettiva che, in definitiva, porta alla riduzione delle potenzialità adattative proprie di ogni specie rispetto alle variazioni ambientali. E' quindi auspicabile valutare con attenzione opzioni 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**

- Benzécri JP. 1973. L'Analyse des Données: T. 2, l'Analyse des correspondances. Paris: Dunod.
- 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.
- 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.
- Miller *et al.* 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215.
- 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.
- Pedrotti L., Dupré E., Preatoni D., Toso S. 2001. Banca Dati Ungulati. Status, distribuzione, consistenza, gestione, prelievo venatorio e potenzialità delle popolazioni di Ungulati in Italia. *Biol. Cons. Fauna*, 109: 1-132.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Randi E, Mucci N, Pierpaoli M, Douzery E. 1998. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome b gene. *Proc. Biol. Sci.* 265, 793 – 801.
- Randi E, Alves PC, Carranza J, Milosevic-Zlatanovia S, Sfougaris A, Mucci N. 2004. Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology* 13: 3071-

3083.

- 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.
- Vernesi C, Pecchioli E, Caramelli D, Tiedemann R, Randi E, Bertorelle G. 2002. The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus capreolus*) populations in the Alps and Central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe. *Molecular Ecology* 11: 1285-1297.
- Hulme DJ, Smith AJ, Silk JP, Redwin JM, Beh KJ. 1995. Polymorphic sheep microsatellites at the McM2, McM131, McM135, McM136, McM140, McM200, McM214, McM373, McM505, McM517, McM512. *Animal Genetics.*, 26. 365-374.
- Kemp SJ, Hishida O, Wambugu J, Rink A, Longeri ML, Ma RZ, Da Y, Lewin HA, Barendse W, Teale AJ. 1995. A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers *Animal Genetics* 26: 299-306.
- Pierson CA, Ede AJ, Crawford AM. 1994. Ovine microsatellites at the OarHH30, OarHH51 OarHH54, OarCP88, OarCP93, OarCP134 loci. *Animal Genetics.*, 25, 294-295.
- Roed KH. 1998. Microsatellite variation in Scandinavian Cervidae using primers derived from Bovidae. *Hereditas* 129: 19-25.
- Talbot J, Haigh J, Plante Y. 1996. A parentage evaluation test in North American Elk (Wapiti) using microsatellites of ovine and bovine origin. *Animal Genetics.*, 27, 117-119.

Wilson GA, Strobeck C, WU L, Coffin JW. 1997. Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. *Molecular Ecology.*, 6. 697-698.