

RELAZIONE TECNICA



Analisi della variabilità ai loci microsatelliti e nel DNA mitocondriale in campioni biologici di Cervo (*Cervus elaphus*) della Provincia di Sondrio.

ngb | GENETICS

Analisi della variabilità ai loci microsatelliti e nel DNA
mitocondriale in campioni biologici di Cervo (*Cervus elaphus*)
della Provincia di Sondrio.

Documento redatto da:
Dr. Massimo Pierpaoli
m.pierpaoli@ngbgenetics.com

Indice

INTRODUZIONE.....	3
IL PROGETTO.....	4
IL CERVO: DISTRIBUZIONE E STATUS GESTIONALE.....	5
IL CONTESTO BIOGEOGRAFICO EUROPEO.....	7
I MARCATORI UTILIZZATI.....	8
IL CAMPIONAMENTO.....	9
ANALISI GENETICHE.....	11
Estrazione del DNA.....	11
Amplificazione e sequenziamento del D-loop.....	11
Amplificazione e tipizzazione dei microsatelliti.....	12
RISULTATI.....	13
Indici generali di variabilità genetica.....	13
Variabilità tra popolazioni.....	16
Analisi della struttura filogeografica.....	16
Analisi dei microsatelliti.....	20
Utilizzo a scopo forense dei microsatelliti.....	24
Conclusioni.....	26
BIBLIOGRAFIA.....	27
ALLEGATI.....	29
Allegato 1.....	30
Allegato 2.....	46

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 CERVO: DISTRIBUZIONE E STATUS GESTIONALE

Il Cervo (*C. elaphus*) è diffuso in tutta l'Europa continentale, con distribuzioni discontinue in occidente e più diffuse ed estese in oriente, nei Balcani nelle Isole Britanniche e nella parte centrale e meridionale della Scandinavia. L'areale extraeuropeo comprende una vasta porzione dell'Asia, dagli Urali fino alla Siberia meridionale ed alla Manciuria, dall'Iran alla Mongolia. In Africa il Cervo è presente in Algeria e Tunisia, mentre in Nord America è diffuso dal Canada sud-occidentale al Colorado, lungo le Montagne Rocciose.

In Italia la specie è attualmente presente lungo tutto l'arco alpino, senza soluzione di continuità da Udine ad Cuneo e lungo i rilievi appenninici, con popolazioni frammentate ma in rapida espansione e nell'Appennino settentrionale, prossime alla fusione. (Fig. 1). Nel Bosco della Mesola (Ferrara) è presente, in un'area recintata, quella che viene considerata come l'ultima popolazione autoctona tipica dell'Italia peninsulare. In Sardegna, come probabile conseguenza di introduzioni effettuate in tempi storici, è presente la sottospecie *C. e. corsicanus*.

In Italia il Cervo era uniformemente distribuito in tutta la penisola fino al X-XI secolo, a quella data a causa delle trasformazioni ambientali antropogeniche ed alla caccia inizia il declino che si protrae fino alla metà del XX secolo, quando raggiunge il minimo storico con le sole popolazioni relitte della Mesola e dell'Alto Adige. Da quella data la tendenza si inverte, le Alpi centro-orientali vengono ricolonizzate da individui provenienti dalle popolazioni svizzere, austriache e slovene mentre nelle Alpi occidentali vengono effettuate reintroduzioni utilizzando individui di provenienza alpina o centro-europea. Tutte le popolazioni appenniniche, con l'eccezione della popolazione del Bosco della Mesola, sono originate da progetti di reintroduzione avvenuti anche in tempi recentissimi (Carnevali *et al.* 2009).

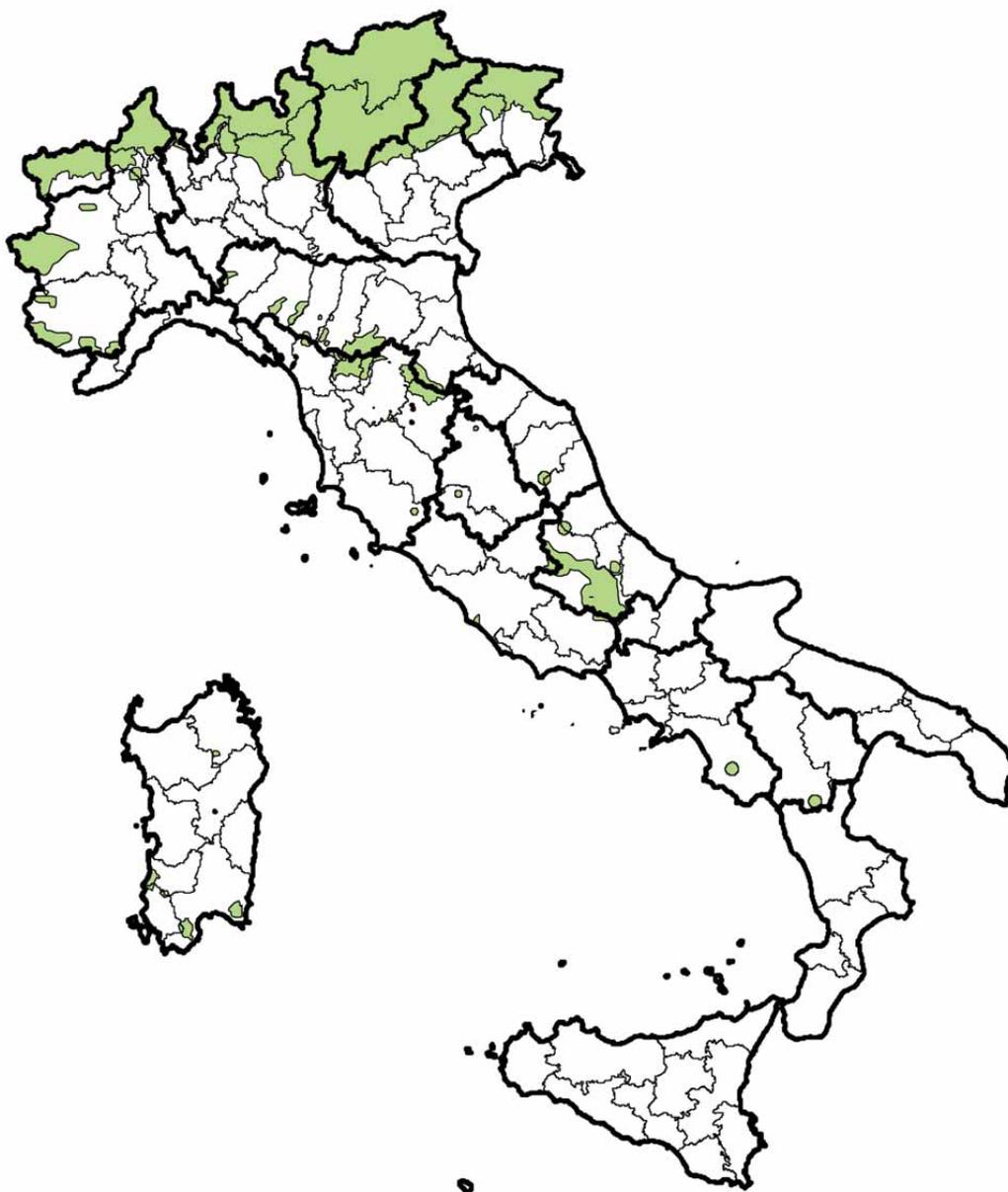


Fig. 1: distribuzione del cervo al 2006 (Carnevali et al. 2009)

Grazie agli interventi di reintroduzione ed alla gestione le consistenze delle popolazioni sono in costante aumento, con un aumento medio del 44% dal 2000 al 2005 che coinvolge tutto il territorio nazionale (Fig. 2). Gli incrementi maggiori si sono verificati nell'arco alpino e nell'Appennino settentrionale. Si stima che il 13% della popolazione totale sia localizzato in Lombardia, con oltre 3000 capi censiti nella Provincia di Sondrio nel 2005 (Carnevali *et al.* 2009).

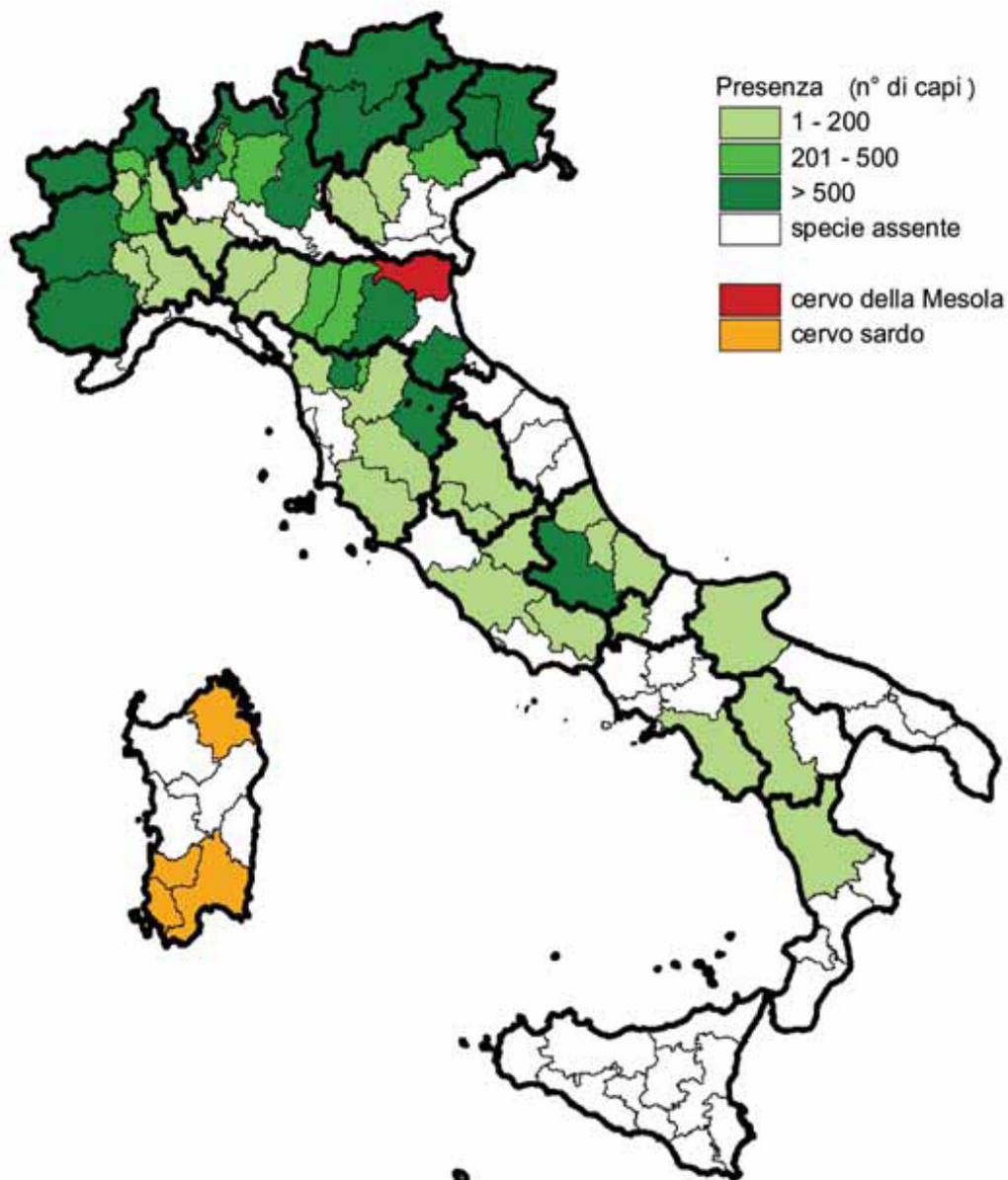


Fig. 2: presenza (n° di capi) nelle province italiane al 2005 (Carnevali et al. 2009)

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 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, Medio-Oriente ed Africa (Skog *et al.* 2009; Niedziałkowska et al. 2011), suggeriscono che il modello di isolamento in aree rifugio meridionali e successiva ricolonizzazione di aree settentrionali, descritto precedentemente, possa applicarsi anche al Cervo. Tali autori ipotizzano l'esistenza di almeno due aree rifugio in Europa, localizzate nelle penisole Iberica e nei Balcani, e di una successiva ricolonizzazione dell'Europa continentale avvenuta principalmente ad opera delle popolazioni del rifugio iberico.

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).

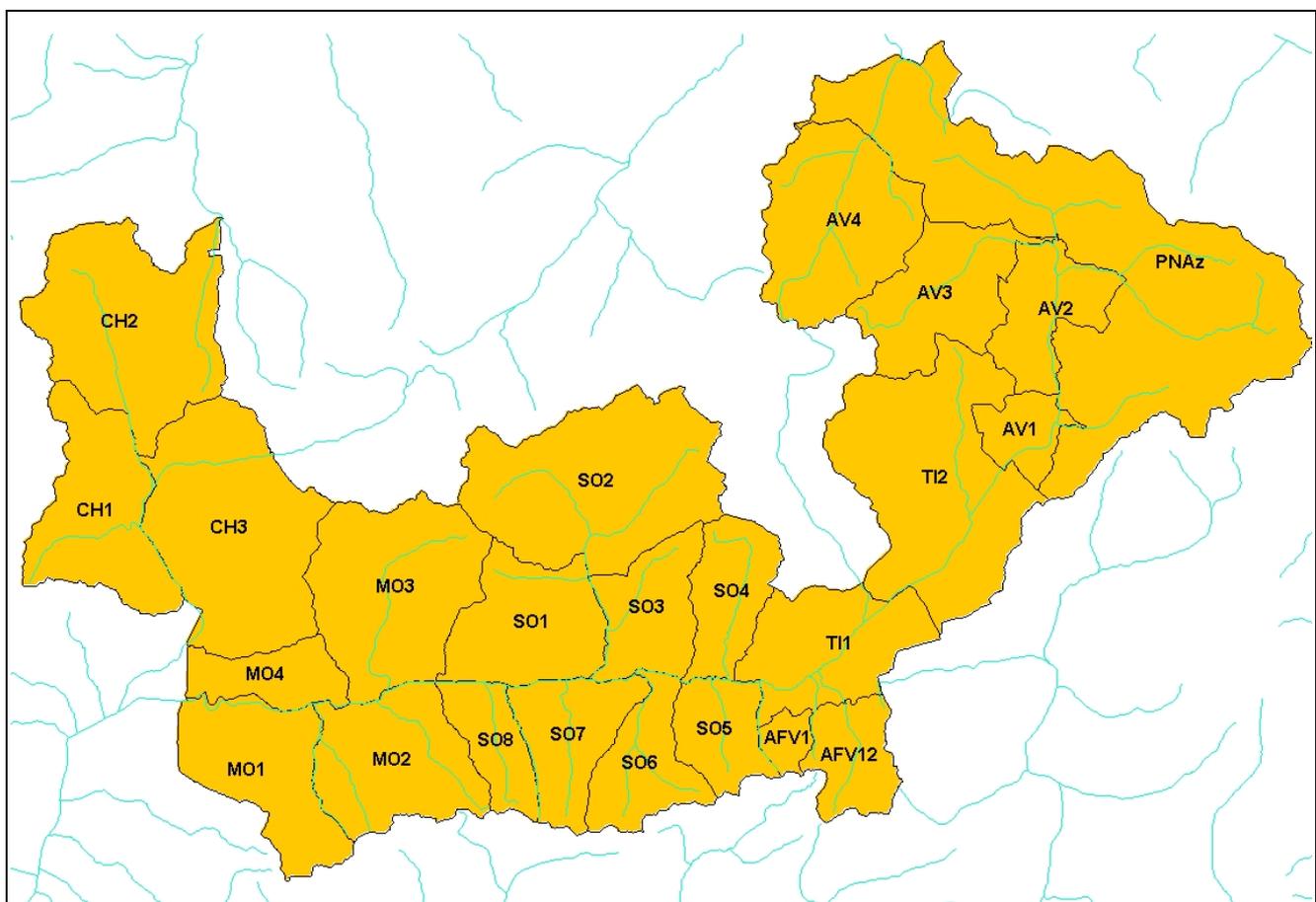


Fig. 3: comprensori della Provincia di Sondrio. Vengono indicati i confini dei comprensori ed i corsi d'acqua.

Sono quindi stati analizzati un totale di 187 campioni di Cervo, con un minimo di 17 ed un massimo di 50 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)	38	37	38
Morbegno (MO)	39	32	39
Sondrio (SO)	43	37	43
Tirano (TI)	50	48	50
Alta Valtellina (AV)	17	16	17
Totale	187	170	187

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_Cel_Sondrio.fas", ed Allegato 1 nel presente documento).

Amplificazione e tipizzazione dei microsatelliti

Il DNA nucleare è stato analizzato tramite l'amplificazione mediante PCR dei 9 loci microsatelliti elencati in tabella 2.

Locus	Sequenza	N° basi	Riferimenti bibliografici
IDVGA37F	TAACAGGACAAGTCTTCAGGTG	22	Mezzelani <i>et al.</i> (1995)
	CCTCTCTTTCTCTATGCTCACA	22	
TGLA40F	GCTTCTCTGCCAACTAATATTATCC	25	Barendse <i>et al.</i> (1994)
	CACCAGGTAAGCCCCTTATATATGT	25	
RM012F	CTGAGCTCAGGGGTTTTTGCT	21	Kossarek <i>et al.</i> (1994).
	ACTGGGAACCAAGGACTGTCA	21	
RM095F	TCCATGGGGTCGCAAACAGTGG	22	Kossarek <i>et al.</i> (1994).
	ATCCCTCCATTTGTTGTGGAGTT	23	
BM757F	TGGAACAATGTAAACCTGGG	21	Bishop <i>et al.</i> (1994)
	TTGAGCCACCAAGGAACCc	19	
BM6438F	TTGAGCACAGACACAGACTGG	21	Bishop <i>et al.</i> (1994)
	ACTGAATGCCTCCTTTGTGC	20	
INRA131F	GGTAAAATCCTGCAAAACACAG	22	Vaiman <i>et al.</i> (1994)
	TGACTGTATAGACTGAAGCAAC	22	
RT1F	CATATGGCTAACTACCTAGCTTGCC	25	Wilson <i>et al.</i> (1997). Modificato da Pérez--Espona <i>et al.</i> (2008)
	GAGTCCCAAAGATTTTCAGCCCTAC	24	
CelJP38F	GCTCCAGATTATCCAGTGTATTGCC	26	Barendse <i>et al.</i> (1994)
	CTGCACAGAGTCGGACACAAC	21	

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.

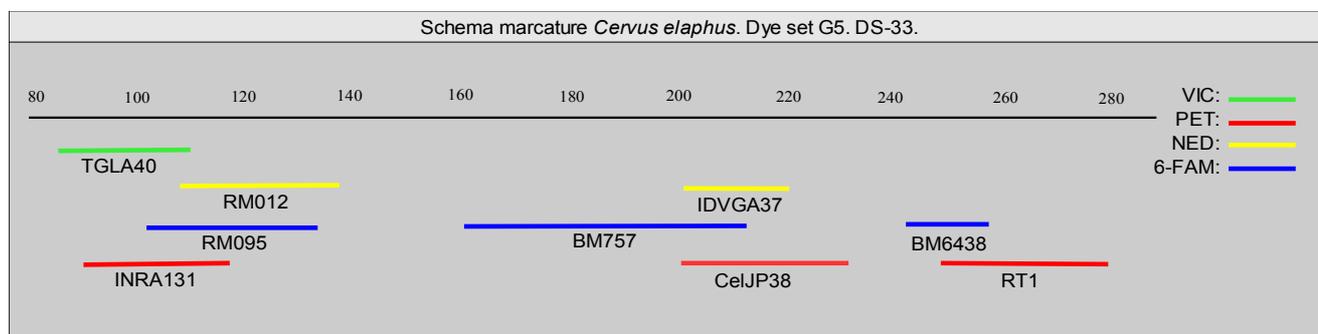


Figura 4: schema marcature e multiplex di caricamento.

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 cinque gruppi, corrispondenti ai comprensori.

Per quanto riguarda i dati riguardanti il set totale di dati, il DNA mitocondriale evidenzia che la diversità aplotipica ($H = 0.452 \pm 0.026$) è attestata su livelli medi, mentre la diversità nucleotidica ($\pi = 0.015 \pm 0.0009$) è piuttosto alta, tali livelli di variabilità sono confrontabili con quelli riscontrati nella vicina Provincia di Trento (Pecchioli *et al.* 2006). In pratica ad un ridotto numero di aplotipi ($k = 4$) osservato in tutta la Provincia di Sondrio corrisponde una discreta differenziazione tra gli aplotipi stessi, indicata sia come numero di siti polimorfici ($s = 13$) sia come diversità nucleotidica (π). L'analisi del mtDNA effettuata sui singoli gruppi evidenzia inoltre una minore variabilità nel comprensorio Val Chiavenna rispetto agli altri. L'analisi dei microsatelliti indica una sostanziale omogeneità tra i comprensori per quanto riguarda il numero di alleli e l'eterozigosità osservata. A livello globale si evidenzia un solo locus con un lieve scostamento dall'equilibrio di Hardy-Weinberg e livelli di Fis inferiori al 5%. A livello dei singoli comprensori solamente Morbegno e Sondrio evidenziano un significativo deficit di eterozigoti con, rispettivamente, uno e due loci che si discostano in maniera significativa dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. La presenza di struttura di popolazione così come la presenza di alleli nulli, o entrambi, potrebbero spiegare tale scostamento.

Tabella 3

Area	mtDNA				
	N	k	H \pm s.d.	s	$\pi \pm$ s.d.
Provincia SO	182	4	0.452 \pm 0.026	13	0.015 \pm 0.0009
Chiavenna (CH)	37	4	0.332 \pm 0.092	13	0.0098 \pm 0.0028
Morbegno (MO)	32	2	0.498 \pm 0.039	12	0.0173 \pm 0.0014
Sondrio (SO)	37	2	0.429 \pm 0.063	12	0.0150 \pm 0.0022
Tirano (TI)	48	2	0.467 \pm 0.043	12	0.0163 \pm 0.0015
Alta Valtellina (AV)	16	2	0.5 \pm 0.074	12	0.017 \pm 0.0026

Tabella 3. Continua

Area	STR					
	N	ko	Ho	He	Fis	HWE
Provincia SO	187	8.7	0.708 \pm 0.104	0.737 \pm 0.085	0.043	1
Chiavenna (CH)	38	7.2	0.705 \pm 0.142	0.721 \pm 0.120	0.037	1
Morbegno (MO)	39	7.2	0.698 \pm 0.091	0.711 \pm 0.076	0.032**	1
Sondrio (SO)	43	7.7	0.710 \pm 0.151	0.727 \pm 0.084	0.035**	2
Tirano (TI)	50	8	0.710 \pm 0.106	0.730 \pm 0.084	0.038	1
Alta Valtellina (AV)	17	6.8	0.746 \pm 0.076	0.724 \pm 0.076	0.031	1

Livello di significatività: * = P < 0.05, ** = 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 minore nel campione globale (1) rispetto ai singoli comprensori (1-2) indica, probabilmente, la mancanza di una marcata sottostruttura di popolazione. Il disequilibrio osservato potrebbe 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.

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

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 Φ_{st}). I risultati (Tab. 4) indicano l'esistenza di una sostanziale omogeneità tra i cervi di tutta la provincia, infatti solo una piccolissima proporzione di variabilità genetica, circa l' 1.5%, è dovuta alla differenziazione tra comprensori. In particolare la differenziazione osservata a livello del mtDNA non è statisticamente significativa.

Tabella 4

Ripartizione della varianza molecolare (%)	mtDNA		STR	
	F_{st}	Φ_{st}	F_{st}	R_{st}
Tra comprensori	1.48	1.65	1.06	1.71
Entro comprensori	98.52	98.35	98.94	98.29
Significatività	N.S.	N.S.	***	**

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

Non sono state riscontrate differenze sostanziali tra gli indici classici (F_{st}) e gli indici basati sulle distanze molecolari (Φ_{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 scarsissima, se non nulla, differenziazione ed un elevato flusso genico tra i cervi 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 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. 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 Skog *et al.* (2009), che ha analizzato campioni provenienti da diverse popolazioni in Europa. In tale studio si è evidenziata la presenza di 3 gruppi di aplotipi (A, B e C), associati ad aree geografiche distinte. L'aplogruppo A è distribuito lungo la direttrice sud - nord del continente, con una probabile area di rifugio glaciale collocabile nella penisola iberica dalla quale, alla fine dell'ultima glaciazione, si è originata la ricolonizzazione di gran parte dell'Europa occidentale, incluse le isole britanniche e la penisola scandinava. L'aplogruppo C ha evidenziato invece una distribuzione concentrata nelle aree alpine orientali, nell'est Europa e nei Carpazi e nei Balcani, con queste ultime due aree probabili aree di rifugio glaciale, l'aplogruppo B, infine, è stato individuato solo in Africa settentrionale ed in Sardegna. (Figg. 5 e 6, Skog *et al.* 2009, Niedziałkowska *et al.* 2011).

I campioni della Provincia di Sondrio hanno evidenziato aplotipi distribuiti in maniera praticamente omogenea nel gruppo A (Cel100 e Cel219) e nel gruppo C (Cel10 e Cel151, Tab. 5 e Fig. 5), con prevalenza del gruppo C (N = 117) sul gruppo A (N = 53).

Tabella 5

Aplotipo	AV	CH	MO	SO	TI	Totale	Aplogruppo
Cel10	10	30	19	26	31	116	C *
Cel100	6	5	13	11	17	52	A *
Cel151	0	1	0	0	0	1	C *
Cel219	0	1	0	0	0	1	A *

*: denominazione degli aplogruppi secondo Skog *et al.* 2009

La presenza di tale rimescolamento nella provincia di Sondrio sembra essere piuttosto atipica, dal momento che sia Skog *et al.* (2009) che Niedziałkowska *et al.* (2011), hanno invece evidenziato un buon livello di omogeneità all'interno delle popolazioni di Cervo da loro analizzate. E' tuttavia degna di nota l'osservazione che anche la popolazione della Val di Susa esibisce un livello di rimescolamento tra aplotipi dei gruppi A e C simile a quello osservato nella Provincia di Sondrio. Tale rimescolamento è molto probabilmente dovuto alla somma degli effetti delle reintroduzioni effettuate a partire dagli anni '50 del XX° secolo con gli effetti della ricolonizzazione naturale ad opera di migranti provenienti dalle vicine regioni della Svizzera, dell'Austria, della Slovenia.

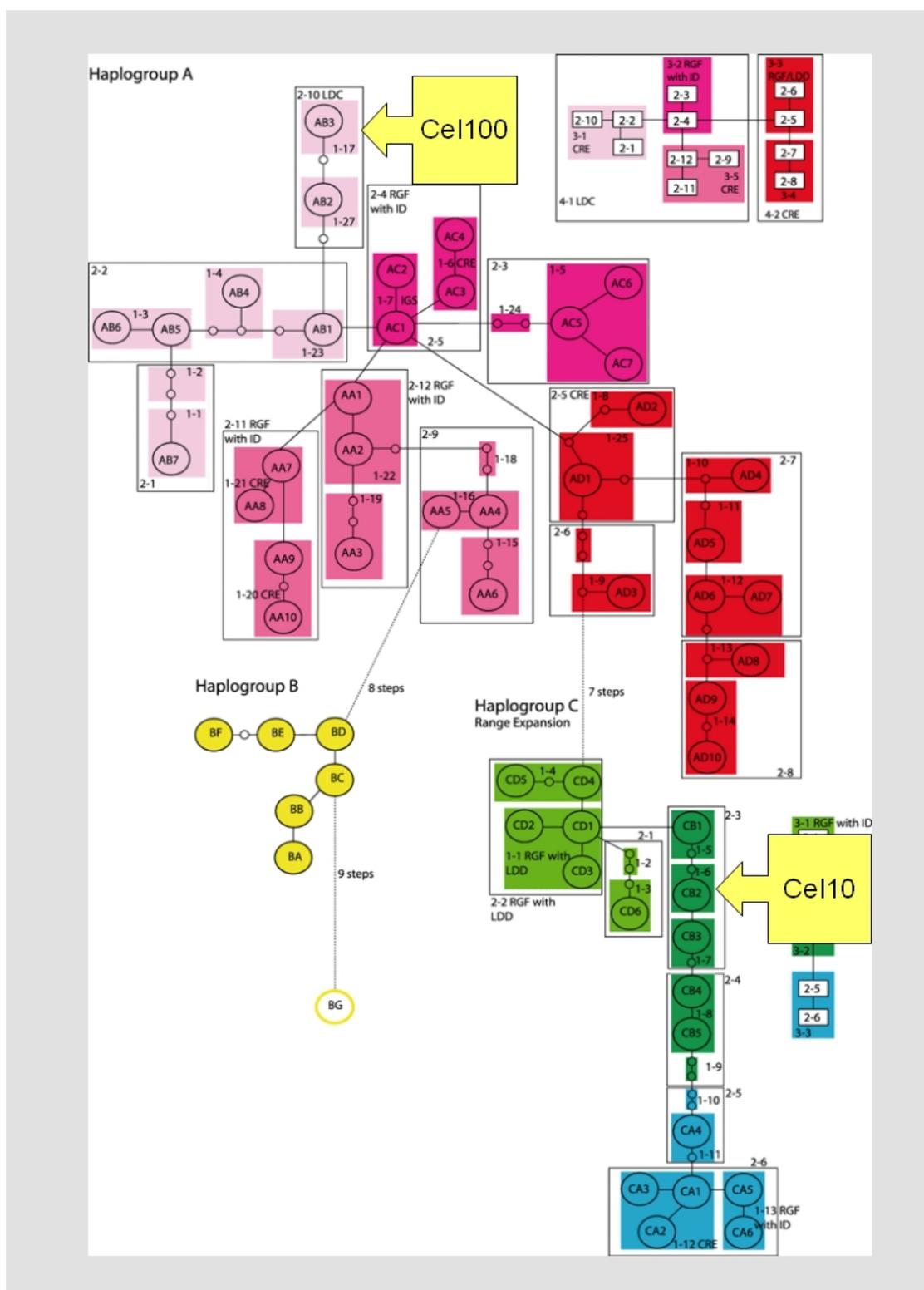


Figura 5. Ridisegnata da Skog et al. (2009). Network di aplotipi di Cervo. Rosso e rosa: aplogruppo A (Europa occidentale); verde e blu: aplogruppo C (Balcani e centro Europa); giallo: aplogruppo B (Sardegna ed Africa settentrionale); Cel10 e Cel100: aplotipi individuati nella Provincia di Sondrio.

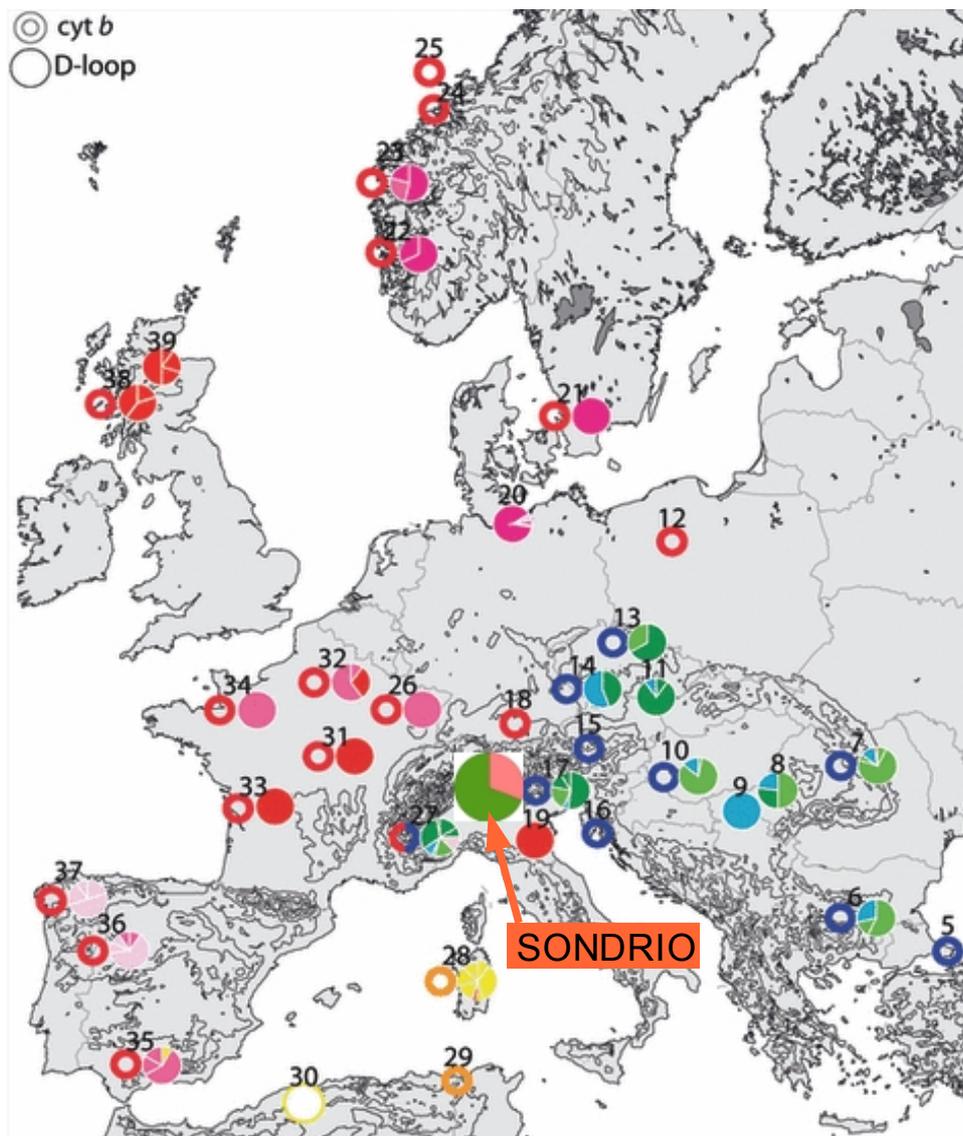


Figura 6. Ridisegnata da Skog et al. (2009). Distribuzione degli aplogruppi a livello continentale. La freccia indica la proporzione dei due aplogruppi nella Provincia di Sondrio. Rosso e rosa: aplogruppo A (Europa occidentale); verde e blu: aplogruppo C (Balcani e centro Europa); giallo: aplogruppo B (Sardegna ed Africa settentrionale).

E' importante notare che anche Pecchioli *et al.* (2006) hanno individuato in Provincia di Trento una struttura genetica esattamente sovrapponibile. Basandoci, quindi, sull'attuale stato delle conoscenze sembrerebbe che le popolazioni di cervo della Provincia di Sondrio e delle aree limitrofe siano state originate da individui appartenenti a linee evolutive mitocondriali ben distinte (aplogruppi A e C). L'interpretazione ai fini gestionali di tale struttura genetica non è semplice, dal momento che le Alpi sono state ricolonizzate sia per

immigrazione di individui provenienti da aree limitrofe, sia per reintroduzione. Il rimescolamento di aplotipi di gruppo A e C potrebbe essere quindi spiegato sia in termini di ricolonizzazione naturale, con individui di gruppo A provenienti da Svizzera e Austria ed individui di gruppo C provenienti dalle popolazioni orientali dell'arco alpino, sia in termini di reintroduzioni effettuate con individui di origine balcanica e/o centro europea (aplogruppo C). Un'analisi della documentazione riguardante le reintroduzioni effettuate e le relative aree di origine potrebbe aiutare nella comprensione della struttura osservata.

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, effettuata sui cinque marcatori separatamente e sul set di dati completo, indica la probabile presenza di alleli nulli al locus TGLA40, tale locus è stato quindi escluso dalle analisi statistiche che si basano esclusivamente sull'equilibrio di Hardy-Weinberg.

In figura 7 sono illustrati i risultati dell'analisi fattoriale delle corrispondenze, effettuata utilizzando i singoli campioni (genotipi).

Si confermano i risultati di scarsissima differenziazione tra gruppi ottenuti precedentemente con l'AMOVA, 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.

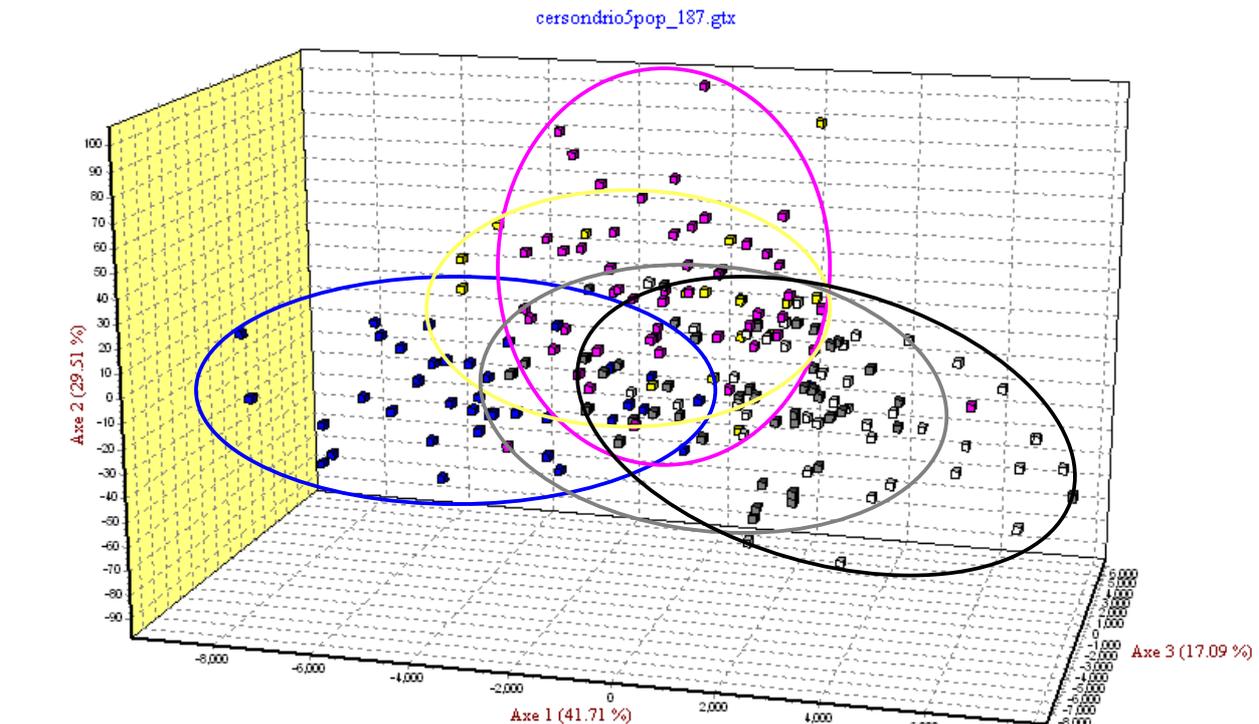


Figura 7: analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC) effettuata sui singoli genotipi multilocus. I campioni appartenenti allo stesso comprensorio sono indicati con lo stesso colore. Le ellissi, tracciate arbitrariamente, servono ad evidenziare le distribuzioni dei campioni dei diversi comprensori. Colore ellissi: giallo: AV, blu: CH, nero: MO, grigio: SO, viola: TI.

L'analisi bayesiana della struttura genetica è stata effettuata escludendo il locus TGLA40, dal momento che questo ha evidenziato degli scostamenti significativi dall'equilibrio di Hardy-Weinberg a causa, molto probabilmente, della presenza di alleli nulli. I risultati hanno mostrato una completa assenza di struttura di popolazione, infatti i campioni vengono assegnati in proporzioni uguali a tutti i gruppi che sono stati di volta in volta testati ($K = 2$, $K = 3$). A titolo esemplificativo si riportano i risultati ottenuti dalla simulazione effettuata utilizzando $K = 2$ come numero di popolazioni presunte (Tabella 6). Questo risultato può essere spiegato alla luce del bassissimo livello di disequilibrio di Hardy-Weinberg ($F_{is} = 0.043$) presente nei campioni analizzati, ed evidenziato in tabella 3. A ciò va aggiunto il fatto che un solo locus (TGLA40) si è rivelato responsabile della maggior parte del disequilibrio osservato a causa della presenza di alleli nulli, ed è stato per questo escluso, diminuendo ulteriormente la quantità di disequilibrio utilizzabile nell'analisi bayesiana per dedurre una eventuale struttura di popolazione.

Tabella 6

Comprensorio	Gruppo 1	Gruppo 2	N° individui
AV	0,5	0,5	17
CH	0,49	0,51	38
MO	0,5	0,5	39
SO	0,5	0,5	43
TI	0,5	0,5	50

Nota: il locus TGLA40 è stato escluso dal momento che l'analisi bayesiana qui effettuata si basa esclusivamente sull'equilibrio di Hardy-Weinberg.

In conclusione è sicuramente possibile concludere che la struttura genetica delle popolazioni di Cervo 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 (Fig.7). 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, Φ 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 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 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
BM6438	7	0.64	0.61	0.64	0.43	0.15	0.47
BM757	11	0.79	0.79	0.8	0.61	0.06	0.36
CELJP38	11	0.65	0.65	0.66	0.44	0.14	0.45
IDVGA37	7	0.73	0.71	0.74	0.52	0.10	0.40
INRA131	5	0.66	0.68	0.67	0.41	0.16	0.45
RM012	9	0.82	0.78	0.82	0.64	0.05	0.35
RM095	13	0.85	0.84	0.85	0.71	0.03	0.33
RT1	13	0.81	0.76	0.81	0.64	0.05	0.35
TGLA40	10	0.66	0.51	0.66	0.41	0.05	0.46
Totale	----	----	----	----	0.999	$4.6 \cdot 10^{-10}$	$2.9 \cdot 10^{-4}$
Media ± s.e.	9.56 ± 2.63	0.73 ± 0.08	0.70 ± 0.10	----	----	----	----

Gli indici mostrano come 9 loci su 9 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 $4.6 \cdot 10^{-10}$ (1 su 1 miliardo circa) nel caso di individui non imparentati (PID), o di 0.0003 (1 su 3200) 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 GenAlEx 6.1 (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx>).

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

- Barendse W. et al. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*, 6: 227-235.
- 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.
- 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.
- Kossarek LM *et al.* 1994. Five bovine dinucleotide repeat polymorphisms: RM011, RM012, RM016, RM019 and RM024. *Animal Genetics*. 25: 205–206.
- Mezzelani A. *et al.* 1995. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3,802 microsatellites. *Mamm Genome*, 6: 629-635.
- Miller *et al.* 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215.
- Niedziałkowska M. *et al.* 2011. Molecular biogeography of red deer *Cervus elaphus* from eastern Europe: insights from mitochondrial DNA sequences. *Acta Theriol.* 56:1–12.
- 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.
- Pérez-Espona S. *et al.* 2008. Landscape features affect gene flow of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*) *Molecular Ecology*, 17: 981–996.
- 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.
- Skog A. *et al.* 2009. Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *J. Biogeogr.* 36: 66–77.
- 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.
- 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.

ALLEGATI

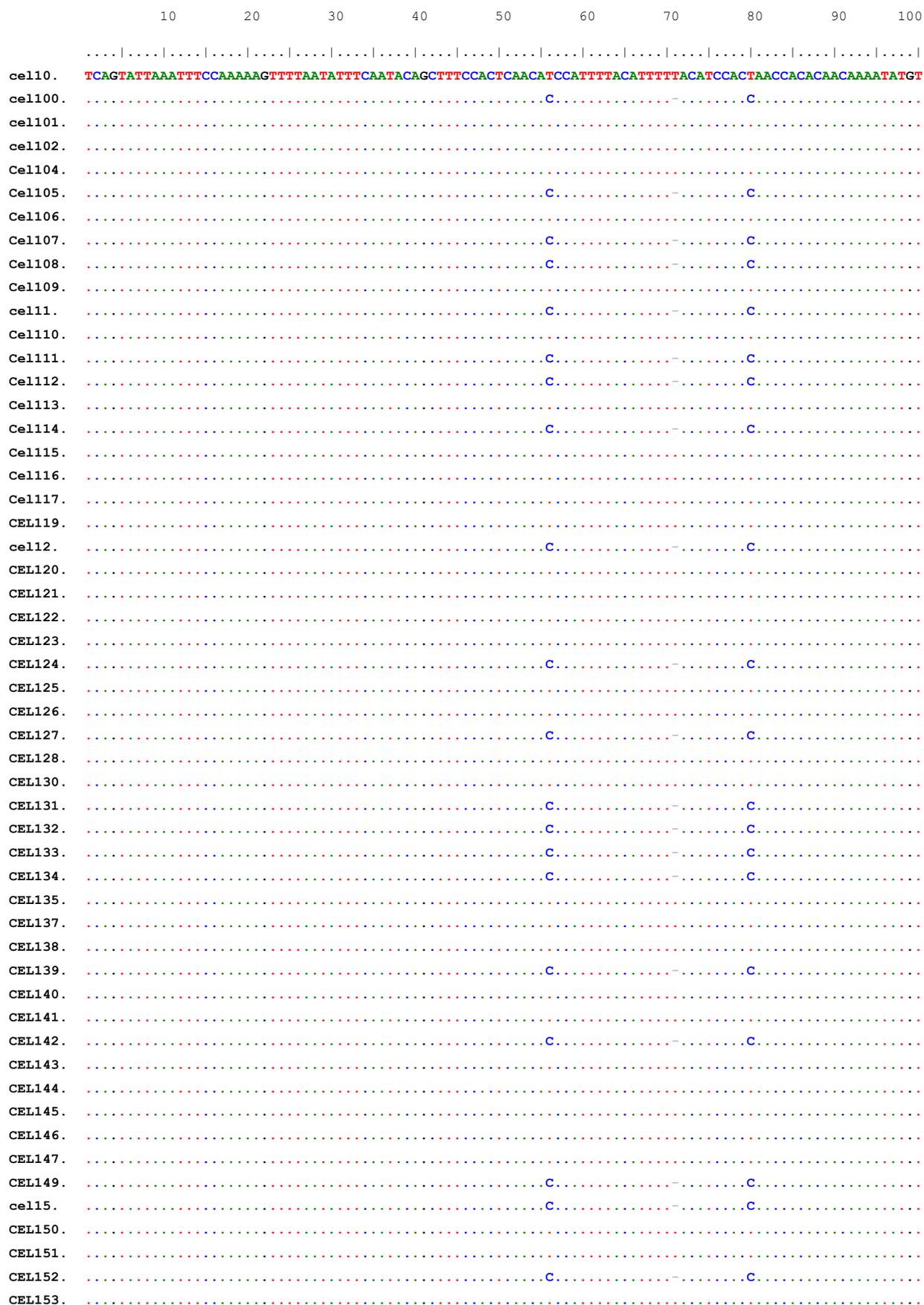
Allegato 1

Allineamento del frammento di D-loop. I punti indicano posizioni identiche rispetto alla sequenza di riferimento Cel10. I campioni sono identificati con una codifica interna la cui conversione è riportata nell'allegato 2.

Allegato 2

Tabella alleli. Viene riportato in colonna 2 l'identificativo interno dei campioni.

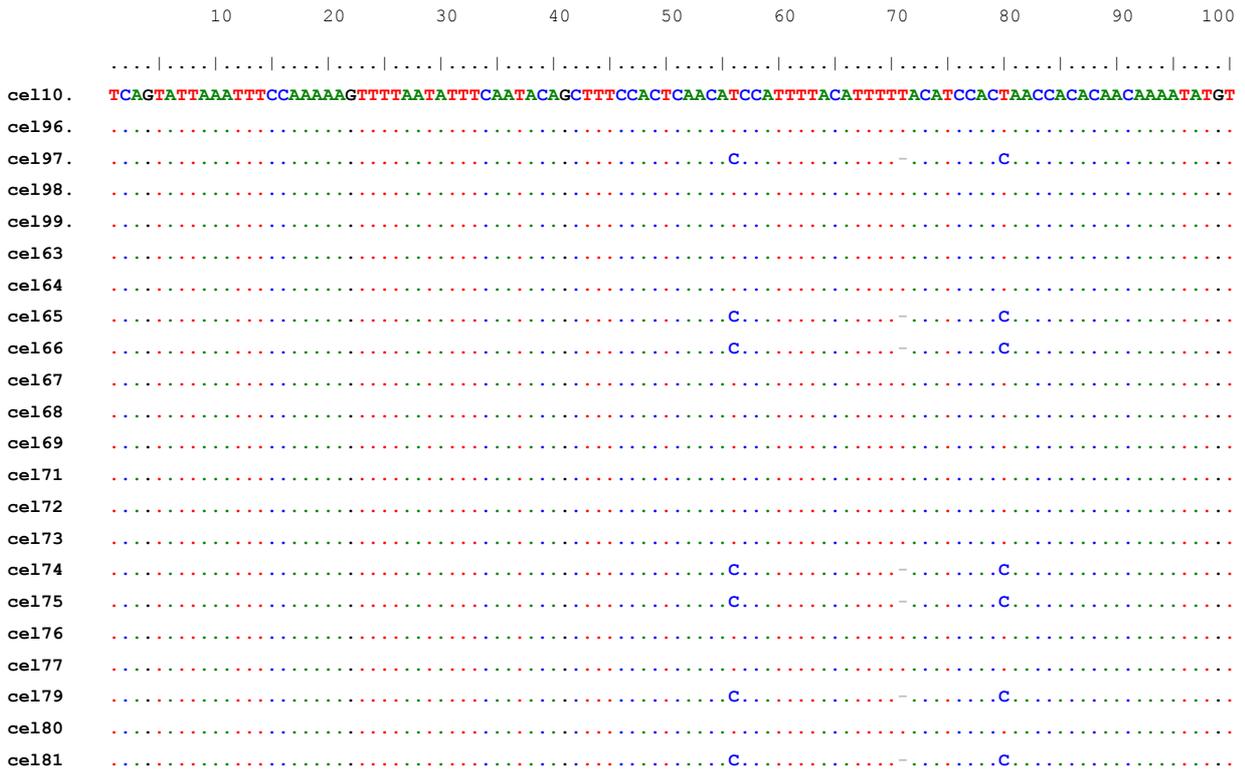
Allegato 1.



10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

cell10.	TCAGTATTAAATTCCAAAAGTTTAAATATTCAATACAGCTTCCACTCAACATCCATTTTACATTTTACATCCACTAACCCACAAACAAAATATGT
CEL154.
CEL155.
CEL156.
CEL157.
CEL159.C.....-.....C.....
CEL160.C.....-.....C.....
CEL161.
CEL162.C.....-.....C.....
CEL163.
CEL164.
CEL167.
CEL168.C.....-.....C.....
CEL169.C.....-.....C.....
CEL170.
CEL171.
CEL172.C.....-.....C.....
CEL173.
CEL174.C.....-.....C.....
CEL175.
CEL176.
CEL177.
CEL178.
CEL179.
cell18.
CEL180.
CEL181.
CEL182.
CEL183.
CEL185.C.....-.....C.....
CEL186.
CEL187.
CEL188.
cell19.C.....-.....C.....
CEL191.
CEL192.
CEL193.
CEL194.C.....-.....C.....
cell199.C.....-.....C.....
cell20.C.....-.....C.....
cell200.
cell201.
cell202.
cell203.
cell204.C.....-.....C.....
cell206.
cell207.C.....-.....C.....
cell208.
cell209.
cell210.
cell211.
cell212.
cell213.
cell214.
cell215.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
cel10.	TCAGTATTAAATTTCCAAAAAGTTTAAATATTCAATACAGCTTCCACTCAACATCCATTTTACATTTTACATCCACTAACCCACACAACAAAATATGT										
cel216.										
cel217.										
cel218.										
cel219.C.....-.....C.....										
cel22.										
cel220.C.....-.....C.....										
cel221.C.....-.....C.....										
cel222.C.....-.....C.....										
cel223.C.....-.....C.....										
cel24.										
cel25.C.....-.....C.....										
cel26.										
cel27.C.....-.....C.....										
cel28.										
cel29.										
cel3.C.....-.....C.....										
cel30.										
cel31.										
cel32.										
cel33.										
cel34.										
cel35.										
cel37.										
cel38.C.....-.....C.....										
cel39.										
cel4.										
cel40.C.....-.....C.....										
cel41.										
cel42.										
cel43.										
cel44.										
cel45.										
cel46.										
cel47.C.....-.....C.....										
cel48.C.....-.....C.....										
cel49.										
cel5.C.....-.....C.....										
cel50.										
cel51.C.....-.....C.....										
cel6.C.....-.....C.....										
cel7.										
cel8.										
cel85.										
cel86.										
cel87.C.....-.....C.....										
cel88.										
cel89.										
cel9.										
cel90.										
cel91.										
cel92.C.....-.....C.....										
cel93.										
cel94.C.....-.....C.....										
cel95.										



	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
cell10.	AAATGTAATCTTATGCGCTTATAGTACATAGAAATTAATGTACTAGGACATACTATGTATAATAGTACATTATATTATATGCCCCATGCTTATAAGCATGT									
cell100.	A	C				T				A
cell101.										
cell102.										
Cell104.										
Cell105.	A	C				T				A
Cell106.										
Cell107.	A	C				T				A
Cell108.	A	C				T				A
Cell109.										
cell11.	A	C				T				A
Cell110.										
Cell111.	A	C				T				A
Cell112.	A	C				T				A
Cell113.										
Cell114.	A	C				T				A
Cell115.										
Cell116.										
Cell117.										
CEL119.										
cell12.	A	C				T				A
CEL120.										
CEL121.										
CEL122.										
CEL123.										
CEL124.	A	C				T				A
CEL125.										
CEL126.										
CEL127.	A	C				T				A
CEL128.										
CEL130.										
CEL131.	A	C				T				A
CEL132.	A	C				T				A
CEL133.	A	C				T				A
CEL134.	A	C				T				A
CEL135.										
CEL137.										
CEL138.										
CEL139.	A	C				T				A
CEL140.										
CEL141.										
CEL142.	A	C				T				A
CEL143.										
CEL144.										
CEL145.										
CEL146.										
CEL147.										
CEL149.	A	C				T				A
cell15.	A	C				T				A
CEL150.										
CEL151.										
CEL152.	A	C				T				A
CEL153.										
CEL154.										
CEL155.										

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200		
cel110.	AATGTAAATCTTATGCGCTTATAGTACATAGAAATTAATGTACTAGGACATACATGTATAAATAGTACATTATATATGCCCCATGCTTATAAGCATGT											
CEL156.											
CEL157.											
CEL159.	A	C						T		A
CEL160.	A	C						T		A
CEL161.											
CEL162.	A	C						T		A
CEL163.											
CEL164.											
CEL167.											
CEL168.	A	C						T		A
CEL169.	A	C						T		A
CEL170.											
CEL171.											
CEL172.	A	C						T		A
CEL173.											
CEL174.	A	C						T		A
CEL175.											
CEL176.											
CEL177.											
CEL178.											
CEL179.											
cel118.											
CEL180.											
CEL181.											
CEL182.											
CEL183.											
CEL185.	A	C						T		A
CEL186.											
CEL187.											
CEL188.											
cel119.	A	C						T		A
CEL191.											
CEL192.											
CEL193.											
CEL194.	A	C						T		A
cel1199.	A	C						T		A
cel120.	A	C						T		A
cel200.											
cel201.											
cel202.											
cel203.											
cel204.	A	C						T		A
cel206.											
cel207.	A	C						T		A
cel208.											
cel209.											
cel210.											
cel211.											
cel212.											
cel213.											
cel214.											
cel215.											
cel216.											
cel217.											

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
cel110.	AATGTAATCTTATGCGCTTATAGTACATAGAAATTAATGTACTAGGACATACTATGTATAATAGTACATTATATTATATGCCCATGCTTATAAGCATGT										
cel1218.										
cel1219.	A	C							T	A	
cel122.										
cel1220.	A	C							T	A	
cel1221.	A	C							T	A	
cel1222.	A	C							T	A	
cel1223.	A	C							T	A	
cel124.										
cel125.	A	C							T	A	
cel126.										
cel127.	A	C							T	A	
cel128.										
cel129.										
cel13.	A	C							T	A	
cel130.										
cel131.										
cel132.										
cel133.										
cel134.										
cel135.										
cel137.										
cel138.	A	C							T	A	
cel139.										
cel14.										
cel140.	A	C							T	A	
cel141.										
cel142.										
cel143.										
cel144.										
cel145.										
cel146.										
cel147.	A	C							T	A	
cel148.	A	C							T	A	
cel149.										
cel15.	A	C							T	A	
cel150.										
cel151.	A	C							T	A	
cel16.	A	C							T	A	
cel17.										
cel18.										
cel185.										
cel186.										
cel187.	A	C							T	A	
cel188.										
cel189.										
cel19.										
cel190.										
cel191.										
cel192.	A	C							T	A	
cel193.										
cel194.	A	C							T	A	
cel195.										
cel196.										
cel197.	A	C							T	A	

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
cell10.	ACTTCTATTATTATAGTACATAGTACATGATGTTGTTTCATCGTACATAGCACATTAAGTCAAATCAATCTGTCAACATGCATATCCCGTCCCCTAG										
cell100.TG.....G.C.....G.....										
cell101.										
cell102.										
Cell104.										
Cell105.TG.....G.C.....G.....										
Cell106.										
Cell107.TG.....G.C.....G.....										
Cell108.TG.....G.C.....G.....										
Cell109.										
cell11.TG.....G.C.....G.....										
Cell110.										
Cell111.TG.....G.C.....G.....										
Cell112.TG.....G.C.....G.....										
Cell113.										
Cell114.TG.....G.C.....G.....										
Cell115.										
Cell116.										
Cell117.										
CEL119.										
cell12.TG.....G.C.....G.....										
CEL120.										
CEL121.										
CEL122.										
CEL123.										
CEL124.TG.....G.C.....G.....										
CEL125.										
CEL126.										
CEL127.TG.....G.C.....G.....										
CEL128.										
CEL130.										
CEL131.TG.....G.C.....G.....										
CEL132.TG.....G.C.....G.....										
CEL133.TG.....G.C.....G.....										
CEL134.TG.....G.C.....G.....										
CEL135.										
CEL137.										
CEL138.										
CEL139.TG.....G.C.....G.....										
CEL140.										
CEL141.										
CEL142.TG.....G.C.....G.....										
CEL143.										
CEL144.										
CEL145.Y.....										
CEL146.										
CEL147.										
CEL149.TG.....G.C.....G.....										
cell15.TG.....G.C.....G.....										
CEL150.										
CEL151.C.....										
CEL152.TG.....G.C.....G.....										
CEL153.										
CEL154.Y.....										
CEL155.										

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
cel10.	ACTTTCTATATTATTATAGTACATAGTACATGATGTTGTTTCATCGTACATAGCACATTAAGTCAAATCAATTC TTGTCAACATGCATATCCCGTCCCCTAG									
CEL156.									
CEL157.									
CEL159.TG.....G.C.....G									
CEL160.TG.....G.C.....G									
CEL161.									
CEL162.TG.....G.C.....G									
CEL163.									
CEL164.									
CEL167.									
CEL168.TG.....G.C.....G									
CEL169.TG.....G.C.....G									
CEL170.									
CEL171.									
CEL172.TG.....G.C.....G									
CEL173.									
CEL174.TG.....G.C.....G									
CEL175.									
CEL176.									
CEL177.									
CEL178.									
CEL179.									
cel18.									
CEL180.									
CEL181.									
CEL182.									
CEL183.									
CEL185.TG.....G.C.....G									
CEL186.									
CEL187.									
CEL188.									
cel19.TG.....G.C.....G									
CEL191.									
CEL192.									
CEL193.									
CEL194.TG.....G.C.....G									
cel199.TG.....G.C.....G									
cel20.TG.....G.C.....G									
cel200.									
cel201.									
cel202.									
cel203.									
cel204.TG.....G.C.....G									
cel206.									
cel207.TG.....G.C.....G									
cel208.									
cel209.									
cel210.									
cel211.									
cel212.									
cel213.									
cel214.									
cel215.									
cel216.									
cel217.									

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
cel10.	ACTTCTATTATTATAGTACATAGTACATGATGTTGTTTCATCGTACATAGCACATTAAGTCAAATCAATTCCTGTCAACATGCATATCCCGTCCCCTAG									
cel218.									
cel219.									
cel22.									
cel220.									
cel221.									
cel222.									
cel223.									
cel24.									
cel25.									
cel26.									
cel27.									
cel28.									
cel29.									
cel3.									
cel30.									
cel31.									
cel32.									
cel33.									
cel34.									
cel35.									
cel37.									
cel38.									
cel39.									
cel4.									
cel40.									
cel41.									
cel42.									
cel43.									
cel44.									
cel45.									
cel46.									
cel47.									
cel48.									
cel49.									
cel5.									
cel50.									
cel51.									
cel6.									
cel7.									
cel8.									
cel85.									
cel86.									
cel87.									
cel88.									
cel89.									
cel9.									
cel90.									
cel91.									
cel92.									
cel93.									
cel94.									
cel95.									
cel96.									
cel97.									

Allegato 2.

ID Cliente	ID NGB	BM6438		BM757		CELJP38		IDVGA37		INRA131		RM012		RM095		RT1		TGLA40	
744/07	107	252	260	188	204	215	217	212	212	100	106	120	134	113	123	265	265	91	97
769/07	108	248	252	164	182	217	217	208	208	100	102	120	134	117	127	263	265	91	99
743/07	118	248	256	164	172	217	217	212	218	100	100	120	124	113	113	263	265	99	105
738/07	120	248	248	164	164	217	239	208	212	100	102	116	134	127	127	263	283	97	97
799/07	121	252	260	186	186	217	217	214	218	100	102	120	120	113	129	261	267	91	97
737/07	122	242	260	164	186	217	217	208	218	100	100	136	148	129	131	261	271	97	97
786/07	123	248	252	182	204	215	215	212	212	100	100	122	134	113	129	265	283	91	105
755/07	126	260	260	164	186	217	217	212	212	100	102	116	124	123	131	263	283	91	97
719	149	248	252	180	208	217	217	208	214	104	106	120	124	113	129	261	271	97	105
78931	167	248	260	172	190	215	239	210	216	100	102	120	128	113	129	263	265	97	97
91019	168	248	248	164	186	219	225	208	212	100	100	120	124	113	131	265	265	91	97
91022	169	248	252	164	164	219	219	212	218	100	102	122	124	131	139	263	283	91	97
135275	170	248	254	164	164	217	219	208	212	102	104	120	128	127	127	267	267	97	97
65	202	248	248	164	182	221	229	212	212	106	106	120	134	137	139	263	271	97	97
149	203	250	256	186	204	221	229	212	212	100	102	122	126	123	127	261	263	97	105
AV2008	249	204	248	252	164	186	217	219	212	102	106	120	122	113	139	261	263	91	101
174	206	248	250	164	186	217	217	210	212	0	0	124	128	127	127	261	263	91	97
113	109	248	260	176	188	217	219	208	212	100	104	124	124	139	139	263	283	97	99
184	110	242	248	164	164	217	221	208	212	100	102	136	148	123	139	263	263	97	99
180	111	248	260	204	204	217	217	212	214	96	100	120	120	121	135	263	273	99	101
128	113	242	256	172	204	215	217	208	216	100	102	120	120	127	131	263	283	91	91
203	115	248	252	164	186	215	217	208	210	100	106	120	136	121	123	263	267	97	97
127	116	248	260	162	180	215	215	210	212	102	106	134	134	113	119	263	263	91	97
178	119	248	250	164	182	217	217	216	216	102	106	116	124	117	129	253	263	91	99
131	141	248	248	164	208	217	221	214	214	96	102	128	134	137	139	267	271	97	97
181	142	248	256	164	208	217	223	212	212	100	102	124	128	119	131	263	263	97	97
234	143	248	248	180	204	217	219	212	214	96	100	124	128	113	137	267	271	97	97
132	144	248	248	182	204	217	217	208	212	0	0	124	136	113	123	261	267	97	99
231	145	248	248	164	182	215	215	208	214	100	100	136	148	113	113	263	265	91	91
179	146	248	248	164	204	217	217	208	214	100	102	124	124	113	137	263	267	91	91
124	147	242	248	172	204	217	217	214	214	102	102	116	134	127	129	263	263	97	97
144	148	242	248	204	204	217	239	208	218	100	102	124	124	113	117	267	283	97	97
120	150	248	260	186	204	217	217	212	216	100	106	124	128	121	131	261	261	91	99
119	151	248	250	180	186	217	221	214	218	104	106	116	116	117	131	265	271	97	97
217	152	248	260	186	186	217	217	212	212	100	106	116	124	113	117	263	271	99	105
CHØ7	117	153	242	248	164	182	217	219	212	102	102	128	134	119	129	265	267	97	97
236	154	248	248	164	204	217	219	212	212	96	100	116	128	113	113	253	263	97	99
164	207	248	248	182	204	217	225	212	212	102	104	120	124	113	119	263	265	97	97
118	208	248	248	186	204	215	217	212	212	100	100	120	128	119	129	263	271	99	99
145	209	248	248	164	176	217	217	208	214	100	100	124	148	123	129	271	271	91	99
123	210	248	248	182	204	219	221	212	214	100	102	128	134	113	123	263	273	99	105
CHØ7	143	211	242	248	182	182	217	219	210	100	100	120	136	131	139	271	283	99	99
201	212	260	260	182	188	215	217	212	214	96	100	124	136	121	127	263	263	97	97

ID Cliente	ID NGB	BM6438		BM757		CELJP38		IDVGA37		INRA131		RM012		RM095		RT1		TGLA40	
218	213	242	248	182	186	217	217	208	212	100	102	134	136	129	129	263	263	97	97
154	214	248	248	208	208	217	217	212	214	100	100	120	134	123	139	263	271	99	99
125 CHØ7	215	242	248	164	188	217	219	208	212	100	106	124	136	113	137	263	263	97	99
202	216	248	260	182	186	217	217	212	214	96	100	124	136	121	123	263	263	97	99
238	217	242	248	186	204	217	221	208	210	100	102	124	136	121	129	263	267	91	97
237	218	248	248	164	186	217	219	212	214	102	106	120	120	113	139	263	283	97	99
220	219	248	250	180	186	219	221	214	218	100	102	120	136	123	139	263	267	97	105
200	43	250	260	186	208	217	219	212	218	0	0	128	134	0	0	271	271	97	97
136	44	248	248	204	208	217	217	208	214	0	0	134	148	0	0	265	267	97	97
147	45	242	242	186	186	217	219	214	218	0	0	0	0	0	0	0	0	97	97
185 CHØ7	46	248	252	164	204	217	217	208	212	104	106	124	136	113	131	263	265	97	97
192	47	248	248	164	188	217	217	210	214	96	100	136	136	119	129	263	265	91	97
286	5	248	248	204	204	217	217	212	216	100	100	124	148	113	129	263	265	91	97
29	6	248	248	164	186	215	219	212	212	100	102	120	124	129	131	263	263	91	105
141	10	248	248	164	164	217	217	212	218	100	100	120	124	121	123	263	265	97	105
7	11	248	250	176	204	215	219	212	218	100	102	120	120	113	127	261	263	97	97
175	12	256	260	182	186	217	217	212	214	100	102	120	120	113	127	261	263	97	97
097a	13	248	248	164	164	219	223	212	216	100	100	124	148	113	113	263	283	91	97
101	14	256	260	164	164	215	217	206	216	100	100	124	134	131	131	275	283	91	91
249 MOØ7	15	248	260	164	176	217	217	206	214	100	100	124	148	113	129	277	283	97	97
190	16	242	248	164	176	217	217	206	218	100	106	136	148	123	123	273	283	91	91
215	17	248	260	186	190	217	219	212	212	100	102	120	128	117	129	263	267	91	91
195	18	248	256	164	204	217	239	212	218	102	106	120	128	113	131	277	283	91	97
129b	19	242	250	164	186	217	217	212	212	102	106	120	124	113	125	263	265	97	97
167	20	242	248	172	204	203	217	212	212	100	106	120	136	113	131	261	265	91	97
217 MOØ7	21	250	250	186	186	217	219	212	214	102	106	120	148	123	129	261	261	99	105
213	22	242	256	164	204	203	215	212	214	100	102	148	148	129	137	267	267	91	91
97b	23	260	260	164	204	213	215	212	214	102	102	134	148	113	129	261	261	97	105
232	24	248	252	164	204	225	239	212	212	100	100	124	128	113	123	261	277	91	97
259	25	248	250	164	164	217	225	212	214	100	100	120	128	113	113	275	277	91	91
94	26	248	248	164	164	215	217	206	218	102	106	120	124	113	127	263	265	91	97
123 MOØ7	27	248	248	164	164	203	217	214	214	106	106	120	124	113	113	275	277	91	97
149 MOØ7	28	242	242	164	164	217	239	206	206	96	100	124	124	113	123	283	283	99	99
197	29	248	250	190	204	215	217	212	212	100	100	120	120	113	131	261	277	91	97
153 MOØ7	30	248	248	204	204	217	219	218	218	100	102	120	128	123	127	263	283	91	97
243	31	248	248	164	186	217	217	208	208	100	102	120	126	121	129	263	283	97	97
129	32	248	252	188	204	225	239	212	218	100	102	116	124	113	131	263	283	97	105
86	33	248	248	164	186	215	217	212	218	96	100	124	148	113	127	263	283	91	97
267	34	248	248	164	204	219	221	212	218	100	102	120	128	113	131	271	271	91	91
291	35	248	248	164	182	217	217	206	208	100	102	120	122	113	113	263	277	97	105
155	36	242	248	164	164	217	239	206	214	96	100	122	124	123	141	263	283	97	99
161	37	242	248	186	204	217	221	214	218	100	102	120	124	131	141	263	263	97	97

ID Cliente	ID NGB	BM6438		BM757		CELJP38		IDVGA37		INRA131		RM012		RM095		RT1		TGLA40	
95	38	248	250	176	186	217	219	212	218	0	0	124	148	0	0	261	277	91	97
3	39	248	248	164	172	217	217	212	214	0	0	128	134	0	0	261	265	91	97
89	40	242	248	164	186	219	225	212	212	0	0	116	124	113	113	261	263	97	105
185 MOØ7	41	248	248	164	204	217	225	212	214	0	0	0	0	0	0	263	263	0	0
207	42	248	248	164	186	217	219	212	218	100	102	124	124	113	131	263	271	105	105
17	48	242	248	188	188	225	239	212	218	102	102	128	134	113	113	261	263	91	97
125 MOØ7	49	248	248	164	176	215	217	206	212	96	100	124	124	123	127	261	263	97	97
210	50	250	260	186	204	217	221	212	212	0	0	128	128	117	137	263	283	91	97
103	51	248	252	164	204	217	217	212	214	100	102	120	148	131	137	271	283	97	97
SOØ07 2001	112	248	248	164	204	217	219	210	214	100	102	120	124	123	139	263	263	91	105
2165	114	248	250	164	204	217	219	214	214	100	100	134	134	113	121	263	273	97	97
SOØ07 1985	117	242	252	182	186	215	217	212	212	102	106	120	128	123	131	263	277	97	99
1537	124	248	248	176	186	219	219	208	212	102	102	136	148	113	129	263	283	97	97
SOØ07 2006	125	248	248	164	186	219	219	212	218	102	106	120	134	123	127	263	283	97	97
2011	127	242	248	186	204	217	219	208	212	100	100	120	148	129	131	263	277	97	97
2447	171	256	256	164	164	217	219	208	212	100	102	124	124	113	129	261	273	101	105
2336	172	248	252	164	208	217	221	208	218	100	102	120	124	113	127	263	263	99	105
2493	173	248	256	186	186	215	217	210	214	100	102	124	124	113	127	267	283	97	97
1932	174	242	248	186	204	219	221	208	212	100	100	120	120	121	125	261	271	91	97
2551	175	248	248	208	208	217	217	212	212	96	100	120	122	121	129	283	283	97	97
2426	176	242	248	164	204	217	225	212	216	96	106	120	120	123	129	263	283	97	101
2499	177	260	260	164	186	217	217	212	212	102	106	120	122	123	131	277	283	91	99
2443	178	248	248	164	172	217	219	212	214	100	104	116	122	119	123	261	263	105	105
2409	179	248	248	164	164	203	217	212	218	100	100	120	124	123	129	261	263	97	97
1975	180	242	248	164	204	225	225	212	218	100	106	120	124	123	131	277	283	91	105
2341	181	248	252	164	204	217	223	212	212	100	100	120	124	113	131	261	263	91	97
1184	182	248	250	190	204	217	225	212	216	102	106	124	148	123	135	271	283	97	101
1191	183	248	260	164	204	217	219	208	214	100	106	120	124	113	129	263	277	97	105
2402	184	248	248	164	204	217	237	212	218	104	106	120	124	121	121	263	265	97	97
2554	185	248	260	164	172	217	219	208	214	106	106	128	136	131	131	263	283	97	105
2528	186	248	248	204	204	217	217	206	212	100	102	120	122	113	131	283	283	97	97
2335	187	248	260	186	204	203	217	210	218	0	0	120	128	113	113	263	283	97	105
2353	188	248	252	164	204	217	219	212	214	100	102	122	148	113	131	263	283	97	97
2339	189	250	250	186	204	217	217	212	216	100	106	128	128	113	113	261	261	97	97
2290	190	242	248	164	190	215	219	214	214	0	0	122	134	113	135	263	277	97	97
2205	191	242	260	164	204	219	237	208	214	100	100	134	148	113	131	283	283	97	97
2291	192	248	248	164	172	217	239	208	218	100	106	134	134	119	121	275	283	97	97
2446	193	0	0	164	204	217	219	212	212	106	106	120	134	113	129	273	275	97	97
1157	194	252	256	164	186	213	217	208	214	102	106	120	134	113	123	261	283	97	97
1181	196	248	248	172	190	203	217	212	214	100	106	120	148	139	139	261	263	91	97
1131	197	252	252	164	176	217	237	212	218	100	100	120	120	121	123	263	283	97	105
2363	198	248	248	176	186	217	217	212	218	100	102	124	134	113	119	277	283	91	91
2481	199	248	248	190	190	217	219	212	216	100	102	122	134	113	129	263	275	97	97
2513	200	248	248	164	186	217	217	212	212	96	100	120	134	129	137	263	283	97	105

ID Cliente	ID NGB	BM6438		BM757		CELJP38		IDVGA37		INRA131		RM012		RM095		RT1		TGLA40	
2346	201	248	256	164	190	217	225	218	218	100	102	124	134	127	129	267	271	91	91
1973	3	242	250	164	204	225	225	214	214	102	104	120	134	113	131	267	271	91	91
2105	4	248	250	164	176	217	219	212	216	100	102	124	124	113	135	263	265	91	91
2048	7	248	260	164	186	217	219	212	216	102	102	116	124	113	113	265	267	99	99
2075	8	248	248	164	204	217	217	208	212	100	100	116	120	113	123	263	263	99	105
2162	66	242	248	186	186	217	219	212	212	102	102	124	136	127	131	261	265	97	97
2160	67	242	248	176	186	215	219	208	216	100	106	120	134	123	131	263	263	97	97
2101	106	248	248	186	204	217	217	206	212	96	100	122	124	113	131	263	283	97	97
33	100	248	248	164	186	217	217	212	212	102	102	120	124	123	129	263	263	91	97
288	101	248	250	180	186	217	223	208	212	100	100	120	124	125	127	273	283	91	97
153 TIØ7	102	242	260	164	176	217	219	212	214	0	0	120	124	121	123	263	263	91	99
171	104	242	248	164	204	217	219	206	212	102	106	122	134	113	131	277	283	91	97
35 (22)	155	248	252	164	204	217	219	212	212	96	102	120	120	123	127	263	271	91	91
169 (15)	156	248	248	164	164	217	217	208	214	100	102	122	124	113	127	263	283	91	97
40 (13)	157	248	256	162	204	217	219	212	216	100	100	124	124	113	121	263	283	97	99
161 (25)	159	242	250	164	186	217	217	212	214	100	106	120	122	127	127	263	283	97	97
327 (9)	160	248	248	164	204	219	221	208	212	96	100	120	124	129	137	261	267	91	91
175	161	248	260	164	182	219	219	208	212	100	102	120	124	123	123	263	277	99	105
229	162	248	248	186	186	217	217	212	214	96	100	124	134	113	127	271	283	91	105
41 (16)	163	250	254	176	186	217	217	206	206	102	106	124	124	113	119	263	263	97	97
277	164	248	248	180	186	215	219	212	214	100	100	122	136	113	127	263	265	97	97
162 (23)	220	248	250	176	180	219	221	216	218	0	0	120	136	113	131	263	265	97	99
166 (6)	221	248	250	186	186	217	229	212	218	0	0	120	124	121	127	265	271	105	105
358 (7)	222	248	252	182	186	217	217	208	218	0	0	124	124	113	129	265	283	97	99
149 TIØ7	2	242	250	164	172	217	219	208	212	102	106	120	120	131	137	265	271	97	99
270	9	248	248	164	190	217	219	212	218	100	100	134	134	129	135	261	261	91	97
312	63	248	260	164	186	217	219	218	218	0	0	122	134	0	0	265	283	97	97
038(2)	64	242	248	164	186	217	229	208	212	0	0	120	134	113	139	265	265	97	97
279(21)	65	248	248	176	180	217	221	208	212	100	100	122	124	127	131	265	265	91	91
188	68	248	248	186	204	217	217	212	212	100	100	124	136	113	129	283	283	99	99
317	69	248	248	164	186	219	219	212	218	100	104	124	134	0	0	261	277	97	97
271	71	248	250	186	204	217	219	210	216	100	106	120	126	113	129	271	275	97	99
354(10)	72	242	248	164	186	217	217	208	210	104	106	124	124	129	131	261	283	97	97
039(24)	73	242	260	182	204	217	217	214	218	96	100	122	134	113	113	263	267	91	105
264(3)	74	248	260	180	186	217	217	212	214	100	102	120	122	127	129	263	271	97	105
311	75	248	248	164	190	217	219	208	214	100	100	120	134	113	127	261	265	97	99
343(17)	76	250	252	164	186	217	219	212	212	96	102	120	122	123	131	263	283	97	99
251	77	242	248	164	186	217	217	212	214	102	102	134	136	119	131	263	263	91	97
308	79	248	250	186	186	217	217	212	212	100	100	120	120	113	129	261	277	97	99
172	80	248	250	164	186	217	219	208	208	100	100	122	124	121	129	261	277	105	105
359(1)	81	248	250	182	186	217	221	212	212	100	102	120	120	123	139	261	283	91	91
267(12)	82	242	256	164	164	215	221	212	212	100	100	120	136	113	123	263	265	99	105
323	85	248	248	186	204	215	219	218	218	0	0	124	134	121	135	265	265	105	105
326(14)	86	248	260	164	182	217	217	212	212	100	100	116	136	113	135	263	263	105	105
302	87	250	260	164	186	215	217	212	212	100	100	124	136	121	123	265	283	97	97
315	88	248	248	164	164	215	217	208	212	100	106	124	134	131	131	263	283	97	105

ID Cliente	ID NGB	BM6438		BM757		CELJP38		IDVGA37		INRA131		RM012		RM095		RT1		TGLA40	
148	89	248	250	164	188	217	219	212	214	100	102	134	134	131	135	283	283	91	97
338	90	248	250	204	204	217	217	208	212	100	102	124	136	127	127	261	273	97	97
314	91	250	250	162	204	217	219	212	212	0	0	120	134	0	0	261	271	97	97
32(11)	92	248	252	180	208	213	217	208	212	102	106	120	120	113	127	263	283	99	99
310	93	248	250	164	186	217	217	212	218	100	100	116	126	113	139	261	261	91	97
298	94	248	252	164	186	217	239	212	214	102	104	120	124	113	137	261	263	97	105
182	95	242	252	190	204	217	217	208	212	100	106	122	124	121	135	273	283	99	105
300(4)	96	248	248	186	186	217	229	208	212	100	106	120	120	113	117	263	265	97	105
287(19)	97	248	252	186	208	215	215	208	214	100	106	120	148	137	137	263	283	99	105
313	98	248	248	164	186	219	229	208	212	96	100	120	128	127	139	265	265	99	105
187	99	248	252	164	182	219	223	208	212	100	106	122	124	113	127	263	283	97	97
150	105	250	252	182	204	219	219	208	208	100	100	124	134	113	127	265	283	97	97