



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA

**GENETICA DI CONSERVAZIONE DI DUE SPECIE ALPINE IN
DECLINO: APPROCCIO NON INVASIVO APPLICATO ALLO STUDIO
DI LEPRE BIANCA (*Lepus timidus*) E PERNICE BIANCA (*Lagopus mutus*)**

Relatore: Prof. Lorenzo Zane
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott. Cristiano Vernesi
Centro Ricerca e Innovazione
Fondazione Edmund Mach

Laureanda: Elisa Gatto

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

INDICE

RIASSUNTO - ABSTRACT	p.1
1. INTRODUZIONE	
1.1 Premessa	p.5
1.2 Studio di genetica di conservazione	p.6
1.2.1 La genetica di conservazione: risorsa per le specie in pericolo	p.6
1.2.2 La variabilità genetica: strumenti della genetica molecolare	p.10
1.3 Campionamento non invasivo	p.12
1.4 Lepre bianca e pernice bianca: specie in pericolo sulle Alpi	p.15
1.5 Scopo della tesi	p.21
2. LE SPECIE	
2.1 La lepre bianca	p.22
2.1.1 L'ordine Lagomorpha	p.22
2.1.2 Distribuzione e declino	p.24
2.1.3 Biologia	p.26
2.1.4 Conservazione	p.30
2.2. Biologia della pernice bianca	p.33
2.2.1. L'Ordine Galliformes	p.33
2.2.2 Origine e distribuzione	p.34
2.2.3. Aspetto morfologico e adattamenti al freddo	p.36
2.2.4. Utilizzo del territorio e socialità	p.39
2.2.5. Conservazione	p.42
3. MATERIALI E METODI	
3.1 Campionamenti	p.43
3.1.1 Lepre bianca	p.43
3.1.2 Pernice bianca	p.52
3.2 Estrazione del DNA	p.60
3.2.1 Estrazione da feci	p.60
3.2.2 Estrazione da piume	p.62
3.3 Amplificazione del DNA	p.63
3.3.1 Microsatelliti	p.63
3.3.1.1 Lepre bianca	p.63
3.3.1.2 Pernice bianca	p.66
3.3.2 D-loop	p.74
3.3.2.1 Lepre bianca	p.74
3.3.2.2 Pernice bianca	p.76
3.3.3 Sessaggio pernice bianca	p.79

4. ANALISI STATISTICHE	
4.1 DNA mitocondriale	p.83
4.2 DNA nucleare	p.85
5. RISULTATI	
5.1 Campioni	p.89
5.2 Lepre bianca	p.93
5.2.1 Campionamento non invasivo	p.93
6.2.2 Polimorfismo	p.95
6.2.3 Filogeografia e struttura	p.95
5.3 Pernice bianca	p.102
5.3.1 Campionamento non invasivo	p.102
5.3.2 Polimorfismo	p.106
5.3.2.1 Dloop	p.106
5.3.2.2 Loci microsatellite	p.109
5.3.3 Filogeografia e struttura	p.111
5.3.3.1 mtDNA	p.112
5.3.3.2 nDNA	p.119
5.3.4 Variabilità genetica	p.121
5.3.4.1 mtDNA	p.121
5.3.4.2 nDNA	p.123
5.3.5 Risultati del sessaggio	p.124
6. DISCUSSIONE	
6.1 Campionamento non invasivo	p.125
6.2 Filogeografia e struttura	p.128
6.2.1 Lepre bianca	p.128
6.2.2 Pernice bianca	p.129
6.3 Variabilità	p.131
6.3.1 Lepre bianca	p.131
6.3.2 Pernice bianca	p.132
7. CONCLUSIONI	p.133
8. BIBLIOGRAFIA	p.137
9. SITOGRAFIA	p.147
10. RINGRAZIAMENTI	p.148

RIASSUNTO

La lepre bianca (*Lepus timidus varronis*) e la pernice bianca (*Lagopus mutus helveticus*) sono considerate sull'arco alpino delle specie relitte delle passate glaciazioni, che hanno trovato rifugio e si sono adattate agli ambienti di alta montagna a cui ora restano strettamente legate. I cambiamenti climatici e antropici stanno causando un'elevata frammentazione dei territori occupati da queste specie, con conseguenti rischi di isolamento, diminuzione del successo riproduttivo e perdita di variabilità genetica.

La riduzione della variabilità genetica per queste specie era già stata documentata in precedenti lavori.

Con questa tesi sono state ampliate le conoscenze attuali sulla lepre bianca e la pernice bianca a livello di arco alpino, aggiungendo i campioni raccolti nel settore orientale (provincia di Belluno). Sono state inoltre testate per entrambe le specie delle metodiche di campionamento non invasivo e di estrazione e amplificazione del DNA da questo tipo di campioni.

Per entrambe le specie è stata eseguita un'analisi del D-loop del DNA mitocondriale a livello di arco alpino, per indagare i livelli di variabilità e la presenza di struttura genetica. La stessa analisi per la pernice bianca è stata effettuata anche a livello di distribuzione globale della specie per confrontare la variabilità genetica e verificare quanto la sottospecie alpina si discosti geneticamente dalle altre popolazioni.

Da queste analisi è emersa una considerevole struttura genetica per la lepre bianca, la cui variabilità genetica si presenta comunque ancora molto elevata a livello di arco alpino, estremamente bassa invece per la provincia di Belluno. Per la pernice bianca, invece, è stata riscontrata una debole struttura e dei valori di variabilità genetica superiori rispetto alle popolazioni nordiche.

Per i campioni di pernice bianca raccolti nelle province di Belluno e Trento è stata, inoltre, eseguita un'analisi del DNA nucleare attraverso 10 loci microsatellite, dalla quale è emersa l'assenza di struttura a livello locale e un'elevata variabilità con valori di diversità genica paragonabili a quelli delle popolazioni nordiche.

Da questa tesi emerge dunque la differente situazione genetica delle due specie a

livello alpino: la pernice nonostante il calo demografico di cui ha risentito in varie località delle Alpi, presenta una buona salute genetica. Le analisi sulla lepre bianca, invece, evidenziano un quadro più critico, soprattutto in alcune aree.

Si ritiene dunque necessaria un'attenta gestione ambientale e venatoria nei confronti di queste specie, per preservarne la variabilità genetica (e in alcuni casi favorirne l'incremento) e limitare la presenza o quanto meno minimizzare l'effetto di barriere che impediscano un adeguato flusso genico tra sotto-popolazioni.

ABSTRACT

The mountain hare (*Lepus timidus varronis*) and the rock ptarmigan (*Lagopus mutus helveticus*) are considered in the Alps as relictual glacial species, that have found here a refugium area, being adapted to high altitude. The habitat of these species is now affected by climate change and human disturbance, determining high fragmentation, with consequent risks of isolation, decreased reproductive success and loss of genetic variability.

The reduction of genetic variability for these species had already been proven in previous works.

In this thesis the current knowledge about the mountain hare and the rock ptarmigan in the Alps has expanded adding samples collected in the eastern sector (province of Belluno).

Methods of non-invasive sampling and extraction and amplification of DNA from this type of samples have also been tested for both species.

The analyses of the mitochondrial D-loop, at Alpin level, has been performed to investigate the genetic variability and the presence of genetic structure. The same analysis, only for the rock ptarmigan, has been carried out at global distribution level to compare the genetic variability and verify how much the Alpine subspecies diverge genetically from other populations.

These analyses showed a significant genetic structure and high variability for the mountain hare (except in Belluno), while the analysis for the rock ptarmigan displayed a weak structure and higher values of genetic variability than those northern populations.

The analysis of the nuclear DNA with 10 microsatellite loci has been carried out on rock ptarmigan's samples collected in Belluno and Trento provinces. It showed the absence of structure at the local level and high gene diversity values comparable to those of Nordic populations.

These analysis clarified the different genetic situation of the two species in the Alps: the rock ptarmigan population has a good genetic health, while the mountain hare has a more critical situation, especially in some areas.

It seems advisable to implement a careful environmental and hunting management

to preserve the genetic variability and to limit the presence, or at least minimize the effects of barriers for an adequate gene flow among sub-populations.

1. INTRODUZIONE

1.1 Premessa

In Europa, le Alpi rappresentano una delle zone maggiormente vulnerabili essendo costituite da un insieme di ambienti naturali e semi-naturali interamente circondati da pianure coltivate in modo intensivo (Sergio & Pedrini, 2007). Proprio per la loro conformazione e posizione, le Alpi sono delle importanti sorgenti di biodiversità, habitat di molte specie adattate al clima montano e corridoio per specie migratrici.

La biodiversità è notevole soprattutto nelle zone alpine sotto il limite altitudinale del bosco entro il quale l'ambiente è meno ostile rispetto alle zone sommitali per minor copertura nevosa (intesa sia come spessore del manto nevoso, sia come durata di copertura con l'avanzare della stagione favorevole), maggiore eterogeneità di nicchie ecologiche disponibili, maggior numero di rifugi dai predatori, temperature più elevate, e maggiore disponibilità di cibo (Sergio F. & Pedrini P., 2007).

A quote più elevate, la tundra alpina è abitata da specie adattate attraverso modificazioni fisiche, metaboliche e comportamentali, a questi ambienti ostili. L'adattamento estremo all'ambiente alpino rende però queste specie altamente vulnerabili ai cambiamenti climatici. Infatti, con il ritiro dei ghiacciai e l'innalzamento del limite boschivo conseguenti al riscaldamento globale, le specie della tundra alpina entrano in competizione con le specie che abitano sotto il limite del bosco, le quali, con un territorio così modificato risultano competitivamente avvantaggiate, con il conseguente rischio di soppiantare le altre specie. Ciò, a livello generale, si traduce in una pericolosa perdita di biodiversità (McCarty, 2001; Clementi et al., 2009).

Studiare lo status di specie caratteristiche dell'ambiente alpino, permette da un lato di monitorare la qualità dell'ambiente in cui vivono (Segelbacher et al., 2003), dall'altro di approfondire le conoscenze su di esse per mettere in atto eventuali misure di tutela.

La lepre bianca (*Lepus timidus varronis*) e la pernice bianca (*Lagopus mutus*)

helveticus), oggetto di questo studio, sono delle componenti caratteristiche della fauna alpina, interessanti da un punto di vista scientifico e venatorio.

Si tratta di due specie distribuite nella tundra eurasiatica e nei rilievi alpini e pirenaici che rappresentano il limite meridionale del loro areale. Nelle regioni settentrionali la loro presenza è stabile e il loro areale continuo mentre nel loro areale meridionale il maggiore carico antropico restringe di molto gli ambienti naturali che risultano così fortemente frammentati (Thulin, 2003; Gamboni et al., 2008; Caizergues, et al. 2003).

In territorio italiano entrambe le specie sono considerate a rischio (Direttiva Uccelli, 1979; Trocchi & Riga, 2005; http://www.parcobarro.lombardia.it/_parco/areeprotette/specie/lepal/scheda.rtf).

Negli ultimi decenni, infatti, il numero di esemplari avvistati e censiti è notevolmente diminuito sulle Alpi.

Scopo di questa tesi è approfondire le conoscenze attuali sulla variabilità genetica di lepre bianca e pernice bianca sul territorio alpino italiano attraverso l'utilizzo di metodiche di campionamento non invasivo.

Studi sulle due specie erano già stati condotti, dal gruppo di Genetica della Conservazione della Fondazione Edmund Mach, in Valle d'Aosta, in Piemonte, Lombardia e Trentino Alto Adige. Il presente studio mira ad aumentare le informazioni acquisite in precedenza, ampliando il numero di campioni su areali già precedentemente studiati e analizzando nuove popolazioni delle Alpi orientali.

1.2 Studio di genetica di conservazione

1.2.1 La genetica di conservazione: risorsa per le specie in pericolo

“La genetica di conservazione utilizza gli strumenti della genetica per preservare la specie, quale entità dinamica che può evolvere per far fronte ai cambiamenti ambientali, minimizzandone il rischio di estinzione” (Frankham et al. 2002).



Fig.1.1. Schema riassuntivo dei principali fattori che operano favorendo il rischio d'estinzione della specie.

Molte specie animali presenti sul nostro Pianeta rientrano nella Red List della IUNC (International Union for Conservation of Nature) come specie minacciate, vulnerabili, a rischio di estinzione o a rischio critico di estinzione.

In un allarmante articolo pubblicato su Nature nel marzo 2011 si parla di un reale rischio per la biodiversità sul nostro Pianeta, al punto da indicare i prossimi secoli come sicuro periodo di una sesta estinzione di massa, a meno che l'uomo decida di provvedere concretamente per evitare tale disastro ecologico (Barnosky et al., 2011).

Per la prima volta nella storia del Pianeta Terra, la causa di un'estinzione di massa potrebbe essere l'uomo.

Ciò è dovuto all'impatto che le sue attività hanno sull'ambiente. L'inquinamento, il disboscamento, la caccia, la frammentazione del territorio sono alcune delle cause di disturbo alle specie animali che stanno rapidamente andando incontro ad una critica contrazione numerica.

La riduzione del territorio idoneo alle specie determina, in molti casi, un elevato grado di frammentazione delle popolazioni che, a causa di barriere solitamente di origine antropica (città, deviazioni di corsi d'acqua, impianti turistici,...) non possono più venire a contatto l'una con l'altra. L'isolamento delle popolazioni, e il numero ridotto degli individui che le compongono, causano il fenomeno

dell'inbreeding, che accentua inevitabilmente il meccanismo della deriva genetica, che a sua volta è responsabile della perdita di eterozigosità e quindi di variabilità genetica. La conseguenza è una pericolosa vulnerabilità delle specie a qualsiasi cambiamento ambientale, sia esso climatico o dovuto a malattie o parassiti. La “corsa alle armi” tra patogeni e ospiti, ad esempio, consiste proprio nel vantaggio della riproduzione sessuata di produrre attraverso la ricombinazione genica, individui con genotipi sempre diversi, alcuni dei quali permetteranno una risposta efficace all’attacco. Similmente contro le variazioni climatiche e ambientali, la produzione di genotipi differenti faciliterà la presenza di individui in grado di sopravvivere meglio nell'ambiente modificato.

La genetica di conservazione utilizza gli strumenti della genetica molecolare per valutare le popolazioni maggiormente a rischio a causa dei fenomeni di inbreeding e di perdita di diversità genetica, determinare la struttura delle popolazioni, risolvere le incertezze tassonomiche, identificare le popolazioni e i siti per delle possibili reintroduzioni e fornire gli strumenti per incrementare le conoscenze sulla biologia delle specie (Frankham et al., 2002).

La genetica di conservazione permette, inoltre, di analizzare le relazioni storiche e geografiche tra le popolazioni, e valutare l’eventuale mescolamento e/o inquinamento genetico. Può fornire anche informazioni di carattere demografico come la dimensione delle popolazioni, il verificarsi di recenti fenomeni di espansione o contrazione, isolamento e migrazione. Dà la possibilità di compiere studi a livello di individuo, identificandolo mediante analisi del genotipo grazie ai marcatori microsatellite. Permette infine di valutare il successo riproduttivo, le modalità di accoppiamento e dispersione dei sessi e i movimenti degli individui.

Un altro aspetto importante nello studio delle popolazioni minacciate è la loro storia evolutiva. Di questo si occupa la filogeografia (Avise et al., 1987), disciplina nata a metà degli anni Ottanta che, analizzando la distribuzione geografica delle linee genealogiche attraverso la ricostruzione di alberi filogenetici, permette di chiarire l'origine e la storia evolutiva di specie, sottospecie e popolazioni (Hewitt, 2004).

In questa tesi siamo andati ad indagare lo status delle popolazioni alpine di lepre

bianca e pernice bianca, specie oggetto di studio di alcuni importanti progetti italiani in ambito di genetica di conservazione.

Tra i progetti che si occupano di specie alpine tutelate, c'è ACESAP (Alpine ecosystem in a Changing Environment, Biodiversity Sensitivity and Adaptive Potential), che prevede lo studio della diversità biologica e genetica di alcune specie animali, vegetali e ambienti acquatici del Trentino. Esso è finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento nell'ambito del Bando dei Grandi Progetti 2006, ed è sviluppato dalla Fondazione Edmund Mach, Neale Lab, UC Davis, Museo Tridentino di Scienze Naturali e Museo Civico di Rovereto.

I quattro aspetti fondamentali della ricerca sulla biodiversità, obiettivo del progetto, sono:

- lo studio e la conservazione di taxa a rischio/endemici che costituiscono una componente unica e insostituibile della diversità biologica in Trentino;
- gli impatti diretti che cambiamenti o perdita della biodiversità possono determinare per la popolazione umana che vive su questo territorio;
- lo studio di particolari meccanismi ecologici e genetici attivati dagli organismi viventi per potersi adattare ai fattori ambientali di stress;
- la valutazione, con strumenti adeguati allo stato dell'arte, degli attuali livelli di biodiversità e l'identificazione di strumenti innovativi per monitorare, conservare, gestire e sfruttare la biodiversità stessa in modo sostenibile.

Tra le specie interessate dal progetto ACE-SAP c'è la pernice bianca, trattata in questo studio che allarga gli orizzonti territoriali del progetto verso l'adiacente Provincia di Belluno.

In ambito alpino è presente un altro progetto tra i cui obiettivi c'è la tutela del territorio e delle specie a rischio. ALCOTRA prevede la collaborazione tra Italia e Francia attraverso un ampio programma che persegue l'obiettivo generale di migliorare la qualità della vita delle popolazioni e lo sviluppo sostenibile dei sistemi economici e territoriali transfrontalieri attraverso la cooperazione in ambito sociale, economico, ambientale e culturale. Il Programma ALCOTRA è gestito da un partenariato allargato grazie a una serie di strutture che coinvolge l'insieme delle autorità italiane e francesi interessate dalla Cooperazione

transfrontaliera, oltre che l'Unione Europea. (www.interreg-alcotra.com). Questo progetto si occupa dei Galliformi alpini, dello status delle popolazioni e della loro conservazione. I campioni delle Alpi orientali utilizzati per questa tesi provengono da questo progetto.

FAUNAGEN era un altro importante progetto, ora concluso, che prevedeva l'utilizzo della genetica molecolare per indagini a scopo conservazionistico su specie alpine. Questo progetto prevedeva uno studio simultaneo di 4 specie di mammiferi: cervo, capriolo, camoscio, lepre europea e lepre bianca (Pecchioli et al. 2006). Gli obiettivi erano:

- quantificare la variabilità genetica di queste specie;
- identificare le principali dinamiche di popolazione (migrazione, variazioni di dimensione, fenomeni di mescolamento e isolamento genetico);
- testare le relazioni tra diversità genetica e misure morfologiche e parassitologiche per valutare la salute delle popolazioni;
- fornire indicazioni per la gestione e la tutela di queste specie.

I campioni alpini di *Lepus timidus varronis*, utilizzati per questa tesi, come confronto rispetto alle popolazioni bellunesi, derivano da prelievi effettuati nell'ambito di questo programma.

1.2.2 La variabilità genetica: strumenti della genetica molecolare

La variabilità genetica è determinata da variazioni tra individui nella sequenza nucleotidica del DNA mitocondriale o nucleare dovuta a mutazioni. Queste differenze vengono chiamate polimorfismi. Lo studio dei polimorfismi permette di effettuare analisi a livello individuale, ma anche di determinare quanta variabilità ci sia entro una popolazione ed entro la specie.

Per individuare i polimorfismi vengono utilizzati dei marcatori molecolari, ovvero dei frammenti di DNA associati ad una specifica posizione del genoma. I marcatori maggiormente utilizzati in progetti di conservazione sono quelli neutrali, ovvero porzioni di sequenze non codificanti e pertanto non sottoposte a selezione. In queste regioni si possono accumulare una gran quantità di mutazioni

che le rende utili anche per analisi intraspecifiche, popolazionistiche e/o individuali.

La reazione a catena della polimerasi (PCR) viene utilizzata per amplificare *in vitro* le regioni di interesse (marcatori). Essa viene eseguita impiegando due primer, un forward ed un reverse, costituiti da nucleotidi disposti secondo uno specifico ordine, tale da risultare complementare ad una precisa porzione della sequenza di DNA di cui si è interessati ad avere delle copie. Legandosi ad essa, i primer fungono da innesco per la Taq polimerasi, enzima responsabile della trascrizione del filamento stampo. Utilizzando due primer si delimita il frammento di sequenza da duplicare.

I microsatelliti sono marcatori nucleari costituiti da ripetizioni in tandem di corte sequenze di DNA (1-6 bp). Il polimorfismo rivelato è di tipo dimensionale, dovuto ad errori di slippage della polimerasi durante l'amplificazione, o ricombinazione che causa una variazione nel numero di ripetizioni (Hancock, 1999). Nell'amplificazione PCR di loci microsatellite uno dei due primer è marcato con un fluorocromo. Sono disponibili in tutto cinque fluorocromi che emettono luce a lunghezze d'onda diverse. Quando il DNA amplificato viene fatto correre in un sequenziatore automatico, un raggio laser colpisce la molecola di DNA che emette un lampo di luce ogni qual volta incontra un fluorocromo. Questo viene visualizzato su uno schermo come picco dello specifico colore.

Registando la posizione dei picchi (due in caso di eterozigosi, uno in caso di omozigosi) per ciascun campione per i vari marcatori, si ha un quadro del genotipo di quell'individuo per i loci analizzati. Questo tipo di analisi permette dunque una discriminazione a livello di individuo e lo studio della variabilità genetica a livello individuale e popolazionistico. Consente di studiare i fenomeni di ibridazione tra individui e verificare la salute di una popolazione identificandone la struttura genetica, ricavando informazioni sulla storia evolutiva e sugli eventi demografici come il verificarsi di colli di bottiglia.

Il termine “Displacement loop” (D-loop) indica una struttura del DNA mitocondriale da cui parte la replicazione del DNA. Nella regione del D-loop si forma una struttura nella quale i doppi filamenti sono tenuti separati per un tratto

da un terzo filamento di DNA che si appaia alla regione di sequenza di cui è complementare. Una struttura di questo tipo si riscontra in altre situazioni quali la riparazione del DNA e nei telomeri. Il D-loop è risultata essere, in molte specie, la regione più variabile del DNA mitocondriale, in termini di sostituzioni nucleotidiche e piccole inserzione/delezioni (indels). I siti variabili non sono distribuiti casualmente nella sequenza del D-loop, bensì sono concentrati in domini ipervariabili. Nei galliformi, ad esempio, il D-loop è diviso in tre domini, dei quali il primo e il terzo risultano maggiormente variabili (Randi & Lucchini, 1998).

L'alto tasso di mutazione di questa regione la rende idonea per studi filogenetici e filogeografici intraspecifici, e in particolare, nell'indagine popolazionistica, permette di identificare i rapporti tra le popolazioni e capire quanto queste si discostino geneticamente tra di loro.

1.3 Campionamento non invasivo

Le tecniche di campionamento normalmente utilizzate sono varie e con diverse conseguenze per l'animale. In certi casi è necessaria l'uccisione dell'animale, in altri la cattura con prelievo di porzioni di tessuto da parti del corpo che, seppur lese, non recano danno all'animale (punta della coda, dito, ecc...), in altri ancora l'animale non viene toccato ma viene privato di alcune uova.

Bisogna sottolineare però, che lo stress subito dall'animale, seppur non danneggiato gravemente, in seguito alla cattura, può causarne la morte.

In un programma volto alla tutela delle specie, evitare di recare danno all'animale è il primo passo verso la conservazione della specie.

Pertanto per questa tesi è stata scelta la tecnica del campionamento non invasivo che consiste nell'individuazione e prelievo nell'ambiente dei resti biologici lasciati dall'animale (penne, pelo, feci).

Questa metodica è tanto più utile considerando specie elusive, difficili da vedere e da avvicinare, come la lepre bianca e la pernice bianca.

Il prelievo su campo del materiale e la sua manipolazione risultano fasi estremamente delicate in quanto il materiale ottenuto mediante campionamento

non invasivo è più sensibile rispetto al campione da tessuto. Nonostante questo, diversi studi attestano il successo di questa tecnica di campionamento per analisi genetiche (Kovach et al., 2003; Hogan et al., 2007; Segelbacher, 2002; Regnaut et al., 2006).

Per quanto riguarda i galliformi, lo studio pilota di Regnaut et al. Del 2006, condotto sul gallo cedrone, evidenzia buoni risultati da campioni ottenuti mediante campionamento non invasivo. Gli autori hanno utilizzato materiale fecale che, sottoposto ad estrazione del DNA e analisi genetiche ha condotto alla genotipizzazione degli individui, con risultati che sono stati definiti altamente attendibili.

Ciononostante è da sottolineare che l'estrazione di materiale genetico da feci e piume non sempre ha risultati positivi. Le motivazioni sono molteplici: dalla modalità di campionamento, al protocollo di estrazione e amplificazione, tasso di errore nella genotipizzazione, dieta dell'animale nella specifica stagione e condizioni di conservazione del campione (Hogan et al., 2007; Segelbacher, 2002; Kovach et al., 2003).

Problematiche differenti si riscontrano in base al tipo di materiale biologico campionato.

Il DNA contenuto nelle feci è altamente soggetto a degradazione per una serie di motivi: nelle feci il DNA è presente ma non in elevata quantità e spesso il materiale fecale risulta inibire la reazione di amplificazione; l'esposizione delle feci agli agenti atmosferici riduce ulteriormente la resa dell'estrazione, così come la quantità di tempo trascorsa da quando la fatta è stata deposta a quando viene raccolta dallo sperimentatore, soprattutto se il substrato era troppo umido o troppo esposto al sole che ne ha causato rispettivamente un precoce dilavamento o essiccazione. Anche successivamente alla fase di raccolta delle feci, il DNA resta sottoposto a degradazione se non viene conservato in modo ottimale (Kovach et al., 2003).

Il DNA contenuto nelle piume si conserva per un periodo di tempo maggiore, ma la sua qualità dipende essenzialmente dalla conservazione del campione. E' necessario che la scelta del buon campione inizi già al momento del campionamento. In un articolo del 2007, Hogan et al. propongono un metodo di screening sulle condizioni delle piume al momento della raccolta al fine di

ottimizzare il campionamento. Da questo studio emerge che il numero di amplificazioni riuscite aumenta all'aumentare della qualità della piuma, e in base al tipo di piuma. Una piuma è definita in buone condizioni se non presenta segni di degradazione, se il calamo è trasparente e le barbe intatte. In condizioni discrete se presenta una degradazione visibile dovuta all'esposizione agli agenti atmosferici, un calamo giallino e le barbe separate. E' in cattive condizioni, e la piuma dev'essere pertanto esclusa dalla raccolta, se presenta segni di degradazione estrema, calamo scolorito e rovinato e barbe mancanti (Fig.1.2).



Fig.1.2. Da sinistra: piuma in buone condizioni, in condizioni discrete e in pessime condizioni.

Nell'articolo di Hogan et al. (2007), si sottolinea inoltre che la resa del campione dipende dall'elemento utilizzato (penna o piuma), ma soprattutto è possibile scegliere se utilizzare penne o piume a seconda del tipo di analisi che s'intende eseguire. Nello specifico gli autori riportano che per alcuni marcatori (es. microsatelliti) è preferibile utilizzare piume piccole, per altri (es. sesso), i risultati sarebbero più soddisfacenti impiegando le penne remiganti o le timoniere (Hogan et al., 2007).

1.4 Lepre bianca e pernice bianca: specie in pericolo sulle Alpi



Fig.1.3. Specie oggetto di studio: a sinistra pernice bianca, a destra lepre bianca

“Un tempo la lepre bianca attraversava le piste da sci e la si vedeva non di rado, ma negli ultimi anni...io non ne ho più vista una qui in Bondone” (insegnante di sci, monte Bondone TN, 28 marzo 2011).

“Le pite bianche te pol anca vèderle se te va nei momenti giusti co’le canta e le’è in amor, ma de lior bianchi mi non ne ho pì visti, anche se de impronte ghe ne” (bellunese, 24 aprile 2011).

“Non esagero dicendo che fino a vent’anni fa se al mattino presto guardavi qui dietro al rifugio ne vedevi una quarantina di pernici bianche, se ti avvicinavi di nascosto robe che le potevi anche prendere coi sacchi da quante erano! Ma non so quanto tempo è che non ne vedo più! Secondo me son morte tutte...” (gestore di un rifugio in Comelico).

“La caccia alla pernice ormai si sta perdendo. Qualcuna ce n’è ancora anche se meno di un tempo, ma per quelle poche che possiamo cacciare non son molti i cacciatori disposti a sacrificare le zampe dei cani su quelle pietraie!” (cacciatore del Cadore, agosto 2011).

“Di lepri bianche non ce ne dan più tante. E tra di noi ce n’è due che ancora le cacciano, ma giusto se se le trovan davanti mentre sono a caccia di camosci” (cacciatore dell’Agordino, ottobre 2011).

Questi sono alcuni commenti raccolti, durante i campionamenti, a proposito delle due specie alpine studiate in questo lavoro.

Dalle testimonianze raccolte e dalle evidenze numeriche riportate dai censimenti, è evidente come negli ultimi decenni le popolazioni di lepre bianca e pernice bianca abbiano subito realmente una contrazione numerica (Tab.1.1).

Tab.1.1. Risultati dei censimenti e dei prelievi venatori relativi alla provincia di Belluno dal 1991 al 2010. C =stime ottenute dai censimenti; P =animali nel piano di abbattimento; A =individui abbattuti (Ufficio faunistico - Provincia Belluno).

Anno	Lepre bianca			Pernice bianca		
	C	P	A	C	P	A
1991	2303	226	51	1559	121	36
1992	2301	228	63	1627	109	40
1993	2326	230	87	1499	105	52
1994	2194	217	90	1565	108	47
1995	2102	209	66	1607	113	46
1996	2128	216	18	1587	106	12
1997	1975	196	35	1555	106	11
1998	1955	197	88	1282	84	28
1999	1873	189	37	1264	83	27
2000	1843	185	43	1265	83	24
2001	1815	182	56	1232	80	27
2002	1815	182	62	1237	81	25
2003	1855	186	25	1277	84	12
2004	1745	176	33	1217	80	17
2005	1593	160	42	1164	79	24
2006	1558	157	45	1149	79	22
2007	1598	160	33	444	26	6
2008	1605	164	41	424	26	2
2009	1665	164	32	424	26	4
2010	1635	164	34	470	30	6

Sebbene il trend risulti in discesa per entrambe le specie, il forte decremento numerico del 2007 non è dovuto tanto al calo demografico nella specie, quanto piuttosto all'entrata in vigore in quell'anno delle misure di mitigazione previste dalla Valutazione di Incidenza del Piano Faunistico Venatorio Regionale 2007-2012 (allegato D, DGRV 2653 del 11/09/2007). In quell'anno, per far fronte alla nuova normativa, è stata rivista la modalità di censimento con la predisposizione di aree campione ben precise poste entro le ZPS. Pertanto nel grafico sottostante sono riportati i dati dei censimenti fino al 2006 (Fig.1.4).

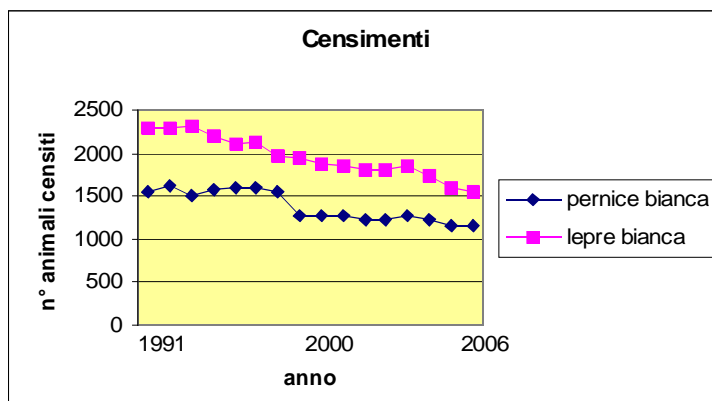


Fig.1.4. Stime del numero di animali in base ai censimenti effettuati in provincia di Belluno dal 1991 al 2006.

La pernice bianca e la lepre bianca non sono considerate specie in pericolo di estinzione a livello globale, in quanto la loro presenza risulta molto abbondante nelle regioni nordiche a nord del 65° parallelo N.

Nonostante ciò, la particolare condizione di isolamento che queste specie vivono nell'arco alpino, unita a diversi fattori ambientali ed antropici, stanno portando ad un preoccupante ed apparentemente irreversibile calo numerico delle due specie nel nostro territorio, al punto da essere considerate a rischio di estinzione nel territorio italiano, austriaco e svizzero (Spangesi & Serra, 2004; Trocchi & Riga, 2005; Zohmann & Woss, 2008).

I motivi sono molteplici. Innanzitutto i cambiamenti climatici giocano un ruolo estremamente importante in questo calo di numerosità: l'aumento delle temperature dovuto al riscaldamento globale è la prima causa dell'innalzamento delle fasce altitudinali delle specie montane. A questo si aggiunge la competizione tra le specie che si trovano ad occupare un ambiente conseguentemente meno vasto. Il riscaldamento globale causa inoltre una drastica riduzione dell'habitat dovuta al ritiro dei ghiacciai e alla riduzione dei nevai, ma ha portato anche ad un aumento delle precipitazioni tardo-invernali e primaverili dannose a livello di tasso riproduttivo di queste specie (Novoa et al., 2008).

Ad esempio, per la pernice bianca, un aumento delle precipitazioni nevose causa una prolungata copertura nevosa che ritarda le covate e impedisce la crescita di determinate piante necessarie alla chiocchia, con conseguente calo del tasso riproduttivo. L'aumento delle piogge in primavera inoltre, ha effetti negativi sulla covata, anche perché incide positivamente sulla predazione causando un'evidente aumento della mortalità dei piccoli (Novoa et al., 2008).

Queste specie risentono infatti particolarmente dell'aumento dei predatori registrato negli ultimi anni. Per entrambe le specie i principali predatori sono la volpe e l'aquila reale, non sono però rare le uccisioni causate da poiane, ermellini, martore, lince e lupo (ove presenti), gufo reale e corvidi soprattutto nei confronti dei piccoli (Trocchi & Riga, 2005).

Le altre cause sono per lo più di origine antropica.

Pressante è soprattutto l'impatto del turismo nell'ambiente d'alta quota, specialmente dovuto all'aumento della pratica degli sport invernali con conseguenti modificazioni dell'ambiente montano, ed ulteriore frammentazione di

un habitat già ridotto per queste specie.

L'abbandono progressivo dell'attività pastorale (non correttamente incentivata dai governi, e quindi sempre più abbandonata dai giovani scarsamente disposti ad uno stile di vita così impegnativo) ha causato, inoltre, un cambiamento nella composizione delle comunità erbacee delle praterie alpine, che vengono in questo modo rapidamente soppiantate da piccoli arbusti, e successivamente da un'espansione del limite boschivo verso le quote più elevate (Zohmann & Wöss, 2008, Sergio & Pedrini, 2007).

La pressione venatoria è stata, soprattutto in passato, un decisivo fattore di contrazione della numerosità di queste specie. A questo proposito sono stati emanati dei divieti di caccia o delle limitazioni numeriche nella quantità di animali che è possibile cacciare.

Nel 2009 anche il WWF e la Lipu (Lega Italiana Protezione Uccelli) promossero delle campagne e degli appelli in favore della tutela della pernice bianca e contro la caccia di questa specie (http://www.wwf.it/UserFiles/File/News%20Dossier%20Appti/DOSSIER/comunicati%20stampa/2009_6_17_pecnice.pdf, 2009; <http://lipu.it/news/no.asp?892>, 2009; <http://www.campagnalipu.it>, 2009).

E' scorretto additare i cacciatori per la contrazione numerica delle popolazioni al giorno d'oggi, ma resta ancora attuale il fenomeno del bracconaggio che rappresenta una forte minaccia per la conservazione di queste specie.

Una fonte di disturbo, specialmente per la pernice bianca, è rappresentata dalle greggi di ovini e caprini e i cani da pastore che li accompagnano perché possono travolgere o predare i nidi (Brichetti, 1982; Bocca, 1986; De Franceschi, 1988).

Durante i campionamenti effettuati per questo studio nell'estate 2011, è stata notata l'assenza di escrementi e campioni di pelo di lepre bianca in territori idonei alla specie ma occupati nei mesi estivi da mandrie al pascolo. Le stesse osservazioni erano state fatte da alcuni agenti della Polizia Provinciale e sono state confermate dalle uscite nei vari siti di campionamento. Sarebbe interessante verificare se il tipo di vegetazione che resiste alla brucatura bovina, o le specie vegetali che ricrescono a seguito del pascolo, rientrano o meno nella dieta della lepre. Se non vi rientrassero, si potrebbe valutare se, come ipotizzato, ciò potrebbe portare come conseguenza il fatto che le lepri bianche evitino le aree adibite al pascolo non solo nel periodo estivo, ma anche dopo la discesa a valle delle

mandrie. Se tale teoria fosse confermata sarebbe un'ulteriore causa di riduzione dell'habitat di questa specie alpina minacciata.

Un ulteriore danno causato dall'uomo è l'introduzione di specie, prevalentemente a scopi venatori, nel territorio di queste specie già minacciate. Questo problema riguarda principalmente la lepre variabile. La liberazione di individui di lepre bruna è una causa di rischio sanitario per la lepre bianca, in quanto *L. europaeus* è un vettore di parassiti che possono alterare il delicato equilibrio ospite-parassita in *L. timidus* (Trocchi & Riga, 2005). La sovrapposizione degli areali della specie alpina e della bruna è una delle principali cause del declino della lepre variabile, in quanto i Lagomorfi presentano un'esclusione competitiva tra specie diverse e, tra le due specie, la lepre bianca è quella che ne risente maggiormente.

In un progetto del CREAM (Center for Ecological Research and Forestry Application) Bernat Claramunt e il suo staff stanno studiando gli effetti delle reintroduzioni di *Marmota marmota* nei Pirenei, ipotizzando che questa specie possa rivelarsi un pericoloso competitore per la pernice bianca (http://www.cream.uab.es/eng/projects/27_432.htm). Uno studio del 2009 esclude questa problematica sostenendo che la dieta delle due specie è assolutamente differente, e che quindi esse possono convivere nel medesimo habitat (Figuerola et al., 2009). Nonostante ciò, è necessario approfondire gli studi circa la simpatria di queste due specie, visto l'aumento numerico della marmotta dovuto a progetti di reintroduzione anche sulle Alpi.

Infine un altro fattore deleterio è la presenza di malattie e parassiti che riducono le difese immunitarie e limitano le capacità riproduttive degli individui. Nella pernice bianca scozzese (*Lagopus lagopus scoticus*) la presenza di parassiti, oltre a ridurre direttamente la fitness delle popolazioni incidendo negativamente sul tasso riproduttivo, è anche responsabile di una variazione nelle emissioni odorose, che vengono in tal modo maggiormente percepite dai predatori (Dobson & Hudson, 1995).

Studiando la lepre bianca, Newey et al. in due articoli del 2004, concludono che è proprio la presenza di parassiti intestinali (*Trichostrongylus retortaeformis*, *Graphidium strigosum*) la causa della riduzione di fecondità nelle femmine di *Lepus timidus*, il che causa degli eventi di ciclicità nell'abbondanza numerica delle

popolazioni di questa specie.

In un articolo di Thulin (2003), vengono elencati una serie di parassiti e malattie, possibili cause di declino numerico delle popolazioni di lepre bianca. Il batterio *Francisella tularensis* e il calcivirus, responsabile dell'EBHS, sono tra le principali cause di malattie veicolate dalla lepre bruna ma che colpiscono mortalmente specialmente la lepre bianca.

1.5 Scopo della tesi

Con questo studio ci si propone di:

- mettere a punto le tecniche di campionamento, estrazione del DNA e amplificazione tramite PCR da materiale biologico (piume e feci) ottenuto mediante campionamento non invasivo;
- incrementare il database alpino di queste due specie con le informazioni di carattere genetico delle popolazioni della provincia di Belluno per la lepre; Trentino, Belluno e Piemonte per la pernice;

In particolare per *Lagopus mutus* si intende:

- genotipizzare gli individui campionati nelle aree selezionate delle provincie di Belluno e Trento e studiare la variabilità genetica della specie a livello locale. Ciò verrà effettuato attraverso lo studio della regione di controllo del DNA mitocondriale (D-loop) e di dieci loci microsatellite già utilizzati in studi precedenti. Si cercherà anche di ampliare le analisi a nuovi marcatori microsatellite;
- confrontare i nuovi dati ottenuti, con quelli precedentemente raccolti per osservare l'eventuale presenza di struttura genetica.

Per *Lepus timidus* si intende:

- analizzare a livello mitocondriale le popolazioni della provincia di Belluno, per indagarne i livelli di variabilità;
- condurre un'analisi di tipo filogeografico delle popolazioni bellunesi, confrontandole con le sequenze mitocondriali ottenute da precedenti studi sulla specie nell'arco alpino.

2. LE SPECIE

2.1 LEPRE BIANCA

La lepre bianca (nome scientifico: *Lepus timidus*, Linnaeus 1758) è una specie appartenente alla famiglia Leporidae, entro l'ordine Lagomorpha (Lagomorpha Brandt, 1855)

2.1.1 L'ordine Lagomorpha

Regno: Animalia

Phylum: Chordata

Classe: Mammalia

Superordine: Euarchontoglires

Ordine: Lagomorpha

Famiglia: Leporidae

Genere: Lepus

Specie: *Lepus timidus*

Sottospecie alpina: *L. timidus varronis*

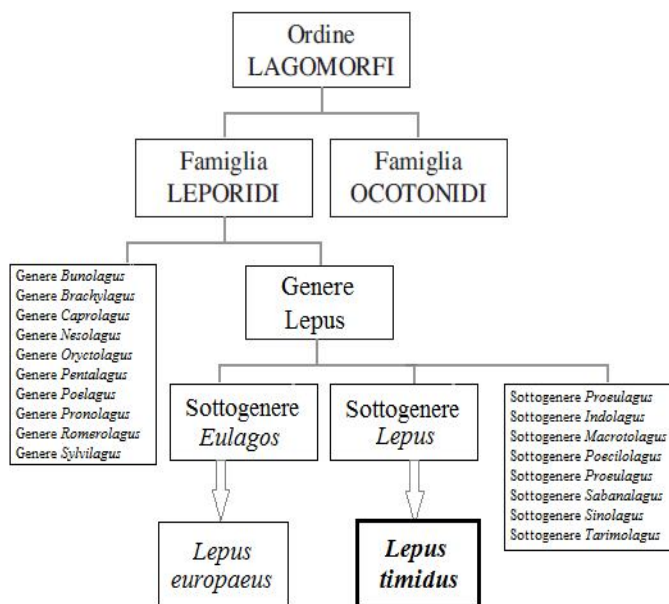


Fig.2.1.1 Sistematica dell'ordine Lagomorfi.

L'ordine Lagomorpha è stato riconosciuto come tale solo dal 1912. In precedenza le varie specie di lepre e coniglio erano incluse, entro l'ordine Rodentia come una Superfamiglia.

Effettivamente lagomorfi e roditori condividono molte caratteristiche, tra le quali la presenza di grandi incisivi ricurvi a crescita continua per ovviare alla continua usura, e uno sviluppo assai simile del cervello e del sistema riproduttore. Queste somiglianze sono però dovute a convergenza evolutiva (gli incisivi) o alla comune origine molto antica di questi due gruppi. Ad un esame più attento è possibile identificare alcune sostanziali differenze che hanno portato alla suddivisione nei due ordini distinti che consideriamo oggi, come ad esempio una differente formula dentaria che prevede nei lagomorfi un secondo paio di incisivi più piccoli e rettilinei assenti nei roditori. Ci sono poi molte altre caratteristiche anatomiche, fisiologiche, comportamentali ed ecologiche che hanno evidenziato come sia più corretto considerare questi due gruppi separatamente e dunque istituire l'ordine Lagomorpha (Gidely, 1912).

Seppur circondata da molte incertezze, l'origine evolutiva di questi due ordini di mammiferi sembra diramarsi da un'unica forma ancestrale estinta circa 30 milioni di anni fa: i Mixodonta. In realtà i Lagomorfi presentano strutture scheletriche che non testimonierebbero questa origine evolutiva in quanto risultano differenti dai resti fossili di mixodonti trovati. Nonostante ciò, altre evidenti similitudini sembrano per ora confermare l'ipotesi.

I primitivi Lagomorfi vissero in Nord America e Asia fra i 40 e i 20 milioni di anni fa. In seguito, nel corso del Pliocene e del Pleistocene, raggiunsero il massimo sviluppo diffondendosi verso l'Europa e l'Africa e differenziandosi in vari generi (Trocchi & Riga, 2005).

L'ordine dei Lagomorfi è suddiviso in due famiglie (Fig.2.1.1): Leporidae e Ochotonidae. In Italia attualmente è presente solo la prima famiglia con 3 Generi (Lepus, Oryctolagus e Sylvilagus) e 5 specie (lepre variabile *Lepus timidus*, lepre europea *Lepus europaeus*, lepre italiana *Lepus corsicanus*, lepre sarda *Lepus capensis*, coniglio selvatico *Oryctolagus cuniculus* e silvilago *Sylvilagus floridanus*), mentre la famiglia degli Octonidi si è estinta nel nostro Paese da almeno due secoli (Trocchi & Riga, 2005).

2.1.2 Distribuzione e declino

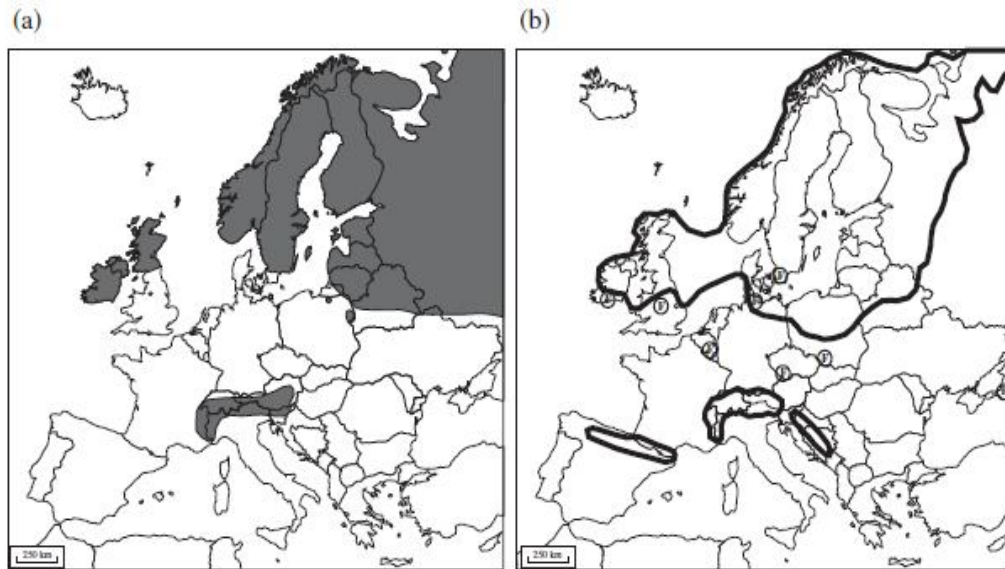


Fig.2.1.2. (a) Distribuzione attuale della lepre variabile in Europa. (b) Massima estensione dei ghiacci durante l'ultimo periodo glaciale. (Thulin, 2003).



Fig.2.1.3. Distribuzione di *Lepus timidus* a livello globale.

La lepre variabile è una specie artica-subartica che abita la fascia circumpolare e gli ambienti alpini. La sua distribuzione risulta altamente frammentata in Europa (Fig. 2.1.2a), mentre è piuttosto continua nell'Asia settentrionale (Fig. 2.1.3). In Nord America questa specie è assente ma sono presenti specie simili adattate agli ambienti d'alta quota: *L. arcticus* e *L. othus*.

In Europa è presente nell'arco alpino, in Irlanda, negli altopiani scozzesi, in Scandinavia, nella Polonia orientale e nei Paesi Baltici verso la Russia. Questa distribuzione discontinua è il risultato del ritiro della calotta glaciale che aveva coperto l'Europa durante l'ultima glaciazione 18000 anni fa. In quel periodo la

lepre bianca abitava le zone a margine dei ghiacciai che si estendevano per tutta l'Europa settentrionale, coprendo anche parte della Germania e le Alpi (Fig. 2.1.3b). Resti fossili di *L. timidus* sono stati infatti ritrovati in Germania, Belgio e Spagna (Thulin, 2003).

Nell'Olocene la contrazione nella distribuzione di questa specie, che ha seguito i ghiacciai in ritiro, fu molto accentuata fino a lasciare degli esemplari unicamente sulle Alpi, in Irlanda e in Polonia.

Ci sono segni storici e recenti di una contrazione dell'areale di questa specie, e della densità delle sue popolazioni anche nella regione meridionale e centrale della penisola scandinava (Thulin, 2003).

Il declino nella consistenza numerica delle popolazioni di lepre variabile è stato constatato anche nel nord dell'Irlanda attraverso le relazioni sulla caccia fornite dai cacciatori. Controlli hanno confermato queste segnalazioni e hanno proposto come probabile causa il mutamento dell'habitat dovuto all'avanzare delle coltivazioni intensive. Queste causano la distruzione dell'habitat, estirpando gli arbusti che la lepre utilizza come riparo dai predatori e dal caldo, e favorendo specie di piante che competono con le erbe di cui si cibano le lepri bianche (Dingerkus & Montgomery, 2002).

Thulin (2003) evidenzia cinque possibili cause per l'attuale graduale e continuo declino di questa specie in Europa: l'interazione con la lepre europea, le malattie, la predazione specialmente da parte della volpe, la deforestazione, l'incremento delle aree occupate dalle coltivazioni e l'interazione con altri erbivori quali ad esempio molti ungulati e i conigli.

Il primo di questi problemi è stato un argomento di dibattito negli ultimi tempi. In alcune aree si assiste ad una potenziale sovrapposizione dell'areale delle due specie, in parte per cause naturali (innalzamento del limite dei boschi), in parte a causa del rilascio di individui di bruna ad opera dell'uomo a scopi venatori. Il rilascio di individui di lepre bruna è una causa di rischio sanitario per la lepre bianca, in quanto *L. europaeus* è un vettore di parassiti che possono alterare il delicato equilibrio ospite-parassita in *L. timidus* (Trocchi & Riga, 2005). La sovrapposizione degli areali della specie alpina e della bruna è una delle principali cause del declino della lepre variabile, in quanto i Lagomorfi presentano un'esclusione competitiva tra specie diverse. Esiste, inoltre, il problema

dell'ibridazione tra le due specie. La prole presenta caratteristiche morfologiche intermedie ed è fertile, ma in natura in caso di incrocio avviene il fenomeno “extinction by hybridisation”, per cui la specie alpina tende ad essere soppiantata dalla bruna a causa dell'accoppiamento preferenziale con quest'ultima specie. La scelta del partner è condizionata dal diverso comportamento del maschio nelle due specie: il maschio di bianca si accoppia quando incontra una femmina, il maschio di bruna invece ricerca la femmina e la forza all'accoppiamento, sia che essa sia della sua specie sia che appartenga alla specie alpina. In questo modo i territori delle bianche vengono occupati dai figli ibridi, e dunque, in prospettiva futura, dalle lepri brune (Thulin, 2003).

2.1.3 Biologia



Fig.2.1.4. Lepre bianca in muta invernale.

La lepre bianca è un silenzioso abitante delle nostre montagne, difficile da incontrare per le sue abitudini schive, per il suo mimetismo e, negli ultimi tempi, per la diminuzione della densità delle popolazioni sull'arco alpino, dovute a fattori climatici e antropici.

In Europa si riconoscono sedici sottospecie di lepre bianca, tra le quali *Lepus timidus varronis* è quella che popola le Alpi.

È un leporide di dimensioni medio-piccole (43-64 cm), coda corta (3-8 cm), zampe posteriori lunghe (12,7-18 cm), potenti e con cuscinetti coperti da un fitto strato di pelo come protezione dal freddo, e orecchie lunghe e strette (6,3-10,6 cm) (Barbieri et al., 1998). Confrontandola con le altre specie di lepre, la bianca è quella che presenta dimensioni minori, e ciò è giustificabile come adattamento al

freddo. Secondo la regola dello zoologo J.A. Allen (1838-1921) gli animali omeotermi che vivono in ambienti a clima freddo, generalmente possiedono estremità più corte dei loro corrispettivi provenienti da climi più caldi. Ciò è confermato nell'esempio della lepre bianca che presenta orecchie, zampe e coda di dimensioni inferiori rispetto alle altre specie, e corpo più compatto.

Questa specie va incontro a tre principali mute nel corso dell'anno (Fig.2.1.5). In primavera il manto è marron-grigio, ad eccezione della coda bianca. La prima muta avviene a giugno, ma la colorazione resta la medesima. Da metà ottobre, attivata dall'accorciarsi del fotoperiodo e dal freddo, inizia la muta verso la colorazione invernale, con mantello totalmente bianco, ad eccezione della punta delle orecchie che resta nera. Questa colorazione persiste fino circa a metà febbraio, ma il periodo della muta primaverile può variare in base alla presenza di copertura nevosa che influisce nell'evoluzione della colorazione (Trocchi & Riga, 2005).

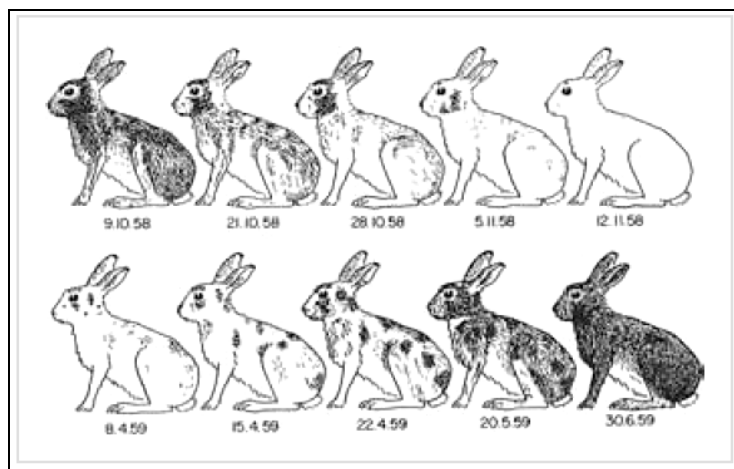


Fig.2.1.5. Fasi della muta (Flux, 1970).

Le lepri bianche conducono una vita prevalentemente notturna, con la fase attiva che va dal tramonto fino all'alba, mentre durante il giorno dormono in qualche rifugio tra le rocce, i massi o nascoste tra i cespugli di rododendro, mirtillo e pino mugo.

Vivono ad un'altitudine compresa tra i 1000 e i 3000 metri, anche se la quota può variare in base alla stagione e anche da sito a sito in base all'altitudine delle

praterie alpine (luoghi preferiti da questa specie), al limite della copertura nevosa, alla presenza di specie competitori.

Questa specie è piuttosto selettiva sulla tipologia di habitat. In uno studio condotto nel Parco Adamello Brenta (Barbieri et al., 1998), le caratteristiche risultate discriminanti nella scelta del territorio sono il tipo di vegetazione, l'altitudine e l'esposizione al sole. Contrariamente a quanto gli autori avevano inizialmente supposto, il disturbo antropico non è risultato influente nella scelta dell'habitat, probabilmente perché ad alta quota è pressoché nullo durante le ore notturne.

Per quanto riguarda l'aspetto vegetazionale, lo studio conclude che la lepre bianca predilige ambienti aperti d'alta quota, gli ambienti ecotonali, e le zone con disponibilità di rododendri e pini mughi. La maggior parte dei segni di presenza è stata infatti trovata nella zona sommitale, sopra i 1800 metri, anche durante l'inverno, indice di una preferenza generale per le quote più elevate.

Per l'esposizione al sole, lo studio riscontra una significativa preferenza per i versanti esposti a sud rispetto a quelli esposti ad est e ovest, ed una marcata tendenza ad evitare quelli a nord.

La lepre bianca è un animale normalmente solitario, ma possono formarsi gruppi fino a una decina di individui specialmente durante il periodo invernale, quando le risorse sono spazialmente concentrate.

Il suo home range è piuttosto vasto. Studi condotti sulle popolazioni nordiche indicano una dimensione compresa tra i 91 e i 445 ettari, con una media di 206 ettari. Nella catena alpina, l'home range risulta notevolmente ridotto mantenendosi tra 11,9 e 77,2 ettari, con una media di 38 ettari. Questa differenza potrebbe essere motivata dalla maggior scarsità di cibo nelle regioni nordiche dovuta ad una stagione favorevole nettamente più breve, e dunque ad una primavera ritardata rispetto al contesto alpino ed una minor stagione di crescita delle piante. Un altro fattore potrebbe essere identificato nelle dimensioni corporee maggiori delle sottospecie nordiche, che richiederebbero una maggiore quantità di cibo, ed il conseguente ampliamento del territorio per reperirlo. Questi studi mostrano inoltre che la dimensione dell'home range non differisce tra i sessi, ad eccezione in qualche caso isolato nella stagione primaverile, durante la quale i maschi ingrandiscono il loro territorio per la ricerca della femmina. Inoltre la

dimensione dell'home range è di poco maggiore negli adulti rispetto ai giovani, e minore in inverno rispetto alle altre stagioni. Quest'ultimo dato è da considerarsi come una strategia di adattamento al freddo, perché diminuendo il proprio territorio la lepre riduce il dispendio energetico. Una particolare caratteristica di questi leporidi, è la frequente ampia sovrapposizione degli home range tra individui di una stessa popolazione, segno che *L. timidus* non presenta un comportamento territoriale, leggermente accennato solo in alcuni casi durante il periodo degli amori (Dahl & Willebrand, 2004; Kauhala et al., 2005; Gamboni et al., 2008).

L'accoppiamento avviene tra aprile ed agosto, e all'interno di una stessa popolazione è piuttosto sincrono in modo tale che i piccoli nascano insieme. Nel mondo animale questa strategia viene spesso utilizzata con funzione anti-predatoria. La femmina appare dominante sul maschio, non solo per le dimensioni corporee leggermente superiori, ma anche perché sceglie il maschio con cui accoppiarsi, respingendo gli altri attraverso dei colpi di zampe. Per farsi avvicinare, essa lascia delle tracce odorose che verranno captate e seguite dal maschio. I maschi diventano sessualmente maturi prima delle femmine. Le femmine più grosse riescono a figliare prima, sebbene partorendo nel loro primo anno di età, siano soggette ad un'elevata mortalità prenatale della prima nidiata. La gestazione avviene di norma due volte all'anno, dura circa 50 giorni, e termina con la nascita di 2-5 piccoli già coperti di pelo, con gli occhi aperti, dal peso di 70-130 g ciascuno, e in grado di compiere brevi spostamenti. Le cure parentali si limitano all'allattamento (Barbieri et al., 1998).

La stagione delle nascite termina di solito in agosto. Ci sono però casi di figliate tardive che possono avvenire fino a inizio ottobre. I piccoli nati tardivamente mostrano dimensioni corporee leggermente inferiori, ma hanno un tasso di crescita leggermente superiore (Iason, 1989).

La sex ratio alla nascita è paritaria, sebbene possa essere sbilanciata in favore del sesso maschile in caso di non buone condizioni fisiche della madre al momento del parto. Ciò è dovuto al fatto che i maschi alla nascita sono più pesanti ed hanno perciò più probabilità di sopravvivere nel caso in cui la madre non riesca a produrre latte a sufficienza. (Barbieri et al., 1998; Trocchi & Riga, 2005; Barbieri et al., 2004).

Dopo una decina di giorni dalla nascita inizia lo svezzamento, al trentesimo giorno sono indipendenti ed iniziano ad esplorare il territorio. Dal 71° giorno al 90° si parla di home range giovanile, che viene ampliato nei mesi seguenti (Dahl & Willebrand, 2004).

In natura la durata della vita è di circa 8 anni, con un massimo di 12 anni.

Le principali cause di morte sono: la difficoltà di superare inverni particolarmente avversi durante i quali il fattore maggiormente critico è la disponibilità di cibo; la predazione, ad opera di aquile, volpi, gufo reale, corvo imperiale, lince, lupo, ermellino e faina, e le dinamiche ospite-parassita dannose soprattutto in aree con una densità di popolazione elevata.

I parassiti sono i maggiori responsabili degli eventi di ciclicità che colpiscono questa specie, in quanto riducono la fecondità delle femmine di lepre (Newey & Thirgood, 2004). Nelle Alpi questo fattore ha un'incidenza di mortalità inferiore sulla specie rispetto ad altri territori, perché la densità di lepri bianche è piuttosto bassa, con massimi di 4-6 individui per kmq.

La lepre bianca segue una dieta strettamente erbivora, nutrendosi di erbe, foglie, semi, bacche, funghi, e durante l'inverno anche di cortecce, radici, muschi e licheni.

E' stato osservato il fenomeno della coprofagia (ingestione delle proprie feci), interpretato come duplice adattamento. Da una parte esso permette di massimizzare l'efficienza di assorbimento delle sostanze utili, contenute nel cibo difficilmente digeribile, dall'altra riduce il tempo necessario alla ricerca di cibo, minimizzando il rischio predatorio (Barbieri et al., 1998).

2.1.4 Conservazione

Le popolazioni di *L. timidus* appaiono sostanzialmente stabili su gran parte dell'areale, ci sono però zone, tra cui le Alpi e la Svezia meridionale, in cui si assiste ad una certa flessione numerica più o meno importante (Thulin, 2003).

Sulle Alpi *L. timidus varronis* risente del declino demografico probabilmente più marcato, e le cause sono essenzialmente antropiche.

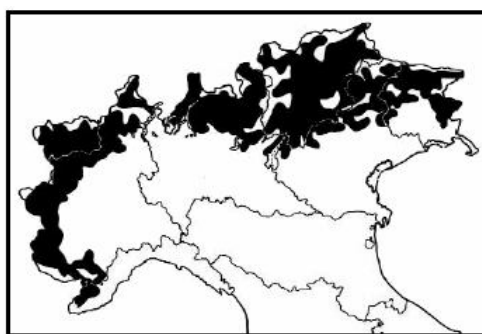


Fig2.1.6. Distribuzione di *Lepus timidus varronis* in Italia (Barbieri et al. 1998).

Non bisogna trascurare il fatto che le popolazioni di lepre variabile sono normalmente soggette a fasi cicliche approssimativamente di dieci anni, di abbondanza e declino numerico dovute per lo più alla predazione, alla carenza di cibo, e all'insorgere di malattie parassitarie. Fonti riguardanti uno studio sul Parco Adamello-Brenta indicavano la presenza di ciclicità anche in ambito italiano (Barbieri et al., 1998). Anche tenendo conto di questo fatto, in Italia il trend è tendenzialmente in discesa, non critica ma più accentuata in alcune aree. Uno studio più recente di Newey (2007) evidenzia, in Europa, delle differenze regionali nella periodicità, ampiezza e densità delle fasi cicliche, mentre sottolinea come in Italia il conteggio negli anni di lepri bianche non mostri ciclicità. Se davvero in Italia la numerosità di lepri bianche non fosse soggetta ad andamento ciclico, il calo numerico di questa specie risulterebbe ancor più preoccupante perché risulterebbe meno probabile una naturale ripresa della normale consistenza delle popolazioni.

Nel contesto italiano, la gestione territoriale regionale risulta piuttosto importante per la specie (Barbieri et al., 1998). Sebbene la pianificazione degli abbattimenti preveda già una riduzione del numero di lepri bianche cacciabili, è necessario limitare e controllare ulteriormente il prelievo venatorio soprattutto in alcune aree dove le popolazioni sono maggiormente sotto pressione.

Il piano di prelievo deve inoltre tener conto dei fattori climatici. Se, ad esempio, le nevicati sono state abbondanti o si sono protratte molto nella stagione, la quantità di cibo disponibile è inferiore e di conseguenza il tasso riproduttivo della lepre bianca risulta ridotto (www.parcobarro.lombardia.it/_parco/areeprotette/specie/

lepal/scheda.rtf). Tenendo conto di queste accortezze, il prelievo risulterà meno dannoso per la specie.

Questi animali risentono inoltre particolarmente della frammentazione del territorio in cui vivono, per questo anche nella costruzione di strade, impianti sciistici, ecc...è necessario considerare l'impatto che queste strutture hanno sul territorio e conseguentemente sui suoi abitanti.

2.2. PERNICE BIANCA



Fig.2.2.1. *Pernice bianca*

Pernice bianca. *Lagopus muta*. “Pita bianca” per i cacciatori e la gente di montagna del bellunese. Questo uccello, appartenente all'ordine dei Galliformi, è un abitante delle distese erbose e cime rocciose delle nostre montagne.

Non è facilmente visibile dai turisti delle alte quote per il suo mimetismo e l'areale difficile da raggiungere.

2.2.1. L'Ordine Galliformes

Regno: Animalia

Phylum: Chordata

Classe: Aves

Ordine: Galliformes

Famiglia: Phasianidae

Sottofamiglia: Tetraoninae

Genere: *Lagopus*

Specie: *Lagopus mutus*

Sottospecie alpina: *Lagopus mutus helveticus*

I Galliformi sono un ordine di uccelli caratterizzati da un corpo piuttosto robusto e pesante. Le ali sono corte e rotonde. Alcuni uccelli appartenenti a questo gruppo non sono in grado di volare, altri volano ma solitamente per brevi distanze, in quanto la loro stessa struttura corporea e alare non facilita voli di lunghezza maggiore. Le loro abitudini sono terrestri o arboricole, normalmente stanziali anche se vi sono popolazioni nordiche di pernice che compiono migrazioni

(Kuz'mina, 1992; Parisini et al., 2008).

Sono diffusi in tutto il pianeta ad eccezione dei deserti più interni, delle isole oceaniche (a meno che non siano stati introdotti dall'uomo) e delle terre ai poli dove il ghiaccio ricopre la crosta terrestre per tutto il corso dell'anno.

Questi uccelli rivestono una notevole importanza ecologica. Essi sono tra le principali prede di molti carnivori, molti vengono cacciati dall'uomo, e alcuni sono stati addomesticati e vengono allevati per le uova e la carne (galline, tacchini, faraone, ecc...).

I Tetraonidi sono una delle cinque famiglie che compongono l'ordine dei galliformi. Tra questi troviamo alcuni tra gli uccelli che hanno mostrato maggiori adattamenti al clima rigido delle terre sub-artiche (grossa taglia, folto piumaggio, ridotti livelli di attività, etc.) (Menoni & Novoa, 2007; Lucchini et al., 2001).

Sono diffusi nelle aree temperate e sub-artiche dell'emisfero settentrionale del Pianeta, e abitano ambienti di prateria o di foresta a seconda delle specie (Kuz'mina, 1992).

Questa famiglia comprende 18 specie e 120 sottospecie (Storch, 2007). Nell'arco alpino sono presenti cinque specie : il gallo forcello, il gallo cedrone, la coturnice, il francolino di monte e la pernice bianca.

Queste specie sono considerate a rischio nel territorio alpino, in particolare in alcune aree dove sono tutelate mediante verifica della numerosità e del successo riproduttivo tramite censimenti annuali e limitazioni o abolizione nel piano venatorio (Menoni & Novoa, 2007).

2.2.2 Origine e distribuzione

Drovetski (2003), studiando alcune specie di tetraonidi fossili, indica che la famiglia dei tetraonidi si è originata nel Pliocene, approssimativamente 6,3 milioni di anni fa, nella parte orientale della zona Neartica. La regione Palearctica sarebbe stata colonizzata indipendentemente in tre eventi, inizialmente dai progenitori di tutti i galliformi nella metà del Pliocene, secondariamente dagli antenati dei galliformi di bosco (*Falci pennis*, *Tetrao* e *Lyrus*) e di prateria (*Cetrocercus*, *Dendragapus* e *Tympanuchus*) nel tardo Pliocene, e infine dai

progenitori di *Lagopus* all'inizio del Pleistocene.

La glacial refugium hypothesis (GHR) propone, per la pernice bianca, una speciazione per isolamento a seguito del ritiro dei ghiacci. Quando il clima cominciò a cambiare, e i ghiacci a sciogliersi, molte specie adattate alle proibitive condizioni delle aree al limite dei ghiacciai, seguirono il loro ritiro. Alcune zone ad elevata altitudine si mantennero nelle condizioni del periodo glaciale, o comunque variarono poco. In queste aree alcuni gruppi di individui si stanziarono. Queste zone corrispondevano ai gruppi montuosi delle Alpi, dei Pirenei e dei Carpazi. L'isolamento di questi gruppi di individui, causò adattamenti specifici al clima che anche in quelle aree, sebbene più lentamente, stava cambiando. Ciò causò un marcato differenziamento genetico dalle popolazioni ancestrali, al punto da creare diverse sottospecie per ogni area separata da barriere geografiche (Holder et al.1999).

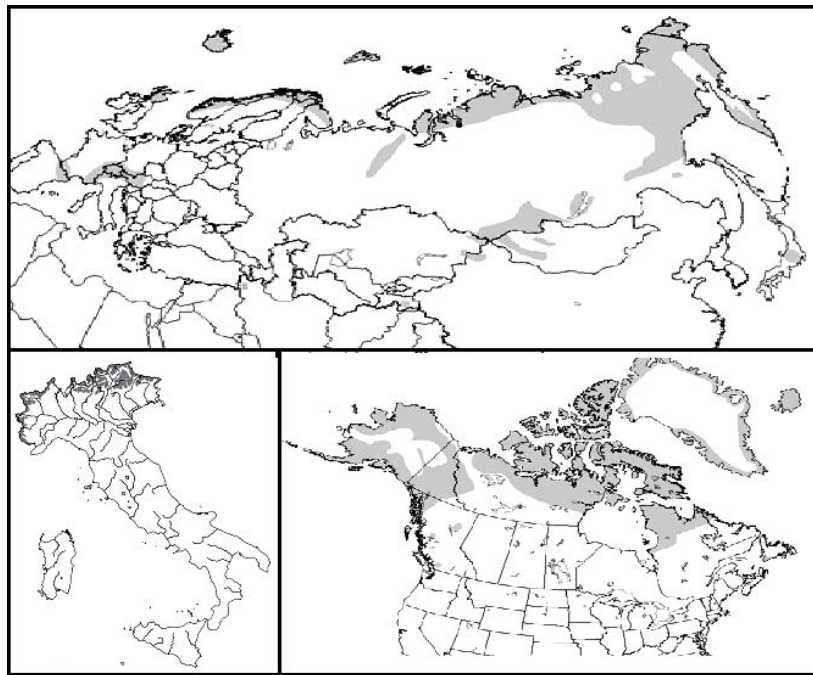


Fig.2.2.2. Distribuzione globale e italiana di *Lagopus mutus helveticus* (Storch, 2007; Spagnesi & Serra, 2004).

Attualmente, a seguito di eventi post-glaciali e dei cambiamenti climatici tuttora in atto, *Lagopus mutus* mantiene una corologia circumartica boreoalpina, con presenza stabile nelle zone a nord del Pianeta, in calo nelle regioni più isolate, come le Alpi e i Pirenei (Fig.2.2.2). E' distribuita nella tundra artica ed alpina del

Nord America, Groenlandia, Asia, penisola Scandinava, penisola di Cola, Scozia, Pamir, Altai, Giappone, Urali, Pirenei, Bulgaria e Alpi (Spangesi & Serra, 2004). Nel mondo sono state identificate circa trenta sottospecie che differiscono tra loro per caratteristiche di piumaggio e di massa corporea.

La sottospecie che abita la tundra alpina è *Lagopus mutus helveticus* (Thienemann, 1829). Essa vive nelle cime montuose della Svizzera meridionale, dell'Austria centrale e, nel territorio italiano, dalle Alpi Marittime a sud-ovest, alle Alpi Giulie ad est, con eccezione della provincia di Varese. E' diffusa nei piani subalpino, alpino e nivale.

La sua distribuzione è discontinua, in quanto si basa sulla presenza di territori idonei. Negli ultimi decenni è stata registrata una scomparsa della specie in molti settori prealpini veneti e friulani (Favaron et al., 2006, Spangesi & Serra, 2004).

In Italia è stata stimata la presenza di 7000-10000 coppie. Questa cifra risulta notevolmente ridotta rispetto a conteggi effettuati in anni precedenti. Un esempio dell'allarmante contrazione numerica di questa specie nel nostro territorio, risale agli anni Ottanta e Novanta nel Friuli Venezia Giulia, dove si è verificato un decremento del 40-45% di individui, raggiungendo minimi di 650-900 uccelli a fine estate (Spengesì & Serra, 2004).

2.2.3. Aspetto morfologico e adattamenti al freddo

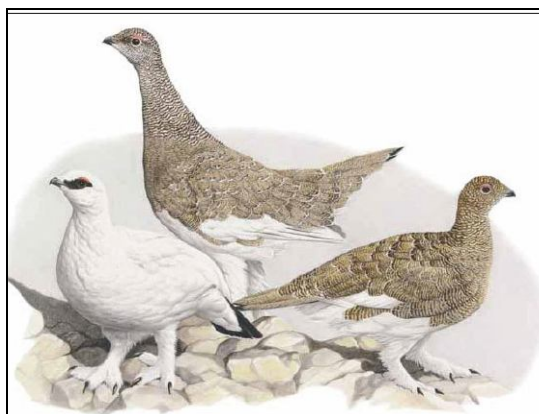


Fig.2.2.3. In alto maschio in habitus estivo, sotto a destra maschio in habitus invernale, a destra femmina in habitus estivo (Spangesi & Serra, 2004).

La pernice bianca è un uccello di medie dimensioni: maggiori per le popolazioni del Nord Europa (media di 514 g), seguite in ordine dalle popolazioni dei Pirenei francesi (400-540 g), delle Alpi italiane (385-520 g) e infine delle Alpi francesi (360-475 g). Per *Lagopus mutus helveticus* sono state osservate le seguenti misure: lunghezza di circa 35 cm, apertura alare 54-60cm e peso compreso tra i 385-520 g per i maschi e i 385-470 g per le femmine (Brenot, 2005; Peterson et al., 1988; De Franceschi, 1992).

La caratteristica più evidente nell'aspetto di *Lagopus mutus* è il piumaggio bianco che la distingue nelle varie stagioni (Fig.2.2.3). Questo uccello va incontro a tre principali mute nel corso dell'anno che le permettono una perfetta mimetizzazione, utile difesa dai predatori. In autunno perde le piume marron-grige del piumaggio estivo per indossare quelle bianche che d'inverno la renderanno quasi invisibile nella neve. Le uniche zone non bianche del piumaggio di entrambi i sessi sono le timoniere che restano nere e, nel maschio, le caruncole rosse. Le caruncole sono escrescenze carnose situate sopra gli occhi, che nel maschio durante il periodo degli amori assumono una colorazione rosso vivo, per l'intenso flusso di sangue che circola nei capillari. Il maschio presenta anche una sottile linea nera che congiunge becco e occhio. La livrea primaverile, ovvero l'habitus nuziale, mostra un dimorfismo sessuale più accentuato: le femmine mutano il loro piumaggio bianco in uno marrone scuro alternato a sottili fasce più chiare. Sono fortemente mimetiche, molto più dei maschi il cui piumaggio è più scuro, grigio barrato di marrone, con caruncole rosse. Entrambi i sessi presentano anche in questa stagione il ventre e le ali bianche. La minor cripticità maschile nel periodo dell'accoppiamento è spiegabile in termini di selezione sessuale.

Durante l'estate la livrea del maschio resta più scura di quella della femmina, bruna con macchiette grigie e nere, mentre la femmina presenta, anziché queste macchie, delle strie brune e nere su fondo giallo bruno (Lasagna, 2009; Montgomerie et al., 2001).

Il passaggio da uno stadio all'altro della muta avviene in modo graduale, eccezion fatta per lo stadio invernale che persiste immutato per il tempo nel quale il terreno è coperto di neve.

Un'altra tipica caratteristica di questo uccello è rappresentata dalle piume bianche che ricoprono le zampe e le dita. Servono ad evitare un'eccessiva dispersione del

calore dagli arti inferiori, e sono uno degli adattamenti ai freddi ambienti nordici e alpini che caratterizzano questa specie.

Come gli altri tetraonidi, anche la pernice bianca è caratterizzata da una serie di modificazioni strutturali e funzionali che hanno permesso l'adattamento a climi freddi e inospitali. Il corpo è compatto e robusto, il collo è corto, la testa piccola e il piumaggio folto e caldo. Le penne (e piume) possiedono infatti una seconda piuma interna attaccata alla base del calamo, che aumenta l'isolamento termico. Le ali sono corte e rotonde, e se da un lato questo evita un'eccessiva dispersione di calore, dall'altro rende meno agile il volo. In autunno crescono delle escrescenze cornee chiamate pettini sui lati delle dita che permettono di camminare più agilmente sulla neve. Le narici sono coperte da piccole piume che facilitano il riscaldamento dell'aria inalata (Abram, 1999; Storch, 2007).

Per vivere in questo tipo di ambiente *Lagopus mutus* ha acquisito anche delle modificazioni dell'apparato digerente, per riuscire a digerire piante dall'elevato contenuto fibroso come i salici nani. Questi alberi sono tra le poche fonti di cibo reperibile durante il lungo inverno alpino, quando la copertura nevosa può persistere per oltre sei mesi, solitamente da novembre ad aprile. A questo scopo il becco della pernice bianca è piccolo e curvo, l'intestino cieco molto lungo e diverticolato. Nel cieco è presente una ricca flora batterica che ottimizza l'assimilazione delle componenti meno digeribili. Nonostante ciò durante l'inverno questo tipo di nutrimento non è sufficiente a consentire un dispendio energetico elevato, e buona parte dell'energia ricavata dal cibo serve a mantenere la temperatura corporea costante. Per questo motivo i consumi energetici richiesti dall'attività muscolare e dovuti alla dispersione di calore vengono ridotti al minimo, limitando il movimento e concentrando la fase di attività a poche ore nel periodo più caldo della giornata (Abram, 1999).

Un'ulteriore difesa comportamentale dal freddo adottata da questo uccello è quella di scavarsi delle tane tra la neve. Queste tane vengono però frequentemente cambiate per scampare ai predatori.

I principali predatori sono la volpe e i rapaci, alcuni corvidi e, dove presente, l'ermellino (Sandercock et al., 2005).

La pernice bianca da adulta è esclusivamente vegetariana, mentre i piccoli hanno

una dieta varia prevalentemente costituita da insetti. In primavera con lo sciogliersi delle nevi, il cibo aumenta, e cresce la disponibilità di erbe, fiori e bacche. Le specie vegetali maggiormente consumate sono le gemme e le foglie di *Salix*, le foglie di *Chrysanthemum alpinum*, foglie e frutti di *Saxifraga*, *Poa*, *Festuca*, *Vaccinium myrtillus*, *V. vitis-idaea*, *Arctostaphylos uva-ursi* e *V. uliginosum* (Cramp & Simmons, 1980; De Franceschi, 1992; del Hoyo et al., 1994; Brenot et al., 2005).

2.2.4. Utilizzo del territorio e socialità

Lagopus mutus helveticus è una sottospecie sedentaria, nonostante questo essa compie degli spostamenti nell'arco dell'anno per stabilirsi nelle aree più idonee in base al clima. Occupa territori piuttosto vasti, che per i maschi possono raggiungere alcune centinaia di ettari. Le femmine compiono brevi spostamenti che le possono però portare in siti diversi da quello dove sono nate, per scegliere il luogo di nidificazione dove si stabilizzeranno col proprio maschio, questi invece tendono a controllare il territorio nel quale sono nati (Lasagna, 2009).

In autunno e in inverno gli individui possono compiere erratismi fino a cime montuose limitrofe al sito di accoppiamento per la ricerca di condizioni microclimatiche favorevoli, raggiungendo distanze massime di 10-23 km che si avvicinano a quelle osservate per *L. leucura* in Nord America (Hoffman & Braun, 1975).

Solitamente la pernice bianca predilige siti tra i 2000 e i 2800 metri di altitudine. Durante l'inverno si abbassa di quota, ma in condizioni favorevoli per copertura nevosa, può svernare anche oltre i 2500 metri (Favaron et al., 2006). Per quanto riguarda le quote di nidificazione, le più basse sono state osservate sulle Alpi Giulie a 1800 m, con la quota minima di 1550 m sul monte Grande (Prealpi Giulie, Udine), le più elevate in Val Malenco (Alpi Retiche, Sondrio) a 2780 m (De Franceschi, 1986). Le covate si trovano solitamente in zone con grandi massi sotto i quali i piccoli vengono tenuti al sicuro, mai troppo pendenti né con dei dirupi nelle immediate vicinanze, per evitare rischi per la prole. Generalmente in questi siti è presente una bassa vegetazione che possa servire da cibo all'adulto,

ma anche un'abbondanza di piccoli insetti per l'alimentazione dei piccoli. Predilige i versanti più freschi, quindi esposti a Nord, Nord-Ovest o Nord-Est, soprattutto in zone dove l'ombra persiste per la maggior parte della giornata e c'è umidità o dei nevai. Gli ambienti preferiti sono quelli con pendenza compresa tra i 12° e i 47°, orografia fortemente accidentata, luoghi di riparo dai predatori e buona visuale, presenza di ghiaioni, morene o comunque un substrato roccioso alternato a vegetazione rada (Favaron et al., 2006; Zohmann & Wöss, 2007; Lasagna, 2009) (Fig.2.2.4).



Fig.2.2.4. Siti idonei per Lagopus mutus. In alto a sinistra: monte Giralba; sotto: pianoro ad est delle Tre Cime di Lavaredo; a destra: monte Peralba.

La pernice bianca è un animale monogamo e tendenzialmente gregario. Durante l'autunno le pernici formano gruppi di qualche decina di individui, misti tra i sessi. In seguito i gruppi si separano dando più assembramenti di circa dieci uccelli ciascuno. In primavera questi gruppi si sciolgono, e tra gennaio e febbraio si formano le coppie che prendono disposizione in un territorio specifico grande

qualche centinaio di ettari, che viene tenacemente difeso dal maschio (Lasagna, 2009; Favaron et al., 2006)

Verso fine aprile iniziano i rituali di corteggiamento: il maschio si esibisce in piccoli voli circolari accompagnati da brevi suoni gutturali ripetuti. Questo canto ha una doppia funzione: territoriale e di corteggiamento. Il maschio difende strenuamente i confini del suo territorio che possono rimanere invariati per tutta la vita dell'animale. La femmina, attirata dall'esibizione e dal canto del maschio, si avvicina predisponendosi all'accoppiamento.

L'aggressività maschile cresce all'avvicinarsi del momento dell'accoppiamento. Una volta avvenuto, il maschio coopera alla costruzione del nido: ne prepara più d'uno, poi la femmina sceglierà e sistemerà quello che riterrà più adatto per deporre le uova. Al termine dello svezzamento il maschio la lascia per unirsi al gruppo di maschi. Questi gruppi sono formati da maschi non accoppiati, a cui si aggiungono quelli che hanno abbandonato la femmina dopo la schiusa delle uova, e infine le femmine che hanno perso la covata (Lasagna, 2009).

Le femmine producono una sola covata all'anno, in giugno, costituita da tre a dieci uova deposte ad intervalli di 24-36 ore per un totale di 12 giorni circa. Solo alcune di queste uova, verso la metà di luglio, si schiuderanno e il numero di piccoli nati varierà dai cinque, in annate particolarmente buone, ad anche solo uno in anni più rigidi. In alcuni anni si è registrata la perdita dell'intera covata da parte di più femmine. Un fattore determinante nel successo della covata è quello climatico, nevicate tardive causano danni ingenti alle covate. Alla nascita i piccoli sono precoci, già in grado di nutrirsi da soli e di seguire la madre nei brevi spostamenti. A dieci giorni riescono già a volare piuttosto bene, e in tre mesi raggiungono l'80-90% del peso corporeo definitivo. Le nidiate si disperdono tra fine settembre e inizio ottobre. La madre resta con i piccoli fino alla fine dell'inverno successivo, unendosi alle altre femmine e i loro piccoli (Cramp & Simmons, 1980; Harrison, 1988; De Franceschi, 1992; del Hoyo et al., 1994; Novoa, 2008).

2.2.5. Conservazione

La pernice bianca non è considerata una specie in via di estinzione a livello globale. Nelle regioni nordiche le popolazioni appaiono, infatti, piuttosto stabili. Inoltre in queste aree il tasso riproduttivo è decisamente superiore a quello osservato sulle Alpi: tasso riproduttivo dello 0,72 in Norvegia contro lo 0,31 in Italia. Ciò grazie alle maggiori dimensioni delle covate, alla maggior disponibilità di cibo e al minor tasso di predazione dei nidi (Novoa et al., 2008).

Le popolazioni di pernice bianca, secondo il rapporto dello IUNC, nonostante siano in declino, non risultano nella lista rossa delle specie in pericolo, e addirittura compaiono sotto la linea soglia della vulnerabilità, in quanto il loro declino numerico non risulta sufficientemente rapido (declino superiore al 30% in 10 anni o 3 generazioni), e la dimensione della popolazione non è sufficientemente ridotta (<10000 individui adulti con un declino continuo stimato superiore al 10% in 10 anni o 3 generazioni, o con una struttura di popolazione specificata).

E' da sottolineare però il fatto che queste considerazioni riguardano la pernice bianca a livello globale. A livello nazionale invece essa è collocata nella Lista Rossa delle specie in pericolo di estinzione, ed è inoltre inserita già dal 1979 nell'allegato I della Direttiva Uccelli (79/409/CEE, allegato II, III) della Convenzione di Berna.

Questi dati sono effettivamente riscontrabili con i risultati dei censimenti primaverili ed estivi in vari siti dell'arco alpino, che segnalano un decremento numerico degli individui di questa specie.

Essa non è più cacciabile in alcune aree, in altre è sotto controllo con limitazione del numero di capi che possono essere abbattuti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONAMENTI

3.1.1 Lepre bianca

La lepre bianca è una specie estremamente elusiva e sensibile alla cattura, di conseguenza non è stata presa in considerazione l'idea di catturare gli animali per raccogliere i campioni biologici da cui estrarre il DNA, tecnica che viene adoperata per altre specie, quali ad esempio i topi, le rane o le lucertole.

Due erano le tecniche possibili per raccogliere i campioni necessari a questo studio: il campionamento non invasivo di escrementi e di pelo, e l'ottenimento dai cacciatori di porzioni di tessuto degli animali cacciati. I campioni che si potevano ottenere da quest'ultima modalità di campionamento erano però pochi, essendo una specie non abbondante nei carnieri e la risposta dei cacciatori alla richiesta di campioni piuttosto bassa. E' stata calcolata una risposta positiva circa del 30% sulla base di studi precedenti, dato confermato anche in questo studio: per la provincia di Belluno, 39 riserve di caccia dove hanno capi di bianca in abbattimento, 18 riserve che hanno risposto positivamente alla richiesta (il 46%), 5 campioni ottenuti corrispondenti al 28% di risposta concreta tra i cacciatori che avevano dato il consenso.

Si è deciso quindi di procedere con il campionamento non invasivo, che rimane la fonte principale di campioni.

Per improntare la strategia di campionamento si sono studiate con attenzione le abitudini della specie. Le zone che ho verificato essere più idonee, sulla base del numero di segni di presenza, possiedono tutte caratteristiche simili: l'altitudine è variabile a seconda della stagione, ma anche d'inverno quando le lepri bianche scendono verso valle alla ricerca di cibo, non frequentano zone al di sotto dei 1200-1300 m. La quota più bassa alla quale ho trovato degli escrementi è stata 1280 m in Val d'Oten (BL) a metà febbraio 2011; la quota maggiore è stata 2500 m sul monte Pelmo (BL). I territori scelti dalla lepre variabile raramente sono all'interno del fitto bosco, più frequentemente nel limitare delle zone boschive, mentre le aree più ricche di segni di presenza presentavano una vegetazione

prevalentemente costituita da pino mugo alternata a piccole radure d'erba bassa. In questi siti, ad inizio estate, mi è capitato di trovare fatte di dimensioni differenti, evidente segno di presenza di adulti con i piccoli. La lepre bianca, come molti altri animali, preferisce percorsi semplici e già tracciati, dove il passaggio non è ostacolato dalla presenza di fitti arbusti, rovi, ecc. Frequentemente è stato osservato che percorre anche per lunghi tratti i sentieri battuti.

Sono state considerate due aree differenti dal punto di vista gestionale: una dentro i confini del Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi, ed una fuori dal Parco.

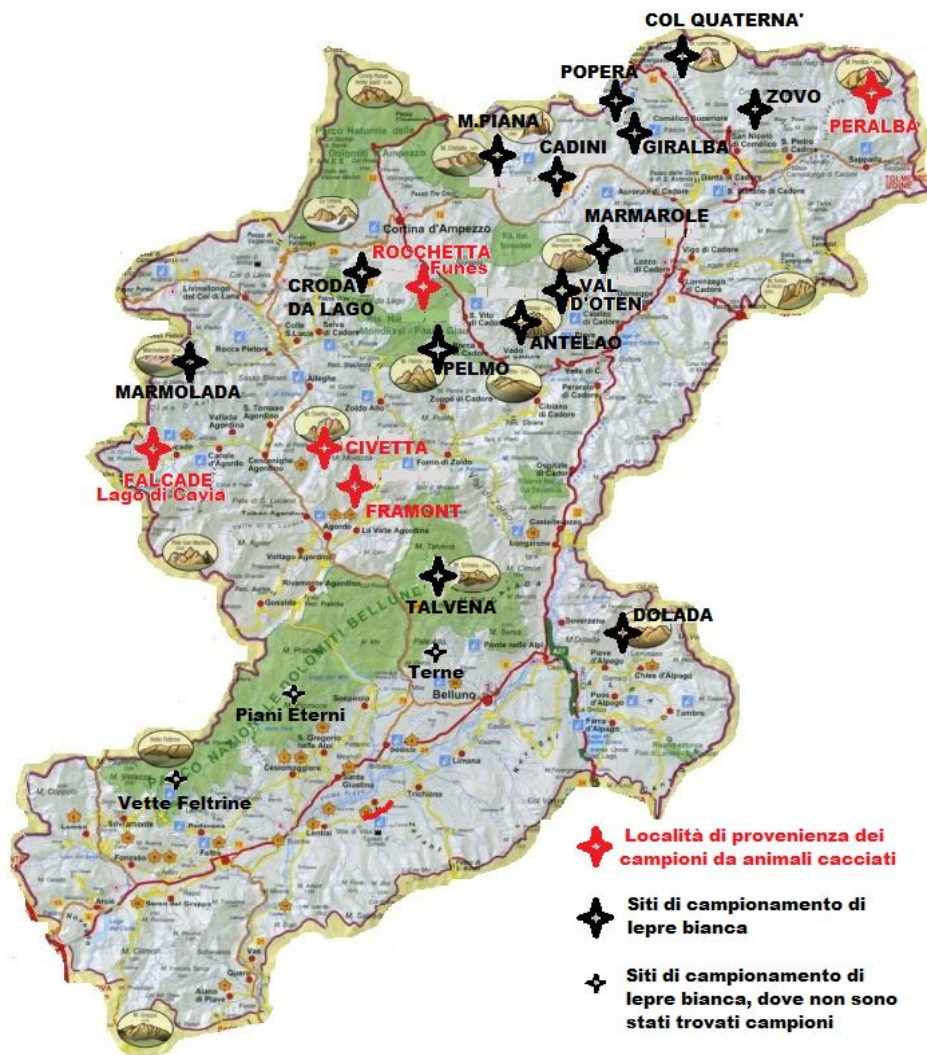


Fig.3.1.1. Siti di provenienza dei campioni di *Lepus timidus*. In nero i campionamenti effettuati nel 2011; in rosso le località di provenienza dei campioni ottenuti dai cacciatori (autunno 2011). Le zone colorate di verde sono le aree comprese nei Parchi. Il più esteso, nella parte centro-occidentale della Provincia è il Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi.

Nel primo periodo (primavera-estate 2011) i campionamenti si sono concentrati nei territori fuori dal Parco e le località maggiormente battute sono state il Cadore, il Comelico e una zona dell'Alpago.

I siti che hanno fornito un maggior numero di campioni sono stati il monte Pelmo, la val d'Oten e i gruppi montuosi Antelao e Marmarole per il Centro Cadore, il monte Piana e il monte Giralba per la zona di Auronzo (Alto Cadore) e il monte Dolada in Alpago. Le zone del Cadore sono state scelte come sede di campionamento in base alle indicazioni della Polizia Provinciale che mi ha accompagnata insegnandomi a distinguere le tracce e gli escrementi.

La zona del monte Dolada è stata invece selezionata in base a indicazioni fornite dai cacciatori che, in quest'area, praticano ancora annualmente la caccia a questa specie, sebbene con un basso numero di individui cacciabili, stabilito a livello provinciale. In seguito a queste segnalazioni sono state effettuate tre uscite in periodi diversi dell'anno sul versante meridionale del monte Dolada a quote comprese tra i 1600 e i 1900metri. Sono state rinvenute tracce ed escrementi ma, in seguito alle analisi, è stato escluso che si trattasse di lepre bianca, trovando invece corrispondenza mitocondriale con la bruna.

Distinguere gli escrementi delle due specie di lepre è piuttosto difficile. Di norma le feci di *Lepus europaeus* sono leggermente più grandi ma non sempre è possibile apprezzare questa differenza. La discriminazione durante l'attività di campo è piuttosto effettuata in base al territorio e all'altimetria. Solitamente al di sotto dei 1400metri le feci trovate non sono state raccolte perché attribuite a lepre bruna.

In Val Belluna sono stati effettuati altri prelievi di campioni fecali sulle cime delle Prealpi facenti parte del Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi. In quest'area alcuni campioni sono stati forniti dalle guardie Forestali. Per altri è stato eseguito un campionamento sistematico nelle varie vette dove era indicata la presenza di lepre variabile, nel periodo da metà ottobre fino a dicembre 2011. L'obiettivo era di concentrare le uscite nei giorni successivi alle nevicate, in modo da distinguere con facilità le impronte, che avrebbero condotto agli escrementi. L'autunno 2011 è stato però particolarmente scarso di nevicate, la prima nevicata abbondante è stata registrata a metà dicembre 2011. Prima di quella data sono state fatte diverse uscite di campionamento all'interno del Parco, nei gruppi montuosi Vette Feltrine, Cimonega, Schiara, sui Piani Eterni e sul monte Pramper, nelle quali non sono

però stati trovati campioni.

Mentre nelle zone meridionali della provincia trovare escrementi di lepre bianca senza l'aiuto delle impronte sulla neve è stato quasi impossibile, nelle aree settentrionali non si sono riscontrate particolari differenze nel numero di campioni trovati in presenza o assenza di neve.

Il maggior successo nel reperire escrementi a seguito di una nevicata, sta nella facilità di rintracciare e seguire le impronte fresche delle lepri. La lepre bianca lascia delle impronte sulla neve facili da identificare. Le due paia di zampe, anteriore e posteriore, hanno forma differente: le prime sono rotondeggianti e hanno un diametro di circa 5 cm, quelle posteriori sono più allungate, ma lasciano sulla neve un'orma comunque rotonda. Nel salto la lepre appoggia prima le zampe anteriori, che poi vengono superate nel balzo da quelle posteriori che risultano dunque davanti alle altre, come si può notare dall'immagine (Fig.3.1.2).



Fig.3.1.2. Impronte sulla neve di lepre variabile. A sinistra è chiaramente visibile la posizione delle zampe durante il balzo, la direzione dell'animale è verso l'osservatore. In alto a destra si vede un'impronta freschissima con ancora chiaro il segno delle dita. Sotto, lepre durante il balzo.

Riconoscere i segni del passaggio degli animali, capire le dinamiche del bosco, delle praterie d'alta montagna e dei loro abitanti sembra un bagaglio di concetti

che non fa più parte della cultura d'oggi, ma che appartiene ad un passato a noi lontano. Riscoprire questo modo intimo di vivere e conoscere la natura, grazie all'aiuto degli agenti della Polizia Provinciale, del Corpo Forestale e dei cacciatori è stata un'esperienza davvero importante che ho avuto la gioia di fare grazie a questo mio anno di tirocinio.

Durante le ricerche ho recuperato quasi unicamente escrementi (solo tre volte ho trovato del pelo), è su questi che ho condotto le analisi genetiche.

Le fatte di lepre bianca hanno forma rotonda, leggermente schiacciata, e un diametro di circa 1 cm (Fig.3.1.3a). La colorazione è marrone chiaro, anche se varia, al variare delle stagioni, in base alla dieta dell'animale. La consistenza è piuttosto dura, all'apparenza quasi secca anche in fatte appena deposte, e questo è dovuto alla conformazione intestinale dell'animale che, grazie ad un cieco molto lungo, permette un elevatissimo riassorbimento di liquidi.

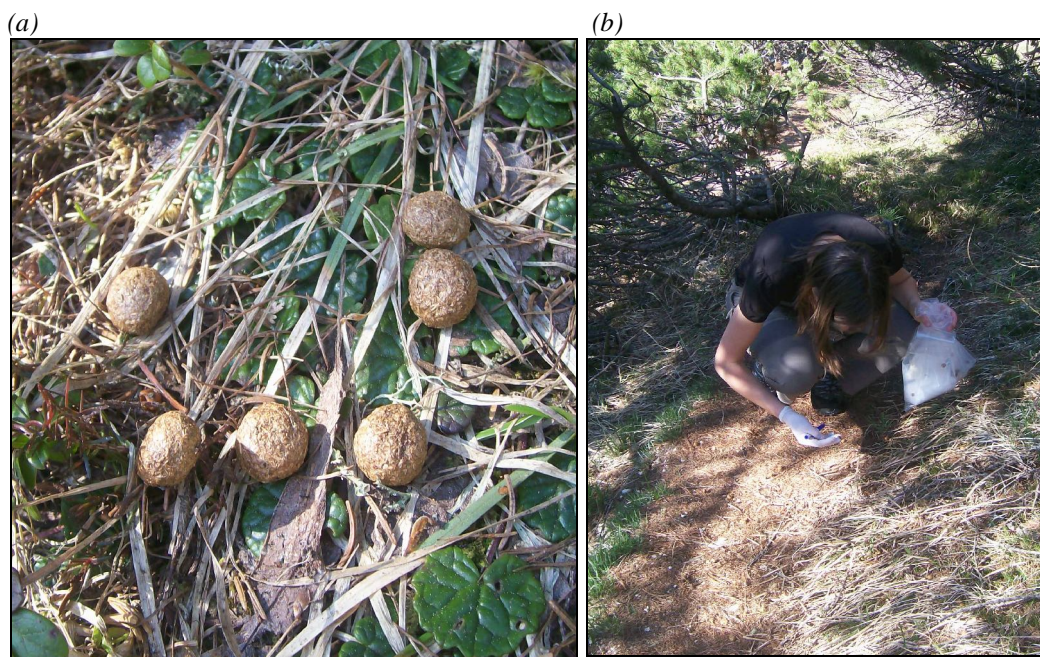


Fig.3.1.3. (a): escrementi di lepre bianca trovati sul monte Pelmo. (b): fase di raccolta.

La lepre depone le feci mentre procede, quindi è più frequente trovare fatte distribuite lungo il percorso dell'animale piuttosto che mucchietti di escrementi localizzati. Si trovano comunque zone in cui ne è concentrato un maggior numero, in questi casi è necessario prendere delle precauzioni perché con elevata probabilità sono aree frequentate da più individui: le fatte raccolte non devono

esser considerate di uno stesso animale bensì inserite in provette differenti. Solo l'analisi del DNA potrà dire se erano animali diversi e anche quanti hanno deposto in quel sito.

Il campionamento avente come fine l'estrazione di DNA a partire da campioni fecali, richiede alcune particolari attenzioni per abbassare le probabilità di insuccesso. Innanzitutto gli escrementi non contengono grandi quantità di DNA, e il materiale genetico presente è solitamente di bassa qualità e degradato a causa dell'esposizione delle feci all'ambiente e agli agenti climatici.

Per evitare che la degradazione del DNA sia così alta da inficiare le analisi è necessario raccogliere gli escrementi entro poco tempo dalla deposizione. Questo periodo varia da subito dopo che sono stati deposti a poco più di sette giorni, ed è dipendente dalla stagione, dalla dieta dell'animale e dalle condizioni climatiche (Kovach et al., 2003).

L'inverno risulta la stagione migliore in cui effettuare questo tipo di campionamento in quanto le feci deposte sulla neve si conservano più a lungo (oltre i sette giorni) e non sono soggette a precipitazioni piovose che dilavano le cellule epiteliali sulla superficie della fatta. Inoltre, la dieta altamente fibrosa dell'animale in questo periodo di difficile reperimento del cibo, facilita la presenza di cellule epiteliali esfoliate dell'animale sulla fatta.

Di contro quando in primavera la neve comincia a sciogliersi, le precipitazioni piovose aumentano e la dieta della lepre si arricchisce di erbe più tenere, gli escrementi hanno una velocità di degradazione molto maggiore e può essere che, già dopo due giorni dalla deposizione, siano eccessivamente compromessi (Kovach et al., 2003).

Per evitare la contaminazione, risulta di assoluta importanza la modalità di raccolta delle feci. È necessario adoperare guanti che vanno cambiati dopo ogni uso, e materiale sterile (Fig. 3.1.3b).

Per questi campionamenti sono state utilizzate buste sterili 10x15, entro le quali è stata messa una sola fatta (in rari casi in cui sicuramente due o tre fatte appartenevano allo stesso animale sono state messe nello stesso sacchetto, ma poi una sola per volta utilizzata nell'estrazione del DNA).

Ad ogni uscita di campionamento sono state annotate sui sacchetti la data, il numero del campione, il sito di ritrovamento (compresa l'altitudine e quando possibile le coordinate GPS), il campionatore e se ritenuto necessario, caratteristiche particolari del campione rinvenuto.

La conservazione è avvenuta secondo differenti modalità. Inizialmente era stato adottato un sistema di conservazione classico: la fatta veniva infilata in una provetta falcon da 15 ml entro cui erano stati precedentemente aliquotati 1,6 ml di etanolo al 90%. In seguito si è preferito effettuare una modifica nel mezzo di conservazione visti i risultati di uno studio del dottor Scandura (2008), che metteva a confronto la resa di estrazione del DNA da campioni di lepre variabile conservati in etanolo o in un tampone di lisi specifico per le feci (stool lysis buffer SLB, o ASL del kit QiaAmp Stool-Qiagen). Scandura et al. sottolineano nella relazione finale del loro studio, una resa circa due volte maggiore nella conservazione degli escrementi in ASL piuttosto che in etanolo (28% vs 15%). Si è dunque deciso di aliquotare nelle provette 2,4 ml di buffer ASL, aggiungervi poi la fatta singola, e conservare in congelatore a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

Sono stati raccolti 200 campioni, dei quali 2 di pelo e 198 fecali, in 17 località della provincia di Belluno. In tutto erano state selezionate 20 località, delle quali 5 entro i confini del Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi (Cimonega, Piani Eterni, Talvena, Terne, Vette Feltrine), 1 nell'area sud-orientale della provincia (m. Dolada, dalle analisi è emerso che si trattava di *L. europaeus*), 1 nel versante bellunese della Marmoloda e 13 distribuite tra Cadore, Comelico e monti di Cortina. In 3 di queste località, nonostante le ripetute uscite di campionamento, non sono stati trovati campioni (Piani Eterni, Terne, Vette Feltrine) (Tab.3.1.1).

Tab.3.1.1. Siti di campionamento alla lepre bianca in provincia di Belluno. P=campioni di pelo; F=campioni fecali.

Sito	Campioni P	Campioni F
Antelao	-	18
Cadin dei Toci	-	2
Cadin della Neve	-	1
Cimonega	1	-
Col Quaternà	-	8
Croda da Lago	-	3
Dolada	-	23
Giralba	-	34
Marmarole	1	8
Marmolada	-	5
Pelmo	-	27
Peralba	-	1
Piana	-	37
Piani Eterni	-	-
Popera	-	2
Talvena	-	1
Terme	-	-
Val d'Oten	-	21
Vette Feltrine	-	-
Zovo	-	7
TOTALE	2	198
	200	

All'apertura della stagione di caccia alla lepre variabile il 1° ottobre 2011, mi è stata data la possibilità da parte della Polizia Provinciale di contattare i presidenti delle riserve di caccia per chiedere la disponibilità ad ottenere dei campioni di tessuto. I cacciatori si sono dimostrati disponibili e siamo così riusciti ad ottenere 5 campioni di tessuto di lepre variabile anche di località che non erano state interessate dal nostro campionamento (zona dell'Agordino e Falcade) (Tab.3.1.2). Ad ogni riserva di caccia sono stati consegnati dei tubini contenenti alcol al 90%, in quantità pari al numero dei capi in abbattimento destinati alla riserva. Sono state fornite anche delle bustine per il pelo, le schede da compilare con tutti i riferimenti necessari (sito di abbattimento, data, età dell'animale, sesso nel caso fosse possibile identificarlo e nome del cacciatore) e delle istruzioni scritte sulle modalità di prelievo del pezzo di campione (tipo di tessuto da prelevare, come procedere al fine di evitare contaminazioni, come conservare il campione).

I campioni forniti dai cacciatori sono stati molto importanti perché han permesso di ampliare l'area di studio verso il settore Agordino che non era stato interessato dalle uscite di campo. Da quest'area sono stati forniti i campioni di tessuto e pelo

appartenenti a 4 individui provenienti dai monti Civetta, Framont, Mondeval e dalla Riserva di Caccia di Falcade. Da Sappada ci sono stati forniti un campione tissutale ed uno di pelo di un esemplare cacciato che, in seguito ad analisi, è risultato appartenere alla specie *L. europaeus* (Tab.3.1.2).

Tab.3.1.2. Campioni da pelo (P) e tessuto (T) provenienti da animali abbattuti nelle Riserve di Caccia del Bellunese.

Sito	Campioni P	Campioni T
Civetta	-	1
Falcade	1	1
Framont	1	1
Mondeval	1	1
Peralba	1	1
TOTALE	4	5
	9	

3.1.2 Pernice bianca

Anche per la pernice bianca è stata scelta la tecnica del campionamento non invasivo.

Precedentemente al 2009, lo studio della pernice bianca veniva effettuato unicamente a partire da materiale tissutale prelevato dagli animali abbattuti dai cacciatori, o nel caso se ne presentasse l'occasione, da porzioni di muscolo prelevate da animali trovati morti. Il campionamento non invasivo cominciò dunque nel 2009 con la raccolta di piume e penne durante i censimenti estivi organizzati dall'Ufficio Foreste e Fauna della Provincia Autonoma di Trento in collaborazione con l'Associazione Cacciatori Trentini.

In questo primo periodo le feci venivano raccolte solo nel caso in cui nella zona fossero l'unico tipo di campione di *Lagopus mutus* presente.

Successivamente, a seguito delle prime analisi in cui sono stati estratti anche campioni fecali, si è notato che i risultati erano molto buoni anche con questo materiale. Nelle uscite di campionamento successive sono quindi sempre stati raccolti anche gli escrementi.

Le località per il campionamento sono state scelte sulla base degli avvistamenti negli anni precedenti.

Nel territorio trentino i luoghi dove è stato effettuato il campionamento sono stati selezionati sulla base dei campionamenti del 2009-2010. Le variabili considerate nella scelta delle zone che sarebbero state oggetto di campionamento nel 2011 sono state: quantità di piume raccolte negli anni precedenti e disposizione geografica di queste aree, in modo tale che fossero quanto più possibile distribuite omogeneamente nel territorio della provincia di Trento (Tab.3.2.1).

Le zone dove erano state trovate poche piume (da 0 a 10) sono state escluse dal campionamento, come anche due aree delle quali avevamo un numero di campioni già più che sufficiente: Lastè delle Sutte e l'altopiano della Rosetta, di cui erano già stati raccolti rispettivamente 70 e 74 campioni. Anche di Cima d'Asta avevamo un numero molto elevato di campioni (113) ma qui il campionamento è stato comunque ripetuto perché si tratta di una zona che si è scelto di monitorare annualmente.

Tab.3.2.1. Aree di campionamento selezionate per le uscite del 2011. L'area di Lastè di Contrin era stata inizialmente selezionata, poi esclusa per bilanciare i campionamenti tra destra e sinistra-Adige.

LOCALITA'	RISERVA	DISPOSIZIONE RISPETTO AL FIUME ADIGE	NUMERO CAMPIONI RACCOLTI NEL2009	NUMERO CAMPIONI RACCOLTI NEL2010	NUMERO CAMPIONI RACCOLTI NEL2011	TOTALE
Campinello	Tesino	Sinistra	0	7	0	7
Cima d'Asta	Tesino	Sinistra	31	82	96	209
Forcella Marmolada	Canazei	Sinistra	33	0	33	66
Grostè	Regole Spinale	Destra	45	16	74	135
Lago delle Stelune	Castello-Molina	Sinistra	11	15	8	34
Lastè di Contrin	Pozza di Fassa	Sinistra	5	12	0	17
Lasteatti-Cengello	Scurelle- Pieve Tesino	Sinistra	9	4	15	28
Rifugio Denza	Presanella	Destra	1	14	2	17
Val di Fumo	Daone	Destra	9	18	75	102
						615



Fig.3.2.1. Siti di campionamento della pernice bianca in provincia di Trento .

Nel Bellunese le aree di campionamento sono state scelte sulla base delle informazioni riferite dal personale del Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi (per quanto riguarda l'area occupata dal Parco), e dagli agenti della Polizia Provinciale per le zone extra-parco.

All'interno del Parco sono state visitate due aree interessate dalla presenza di *Lagopus mutus*: le Vette Feltrine e i Piani Eterni.

Le altre aree di campionamento rientravano nei territori del Cadore e del Comelico (Fig.3.2.2; Tab.3.2.2).

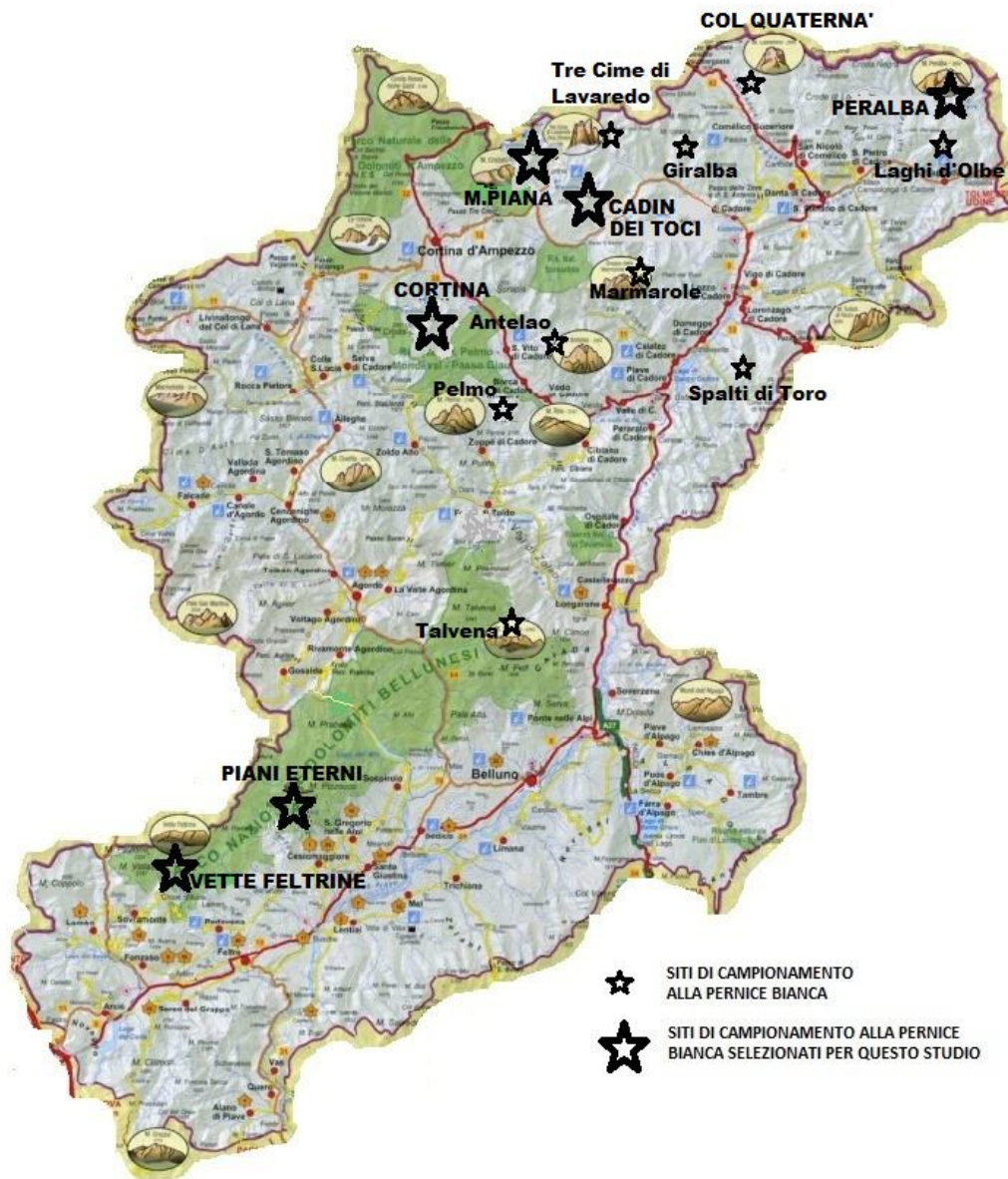


Fig.3.2.2. Siti di campionamento della pernice bianca in provincia di Belluno effettuati nel 2011.

Tab.3.2.2. Aree di campionamento selezionate per le uscite del 2011 in Provincia di Belluno. In grassetto le popolazioni per le quali è stato raccolto un numero sufficiente di campioni. Evidenziate le località selezionate per questo studio.

LOCALITA'	RISERVA	NUMERO FECI RACCOLTE	NUMERO PIUME RACCOLTE	TOTALE
Cadin dei Toci	Auronzo	34	71	105
Cortina	Cortina	2	0	2
Laghi d'Olbe	Sappada	16	25	41
m.Pelmo	Vodo di Cadore	3	0	3
m.Quaternà	Comelico Superiore	2	1	3
m.Talvena	Longarone	2	1	3
Marmarole	Domegge di Cadore	2	1	3
Monte Piana	Auronzo	7	2	9
Peralba-Chiadenis	Sappada	19	85	104
Piani Eterni	Cesiomaggiore	17	2	19
Tre Cime di Lavaredo	Auronzo	23	7	30
Vette Felrine	Feltre	24	55	79

I campionamenti sono stati effettuati in due periodi principali, che corrispondono ai giorni di censimento, in primavera e in estate.

Il censimento primaverile si effettua al canto. Questa tecnica consiste nel posizionare un certo numero di operatori in un territorio abbastanza vasto, ad una distanza prestabilita. La posizione di queste persone dev'essere precedentemente accordata, ed è necessario che essi sincronizzino i propri orologi. Questo serve al momento della resa dei conti, quando contando il numero di animali effettivi, tra quelli visti e quelli uditi, due operatori che hanno sentito un animale localizzato circa a metà distanza tra loro, possono dire se era lo stesso individuo oppure no, in base al fatto che coincidano o meno le coordinate geografiche e l'ora alla quale il canto è stato udito.

Il censimento al canto è un evento emozionante, il canto del maschio si può udire fino ad un chilometro di distanza e qualche volta è possibile assistere alla curiosità della femmina che attirata dai voli del maschio si avvicina guardando oppure più di frequente resta ad osservarlo da lontano.

Effettuare questi censimenti richiede sveglia presto e impegno per raggiungere le aree difese dai maschi. Essi iniziano a cantare circa un'ora prima dell'alba e continuano approssimativamente fino ad un'ora dopo il sorgere del sole, il che in primavera corrisponde ad un periodo di tempo che va dalle 4.30 alle 7.00 del mattino. Variazioni possono sussistere in base alle condizioni atmosferiche.

Durante questo censimento, effettuato con regolarità nelle aree dove la pernice viene monitorata o dove essa è ancora sottoposta a prelievo venatorio, è possibile recuperare dei campioni fecali e del piumaggio.

Durante la primavera 2011, i campionamenti del periodo primaverile non hanno portato ad un recupero abbondante di campioni.

In trentino è stato effettuato questo tipo di campionamento in due zone. A Cima d'Asta le condizioni meteorologiche non hanno permesso di individuare le pernici a causa della nebbia, inoltre la neve era piuttosto alta e recuperare piume in queste condizioni risultava pertanto difficoltoso. Nei Lasteatti-Cengello, altre cime della catena del Lagorai, sono state avvistate delle pernici ma non sono state trovate molte piume mentre sono state raccolte diverse fatte.

Nel bellunese ho partecipato al censimento al canto solo nella zona del monte Piana, ho potuto vedere due maschi e raccogliere qualche escremento ma una sola piuma.

Mi aspettavo di reperire una quantità maggiore di piume visto che nel periodo primaverile questi animali iniziano a mutare il piumaggio. Il problema, rispetto al censimento estivo, è probabilmente che in primavera gli animali raramente vengono avvistati nei pressi delle zone di rifugio, piuttosto in zone di radura dove i maschi possono più facilmente essere visti dalla propria femmina. Di conseguenza se si trova qualche piuma è perché è stata casualmente persa durante il volo.

Il campionamento estivo è stato invece più intenso e sistematico. Dove possibile abbiamo seguito gli agenti della Polizia Provinciale e del Corpo Forestale che accompagnavano i cacciatori nel censimento con i cani da ferma.

Questo tipo di censimento facilita di molto la raccolta dei campioni perché i cani sono addestrati per seguire le tracce di questi Tetraonidi.

Una volta trovati, puntano le pernici fino a che il cacciatore li raggiunge. In altri casi le pernici, una volta che il cane si è avvicinato, si alzano in volo (Fig.3.2.3). Quando lo fanno si alzano tutte, e in questo modo è facile contare quante erano presenti in quel sito. Questo censimento richiede solitamente un numero minore di persone rispetto al primaverile, a patto che il territorio idoneo non sia così vasto che siano necessari molti cani, e i loro padroni, per pattugliarlo tutto. E'

fondamentale annotare sia dove sono state avvistate le pernici sia, nel caso abbiano preso il volo, dove si sono dirette, in modo da non contare due volte i membri di uno stesso gruppo.

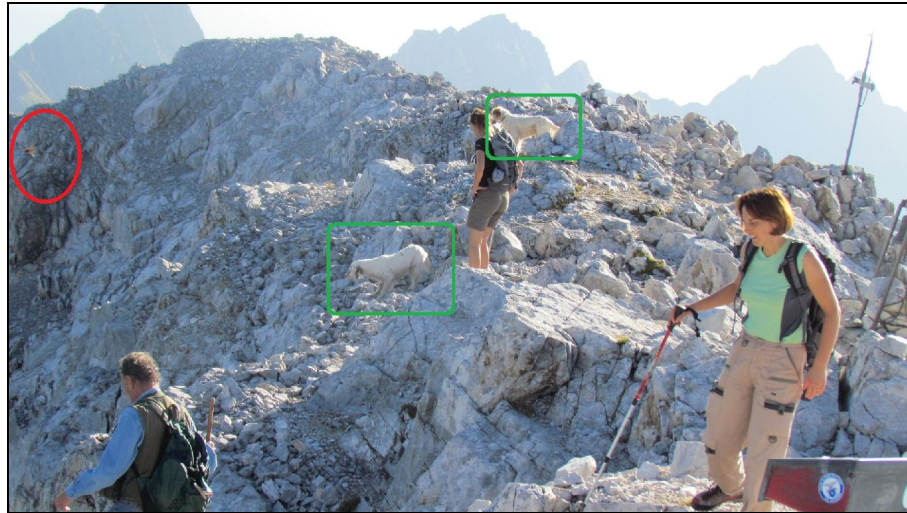


Fig.3.2.3. Censimento estivo con i cani (evidenziati in verde) sul monte Peralba. Una delle pernici alzate è cerchiata in rosso.

Venendo localizzate le posizioni precise degli individui, una volta raggiunte queste postazioni è altamente probabile trovare un numero elevato di campioni sia fecali sia di piume. In qualche fortunata occasione è stato possibile notare la terra spostata per i bagni di terra o addirittura un piccolo nido con ancora i piumini dei piccoli.

Sebbene in presenza di cani da ferma il campionamento risulti notevolmente facilitato, la ricerca di campioni in estate risulta comunque più semplice rispetto che in primavera, perché durante la stagione post-riproduttiva le femmine con le covate tendono ad occupare sempre gli stessi siti.

In diversi casi, infatti, il campionamento è stato effettuato semplicemente seguendo gli agenti della Polizia Provinciale e del Corpo Forestale, che indicavano le aree che sapevano essere frequentate dalle pernici e dove esse solitamente covavano. Ciò è avvenuto soprattutto in provincia di Belluno dove solo in due casi è stato possibile sfruttare il censimento con i cani, non più molto praticato in quest'area a causa dei divieti entro i confini del Parco e del poco interesse da parte di molti cacciatori che, a causa dei terreni troppo impervi, evitano di danneggiare le zampe dei cani.

Tutte le piume trovate vengono raccolte, a meno che non siano eccessivamente degradate (ad esempio se manca una parte della piuma o se è sporca di fango).

Nei campionamenti per questo studio abbiamo sempre raccolto le piume che presentavano i primi due stadi di qualità del campione, come descritti precedentemente nel capitolo 1.3 (Hogan, 2007). Raramente, solo nel caso in cui non ci fossero alternative e la piuma degradata fosse l'unico reperto nella zona, è stata raccolta anch'essa.

Nella fase precedente a quella di estrazione, quando vengono allestiti i campioni, in caso di più piume appartenenti allo stesso animale, è stata scelta quella che si presentava in condizioni migliori, possibilmente come nel primo stadio della classifica proposta da Hogan.

Piume trovate singolarmente sono state poste ciascuna in una bustina, sulla quale è stato annotato il numero del campione, il sito e la quota alla quale sono state trovate, e, in caso di più campionatori, il nome della persona che le ha raccolte. Nel caso di ritrovamento di uno spollinatoio (piccola concavità scavata dalla pernice adulta per i bagni di terra) o del sito dove le pernici avevano passato la notte, la regola è stata raccogliere in uno stesso sacchetto solo le piume appartenenti allo stesso animale. Il distinguo tra uno o due diversi animali è stato fatto in base al punto preciso dove la piuma era stata raccolta: piume vicine che rientravano in un cerchio immaginario di diametro inferiore o uguale ai 25 cm sono state considerate di uno stesso individuo, altrimenti di uccelli differenti.

Le piume vanno raccolte con l'accortezza di non toccare il calamo ma di prenderle dal vessillo, in modo da non contaminare il campione o asportare involontariamente le già scarse cellule epiteliali.

Dal momento che frequentemente il substrato sul quale le piume poggiano è umido, è stato introdotto un pezzo di carta assorbente in ogni bustina in modo da asciugare la piuma e fermare il processo di degradazione.

La raccolta degli escrementi avviene seguendo all'incirca la stessa modalità.

Le fatte di pernice hanno forma allungata, dai 2 ai 3,5 cm, se sono intatte presentano una doppia colorazione e consistenza: la parte marrone è compatta mentre una delle due estremità è bianca e pastosa per il deposito di urati (Fig.3.2.4).



Fig.3.2.4. Escrementi di pernice bianca.

Fatte rinvenute nello stesso punto vengono raccolte insieme in un sacchetto, feci che non fanno parte dello stesso mucchietto vengono messe in sacchetti separati in cui vengono annotate le medesime caratteristiche descritte per le piume, e in più si segnala se gli escrementi si riferiscono allo stesso animale di cui erano state campionate delle piume.

Le medesime istruzioni sono state fornite agli agenti della Polizia Provinciale e del Corpo forestale che hanno contribuito alla raccolta dei campioni, qualora li trovassero nelle loro uscite.

3.2 ESTRAZIONE DEL DNA

3.2.1 Estrazione da feci

Al rientro dal campionamento si procede alla preparazione del campione per l'estrazione. Inizialmente, come mezzo di conservazione dei campioni fecali, utilizzavamo alcool (EtOH) al 90%. Dopo aver letto lo studio sulla lepre variabile del dottor Scandura (2008), abbiamo deciso di sostituire l'etanolo al tampone di lisi ASL utilizzato per l'estrazione (kit Qiagen). In provette falcon da 15 ml venivano aliquotati 2,4 ml di Buffer ASL e inseriti dai 190 ai 230 mg di campione fecale (corrispondente ad una pallina scarsa di feci di lepre e poco più di una singola fatta di pernice). Della pernice non va adoperata la parte bianca delle feci (deposito di urati) che tende a degradare il DNA. I campioni così preparati possono essere conservati in freezer a -20°C fino al momento dell'estrazione.

Per l'estrazione del DNA è stato impiegato il kit QIAamp Stool (Qiagen, 2010). La procedura di estrazione è stata eseguita secondo il protocollo «Isolation of DNA from Stool for Human DNA Analysis» del QIAamp DNA Stool Handbook. Tutto il procedimento è stato eseguito manualmente senza ricorrere all'automatizzazione con il QIAcube (Qiagen), in quanto dalle prime analisi avevamo notato che per campioni buoni il QIAcube facilita e velocizza la fase di estrazione, ma in caso di campioni degradati i risultati sono migliori se si esegue la procedura manualmente.

La fase di estrazione è delicata e va eseguita tenendo conto di diverse accortezze:

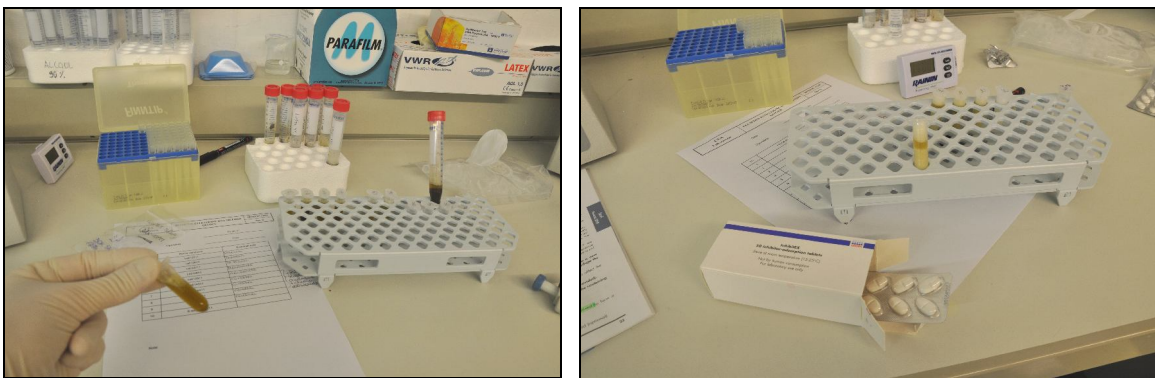
- è indispensabile cambiare i guanti frequentemente per non contaminare i campioni;
- a causa dei tempi abbastanza lunghi richiesti (circa 1 ora e mezza per la fase di estrazione completa) è necessario procedere con l'estrazione di un numero inferiore o uguale ai 9-11 campioni fecali per volta;
- nelle feci sono presenti delle sostanze che andrebbero ad inibire la reazione di amplificazione del DNA. Tra queste ci sono i glicolipidi di origine vegetale che potrebbero essere una delle principali cause di inibizione dell'amplificazione da

campioni di animali a dieta vegetariana come le lepri e le pernici nella fase adulta (Regnaut et al., 2006). Lo Stool Mini Kit della Qiagen suggerisce di adoperare le InhibitEX tablet, pastiglie composte da una matrice assorbente che assorbe le sostanze inibitrici e le fa precipitare in modo da rendere il DNA più puro e facilmente amplificabile.

A seguito delle prime prove di estrazione, sono inoltre state apportate alcune modifiche al protocollo consigliato dalla ditta Qiagen:

- prima della fase di digestione, viene aliquotato, con i 25µl di proteinasi K e 600 µl buffer AL, anche 1 µl di carrier RNA ad ogni campione, per facilitare l'adesione delle molecole di DNA alla membrana della colonnina;
- l'etanolo utilizzato a seguito della fase di digestione è puro (100%) e viene conservato in freezer (-20°C) da dove viene prelevato al momento dell'utilizzo;
- nella fase di eluizione, è stato aumentato il tempo di incubazione in Buffer AE da 1 minuto indicato nel manuale a 5 minuti come consigliato da Kovach (2003) e Litvaitis (2005);
- sono state eseguite 2 eluizioni consecutive ciascuna in un volume di 100 µl di buffer AE, anziché 1 eluizione in 200 µl.

Per ogni campione sono stati aliquotati circa 40 µl in provette da 0,2 ml conservate in frigorifero, il rimanente è stato conservato in congelatore a -20° C.



(a)

(b)

Fig.3.2.1. (a) allestimento bancone per estrazione da feci. (b) utilizzo pastiglie anti-inibitori.

3.2.2 Estrazione da piume

Le estrazioni da piuma sono state effettuate su un numero di 11 campioni per volta, ai quali è stato aggiunto il controllo negativo per verificare l'assenza di contaminazione.

Le piume appartenenti alla popolazione di pernici scelta, vengono selezionate per l'estrazione in base al tipo e alle condizioni.

Viene prelevato 1 cm della parte terminale del calamo, dove questo si attacca alla pelle dell'animale e viene inserito in una provetta numerata. Piumini di piccole dimensioni sono stati utilizzati interamente.

E' stato utilizzato il QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen, 2007), seguendo il protocollo "Nail Clippings & Hair" del QIAamp DNA Investigator Handbook con alcune modifiche per migliorare l'efficienza di estrazione.

Le modificazioni eseguite rispetto al protocollo standard sono state le seguenti:

- il tempo di digestione è stato prolungato da 1-2 ore consigliate a 12 ore (overnight) per incrementare la resa di estrazione.
- i campioni, sigillati nelle provette con il parafilm, sono stati posizionati in un rotatore all'interno di una stufa che manteneva la temperatura di 56°C;
- nella fase di aggiunta del Buffer AL al lisato, è stato aggiunto anche 1 µl di carrier RNA;
- è stato utilizzato etanolo puro (100%) prelevato dal congelatore al momento dell'utilizzo;
- il protocollo della Qiagen consigliava, come passaggio finale, di eluire il DNA in 20-50µl di buffer ATE. Questa dose di eluito non era sufficiente alle analisi, per cui è stata aumentata inizialmente a 70 µl (mediante 2 eluizioni da 35 µl), poi 40+40 µl. La quantità di materiale genetico così disponibile risultava ancora poca ma sufficiente alle analisi;
- la fase di incubazione con il Buffer ATE è stata aumentata da 1 minuto consigliato nel protocollo standard, a 5 minuti.

Tutto il procedimento è stato eseguito manualmente senza ricorrere all'automatizzazione con il QIAcube.

Per ogni campione sono stati aliquotati 35 µl in provette da 0,2 ml conservate in frigorifero. Il rimanente è stato conservato in congelatore a -20°C.

3.3 AMPLIFICAZIONI DEL DNA

Visti i buoni risultati ottenuti dal campionamento non invasivo per analisi genetiche in diversi studi (Segelbacher, 2002; Kovach et al. 2003; Regnaut et al., 2006; Hogan et al., 2007), è stato scelto di procedere con l'amplificazione del DNA nucleare e mitocondriale da campioni non invasivi di lepre bianca e pernice bianca.

3.3.1 Microsatelliti

3.3.1.1 Lepre bianca

Lo studio filogeografico, scopo di questo lavoro sulla lepre bianca, non avrebbe richiesto necessariamente l'amplificazione di loci microsatellite. Nonostante questo in un primo tempo è stato deciso di mettere a punto i protocolli di amplificazione per quattro loci microsatellite, nell'eventualità che poi fosse possibile, o fosse richiesto, uno studio più approfondito a livello popolazionistico. Ci si è basati per questa messa a punto, su un lavoro del dottor Scandura (2008). In questo studio vengono testati 14 loci, dei quali ne vengono selezionati 8 sulla base del potere discriminativo nella determinazione della specie e dei valori di P_{id} (probabilità di identità nella popolazione, ovvero la probabilità che due individui condividano lo stesso genotipo multilocus).

Questi primer erano già stati precedentemente utilizzati nel nostro laboratorio per un lavoro su *Lepus timidus* del quale si utilizzavano però campioni tessutali.

Con i campioni fecali raccolti nei campionamenti, la resa di estrazione del DNA era piuttosto bassa e alcuni loci hanno richiesto una messa a punto elaborata.

I primer scelti sono stati i seguenti: Sol08 (SurrIDGE et al., 1997) Sat08, Sat12 e Sat13 (Mougel et al., 1997) (Tab.3.3.1).

Tab.3.3.1 Descrizione dei quattro primer messi a punto in questo studio, per la genotipizzazione di *Lepus timidus*.

Nome del Primer	Sequenza Forward marcata	Sequenza Reverse	T _a
LtM_sat12	6FAM-CTTGAGTTTAAATTCGGGC	GTTTGGATGCTATCTCAGTCC	57,9
LtM_sat13	NED-CAGTTTTGAAGGACACCTGC	GCCTCTACCTTTGTGGGG	58,2
LtM_sat8	HEX-CAGACCCGGCAGTTGCAGAG	GGGAGAGAGGGATGGAGGTATG	64
LtM_sol8	NED-GGATTGGGCCCTTGTCTCACTTG	ATCGCGCCATATCTGAGAGAACTC	62,7

Tutte le PCR sono state eseguite su un volume di mix di reazione di 18 µl. E' sempre stata utilizzata la BSA (Bovine Serum Albumin, anche conosciuta come «Fraction V»), proteina dotata di capacità stabilizzanti nei confronti di molti enzimi implicati nella reazione di PCR.

Sat08, Sol08, Sat13

Il protocollo testato inizialmente è stato lo stesso per i loci Sat08, Sol08 e Sat13 (ad eccezione della temperatura specifica per ogni primer; vedi Tab. 3.3.2). Per questi primer è stata utilizzata la Taq HM:

Cicli	T°C	Buffer	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
40	varia	2	0,5	0,5	2	0,25	2

Per Sat08 gli unici cambiamenti al protocollo base sono stati: diminuzione della quantità di primer a 0,3 µl, diminuzione del tempo di annealing da 30" a 15" e della temperatura di allungamento da 72 a 68°C.

Anche il Sol08 ha presentato buona resa fin dalle prime prove con il protocollo standard.

Per Sat13 sono state diminuite le quantità di primer a 0,3 µl e di Taq da 0,25 a 0,2 µl; inoltre il tempo di allungamento è stato aumentato da 30" a 2'.

Sat12

Per l'amplificazione del locus Sat12 è stata invece utilizzata la Taq Polymed. Il protocollo iniziale ha subito parecchie modifiche:

Cicli	T°C	Buffer	MgCl2	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
45	50	2	0,6	0,5	0,35	2	0,2	1

I cicli sono stati portati a 40; la quantità di MgCl₂ che dava la miglior resa è stata 0,6 µl; il tempo di annealing è stato dimezzato da 30" a 15".

Tab.3.3.2. Riassunto dei protocolli (a) e dei programmi (b) di PCR utilizzati per l'amplificazione dei loci microsatellite della lepore bianca. Le quantità indicate sono espresse in µl.

Reagenti	Sat12	Sat13	Sat08	Sol08
H ₂ O	13,1	12,7	12,7	12,25
Buffer 10x	2	2	2	2
BSA 0,5mg/ml	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ (50mM)	0,6	0	0	0
Primer F 10pmol/µl	0,5	0,3	0,3	0,5
Primer R 10pmol/µl	0,5	0,3	0,3	0,5
dNTP 10mM	2	2	2	2
Taq 5U/µl	0,2	0,2	0,2	0,25
Mix per provetta	19	18	18	18
DNA	1	2	2	2

CICLI	40CICLI	45CICLI	35CICLI	40CICLI
T _a	50°C	55°C	58°C	56°C
PROGRAMMA	Lt_Sat2-12_POL	Lt_Sat13_HM	Lt_Sat8-Sol8_HM	Lt_Sat8-Sol8_HM

Lt_Sat12_POL			
94°C	3'		1 ciclo
94°C	15"	Rampe all'78%	40cicli
50°C	15"		
72°C	30"		
72°C	5'		1 ciclo
4°C	∞		
Lt_Sat13_HM			
94°C	3'		1 ciclo
94°C	15"	Rampe all'78%	45cicli
55°C	10"		
65°C	20"		
65°C	2'		1 ciclo
4°C	∞		
Lt_Sat8-Sol8_HM			
94°C	3'		1 ciclo
94°C	15"	Rampe all'78%	40cicli
58/56°C	15"		
68°C	30"		
65°C	10'		1 ciclo
4°C	∞		

a)

(b)

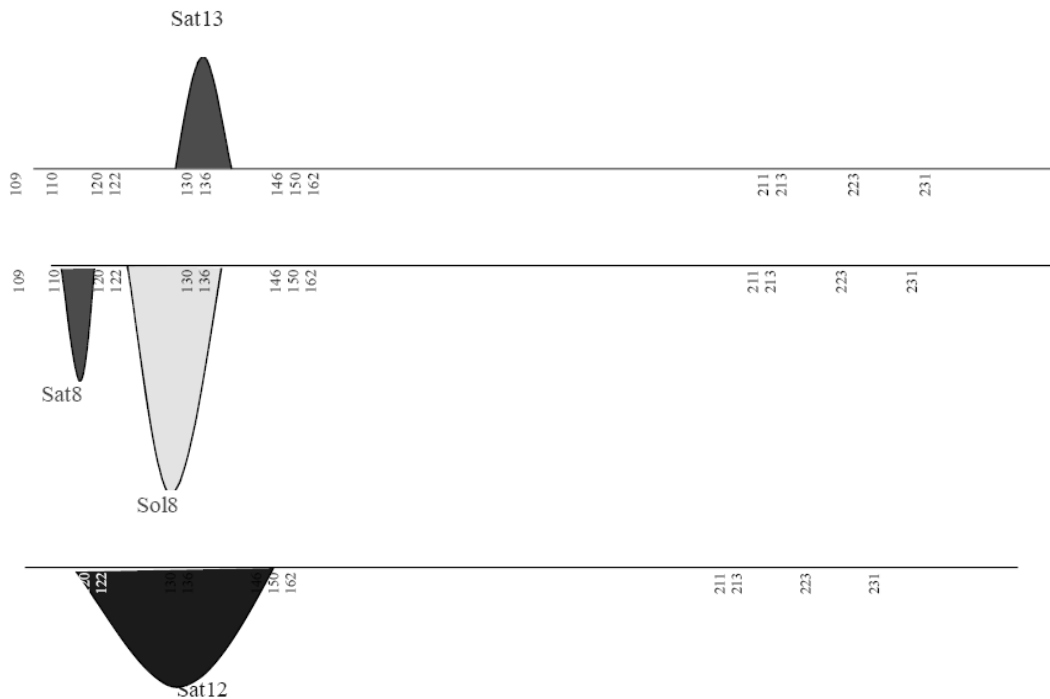


Fig. 3.3.1 Schema del range nel quale cadono i picchi dei loci microsatellite di lepore bianca.

3.3.1.2 Pernice bianca

La genotipizzazione degli individui di *Lagopus mutus* è avvenuta mediante amplificazione di 16 loci microsatellite.

I marcatori utilizzati sono quelli riportati in Tab.3.3.3. I primi dieci loci microsatellite tetranucleotidici disegnati da Piernet e Höglund (2001; BG10, BG12, BG15, BG16, BG18, BG19, BG20) e Segelbacher et al. (2000; TUT1, TUT2, TUT3), erano già stati utilizzati per la tipizzazione, sempre nell'ambito del progetto, di 158 soggetti cacciati durante le stagioni venatorie 1994-2003 .

Gli altri sei loci microsatellite, TUT4 sviluppato sul gallo cedrone (*Tetrao urogallus*; da Segelbacher et al. (2000), ADL142, ADL184, ADL230, ADL257 (Cheng & Crittenden, 1994) e LEI098 (Gibbs et al., 1997) sviluppati sul gallo domestico *Gallus gallus* e già testati sulla pernice da altri autori (Quintela et al., 2010), sono stati introdotti per cercare di aumentare il basso livello di differenziazione riscontrato tra soggetti appartenenti a differenti popolazioni.

Tab.3.3.3. Descrizione dei sedici primer utilizzati in questo studio per la genotipizzazione delle pernici bianche.

Nome del Primer	Sequenza Forward marcata	Sequenza Reverse	T _a
Tt_BG10	NED-ATGTTTCATGTCTTCTGGAATAG	ATTTGGTTAGTAACGCATAAGC	55
Tt_BG12	6FAM-TCTCCTTCTAAACCAGTCATTC	TAGTTTCCACAGAGCACATTG	55
Tt_BG15	VIC-AAATATGTTTGCTAGGGCTTAC	TACATTTTTCAATTGTGGACTTC	54
Tt_BG16	6FAM-GTCATTAGTGCTGTCTGTCTATCT	TGCTAGGTAGGGTAAAAATGG	54
Tt_BG18	PET-CCATAACTTAACCTTGCACTTTC	CTGATACAAAGATGCCTACAA	53
Tt_BG19	NED-CAAGGCGCAACATTAAGATTC	TGTATTTTGGAACTCTGTGTGC	59
Tt_BG20	6FAM-AAGCACTTACAA TGGTGAGGAC	TATGTTTTCTTTTCAGTGGTATG	57
Tt_TUT01	6FAM-GGTCTACATTTGGCTCTGACC	ATA TGGCATCCCA GCTATGG	60
Tt_TUT02	VIC-CCGTGTCAAGTTCTCCAAAC	TTCAAAGCTGTGTTTCA TTAGTTG	60
Tt_TUT03	PET-CAGGAGGCCTCAACTAATCAACC	CGATGCTGGACAGAAAGTGAC	60
Tt_TUT04	VIC-GAGCATCTCCAGAGTCAGC	TGTGAACCAAGCAATCTGAGC	60
Lm_ADL142	PET-CAGCCAATAGGGATAAAAAGC	CTGTAGATGCCAAGGAGTGC	62,5
Lm_ADL184	NED-GCCTCCTCACCCACAAAACC	TCAGTAACACCA CGAATGCC	63,6
Lm_ADL230	PET-GCCAAATAGTAATCCACTGC	TCGCTCTTGCCATTGTAAGT	62,4
Lm_ADL257	FAM-ATCTTTGAAACCTCACAAAAGC	TCTTCCAACCTATTTTTAGT	52,2
Lm_LEI98	PET-AAAAGACAATGCAATTGGTGC	CTGCACTGATGCTGTCACT	64,3

Dei primi dieci erano stati creati due pannelli di amplificazione (MULTIPLEX) messi a punto nello studio di M. Collini (2010, progetto Acesap) sulla base del tipo di fluorocromo associato al primer e del range dimensionale nel quale cadono

i picchi, e risultati molto utili nell'amplificazione da campioni tessutali (Fig.3.3.2).

Tutte le amplificazioni di loci microsatellite riportate di seguito sono state eseguite con la Taq Hot Master (5 Prime) a magnesio autoregolante.

Inizialmente sono state testate le due multiplex per i campioni non invasivi: la prima con i primer BG19, BG20, TUT1, TUT2, TUT3, la seconda con i primer BG10, BG12, BG15, BG16, BG18, su una mix di reazione di 18 µl. Di seguito i parametri principali del protocollo di amplificazione del pannello1 :

Cicli	T°C	Buffer	BSA	BG19	BG20	TUT1	TUT2	TUT3	dNTPs	Taq	DNA
35	56	2	0	0,08	0,1	0,08	0,13	0,2	2	0,25	2

e quelli del pannello 2:

Cicli	T°C	Buffer	BSA	BG10	BG12	BG15	BG16	BG18	dNTPs	Taq	DNA
35	56	2	0	0,08	0,1	0,1	0,08	0,1	2	0,25	2

In seguito alle prime prove effettuate su campioni da piuma, le quantità di primer sono state raddoppiate.

Pochi loci microsatellite hanno dato dei risultati positivi: BG20, TUT3 per il pannello 1, nessuno per il Panel2. Sono state condotte delle prove aumentando la quantità di DNA fino a 4 µl, che non hanno portato a miglioramenti rilevanti, per cui è stato deciso di procedere con le amplificazioni in singolo.

I protocolli di PCR sono stati ottimizzati per i marcatori singoli in una mix di reazione di 8-9 µl. Una volta ottenute le condizioni migliori in singolo sono state testate quattro piccole multiplex (sempre in una mix di 8-9 µl): BG19-BG20, BG10-BG12, BG15-BG16-BG18, TUT1-TUT2-TUT3. Questi protocolli sono stati messi a punto inizialmente su tessuto, quando il risultato era soddisfacente sono stati applicati ai campioni non invasivi e modificati a seconda dell'occorrenza per risultare ottimali anche per questi campioni. Le prime PCR di messa a punto erano costituite da 4 campioni da piuma (o feci), 1 da tessuto (che fungeva da controllo positivo) e il k-pcr (controllo negativo che accerta l'assenza di contaminazioni).

Nel caso di campioni provenienti da feci sono sempre stati aggiunti alla mix di reazione 0,5 µl di BSA.

Il riassunto delle dosi dei vari reagenti di PCR, delle temperature di annealing, del numero di cicli e i programmi utilizzati sono descritti nelle Tab.3.3.4a e 3.3.4b.

Multiplex BG19-BG20

Protocollo iniziale messo a punto su tessuto:

Cicli	T°C	Buffer	BSA	BG19	BG20	dNTPs	Taq	DNA
40	60	1	0	0,1	0,1	1	0,25	2

La resa ottimale per i campioni non invasivi è stata ottenuta aumentando i cicli fino a 50, raddoppiando la quantità di primer per il locus BG19 che aveva una resa inferiore rispetto al locus BG20 e riducendo ad 1 µl, dai 2 µl iniziali, la quantità di DNA dopo aver osservato che i picchi risultavano in tal modo più chiari e il rumore di fondo veniva attenuato .

Cicli	T°C	Buffer	BSA	BG19	BG20	dNTPs	Taq	DNA
50	60	1	0	0,3	0,2	1	0,25	1

Per campioni che davano problemi nell'amplificazione di questi loci, la quantità di DNA per la PCR è stata riportata a 2 µl.

Multiplex BG10-BG12

Protocollo iniziale messo a punto su tessuto:

Cicli	T°C	Buffer	BSA	BG10	BG12	dNTPs	Taq	DNA
35	46	1	0	0,3	0,3	1	0,25	1

La resa ottimale per i campioni non invasivi è stata ottenuta aumentando i cicli fino a 50. La prova di introduzione di 0,5 µl di BSA nella MIX di reazione non ha dato miglioramenti evidenti per i campioni provenienti da piuma, quindi è stata utilizzata unicamente per i campioni da feci. Sono state fatte diverse prove variando la quantità di DNA (1-2-3-4 µl) ma la resa ottimale è stata ottenuta con 1 µl (2 µl per i campioni da recuperare).

Multiplex TUT1-TUT2-TUT3

Protocollo iniziale messo a punto su tessuto:

Cicli	T°C	Buffer	BSA	TUT1	TUT2	TUT3	dNTPs	Taq	DNA
35	60	1	0	0,15	0,2	0,3	1	0,25	1

Questo protocollo non ha dato esiti soddisfacenti per i campioni non invasivi anche a seguito di varie modifiche (quantità dei primer, del DNA e numero cicli). Questa multiplex è stata perciò scartata ed eseguite le amplificazione singole.

Le prove condotte per ottenere i protocolli ottimali sono state simili per le amplificazioni con i tre primer, e mantenendo come protocollo di base quello della multiplex: i cicli sono stati aumentati dai 35-40 iniziali a 50, tutte hanno dato la resa migliore a 58°C con 0,3 µl di primer (sebbene inizialmente si fosse partiti da 0,3 µl per TUT1 e iTUT2, e 0,2 µl per TUT3).

Cicli	T°C	Buffer	BSA	TUT1/2/3	dNTPs	Taq	DNA
50	58	1	0	0,3	1	0,25	1

Multiplex BG15-BG16-BG18

La multiplex BG15-BG16-BG18 è stata considerata valida ed impiegata nelle amplificazioni dopo una serie di modificazioni al protocollo di base:

Cicli	T°C	Buffer	BSA	BG15	BG16	BG18	dNTPs	Taq	DNA
35	56	1	0	0,2	0,2	0,2	1	0,25	1

Aumento dei cicli fino a 50; aumento del primer a 0,25 µl per il locus BG18. Sono state fatte prove portando la quantità di DNA a 2 µl ma la resa ottimale è stata ottenuta con 1 µl che consentiva una visualizzazione dei picchi meno confusa dal rumore di fondo.

Cicli	T°C	Buffer	BSA	BG15	BG16	BG18	dNTPs	Taq	DNA
50	56	1	0	0,2	0,2	0,25	1	0,25	1

A causa della scarsa resa del BG18, sono state eseguite diverse amplificazioni in singolo di questi tre loci che hanno dato modo di ottimizzare ulteriormente i protocolli. Le prime amplificazioni in singolo sono state condotte utilizzando lo stesso protocollo per i tre primer: 40 cicli di PCR a 56°C con 0,5 µl di primer e 1,5µl di DNA. In seguito sono state apportate delle modifiche che hanno condotto al medesimo protocollo per i primer BG15 e BG16 riportato nella tabella sottostante. Questi primer sono sempre stati amplificati insieme mentre il protocollo di amplificazione in singolo per BG18 è stato impiegato ogni volta che la multiplex non dava un buon risultato per questo locus. Il protocollo finale

prevede 50 cicli di PCR, 0,2 µl di primer e 1 µl di DNA (2 µl solo nel caso di recuperi).

	Cicli	T°C	Buffer	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
BG15/16	50	56	1	0	0,3	1	0,25	2
BG18	50	56	1	0	0,2	1	0,25	1

Gli altri sei microsatelliti sono il TUT4, gli ADL e il LEI098 (Tab.3.3.4a). E' stato necessario procedere con una laboriosa messa a punto del protocollo di amplificazione per alcuni di questi marcatori.

TUT4

Il protocollo iniziale di amplificazione per il primer TUT4 prevedeva:

Cicli	T°C	Buffer	BSA	TUT4	dNTPs	Taq	DNA
40	58	1	0	0,3	1	0,25	1

I cicli di PCR sono stati aumentati a 45, è stata testata una prova di temperatura a 60°C ma i picchi erano meno chiari; per ridurre il numero e l'altezza degli extra-picchi le quantità di primer e di dNTPs sono state diminuite rispettivamente a 0,2 µl e 0,8 µl; infine è stata fatta una prova aumentando la quantità di DNA a 2µl per incrementare la resa, poi riportata a 1 µl a causa del rumore di fondo che si creava.

Cicli	T°C	Buffer	BSA	TUT4	dNTPs	Taq	DNA
45	58	1	0	0,2	0,8	0,25	1

ADL e LEI098

I protocolli iniziali per le amplificazioni dei loci ADL e il LEI098 sono stati tutti condotti a 30 cicli, con tre prove di temperatura attorno alla temperatura di annealing indicata per i primer: per ADL142 e ADL184 50-52-54°C; per ADL230 e ADL257 47-49-51°C, per LEI098 56-58-60°C.

Protocollo iniziale di amplificazione applicato ai 5 primer:

Cicli	T°C	Buffer	BSA	TUT4	dNTPs	Taq	DNA
30	varia	1	0	0,3	1	0,25	1

Per ADL142 il numero ottimale di cicli è pari a 45 con le seguenti modifiche al

protocollo standard: 54°C e 1,5 µl di DNA.

Per ADL184 i parametri ottimali per avere picchi alti e puliti sono risultati essere: temperatura di 56°C; 40 cicli; 1,5 µl di DNA.

Per ADL230 e LEI098 i cicli sono stati aumentati a 40, la temperatura che dava la resa migliore è stata a 51°C per ADL230 e 58°C per LEI098. Per l'ADL230 è stato modificato il programma, diminuendo il tempo di annealing da 20" a 10", al fine di eliminare bassi extra-picchi.

Una messa a punto più difficoltosa ha riguardato ADL257. Sono stati testati 30-35-40-45 cicli; 0,3-0,5 µl di primer, 1-1,5 µl DNA, il tutto con 2 Taq in base alle quali sono state fatte diverse prove di temperatura: con la Taq HM sono state testate le temperature 47-49-51-52°C tra le quali la migliore è risultata 49°C; con la Taq Polymed sono state testati 50-52-54°C con 0,2-0,3-0,4 µl di MgCl₂, la resa migliore è stata a 54°C con 0,3 µl di MgCl₂.

Dopo aver ottenuto le condizioni ottimali in singolo, sempre sulla base della temperatura di annealing, del tipo di marcatore e del range al quale cadevano i picchi, sono state testate su alcuni campioni particolarmente buoni, delle multiplex per questi marcatori: ADL142-ADL184-LEI98 e ADL230-ADL257. I risultati non sono stati soddisfacenti, per cui questi loci microsatellite sono stati in seguito sempre amplificati in singolo.

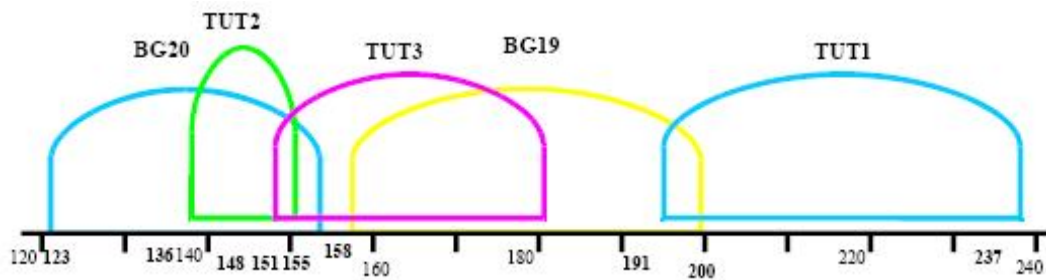
Utilizzando DNA da campioni non invasivi la possibilità di attribuire un falso genotipo ad un individuo è maggiore e richiede pertanto una verifica del risultato. Molti articoli descrivono metodi per quantificare gli errori di genotipizzazione per studi genetici non invasivi. La tecnica proposta consiste nell'effettuare almeno 2 ripetizioni in caso il campione risulti eterozigote per lo specifico locus, mentre almeno 4 ripetizioni in caso di omozigosi. Se si ottiene due volte lo stesso risultato per gli eterozigoti e 3 o 4 per gli omozigoti la genotipizzazione è considerata attendibile (Taberlet et al., 1996; Zhan et al., 2010).

Seguendo questi studi, abbiamo deciso di procedere ripetendo l'amplificazione 2 volte se il campione risultava eterozigote per quel locus, mentre solitamente 3 volte se risultava omozigote. Uguale risultato per le varie ripetizioni è stato interpretato come garanzia che il dato era attendibile, altrimenti sono state effettuate ripetizioni ulteriori, fino ad ottenere 2 risultati uguali e forti (picco alto e

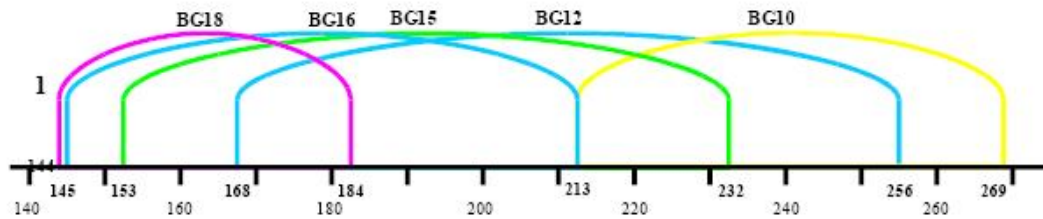
ben visibile) nel caso di eterozigosi, e 3 per l'omozigosi.

Visto l'abbondante lavoro di ripetizioni delle amplificazioni è stato deciso di scartare immediatamente i campioni per i quali, a seguito delle prime due ripetizioni, non si riusciva ad ottenere almeno il 60% dei marcatori. Solo per campioni ritenuti di particolare importanza per le indagini di una data popolazione si sono ripetute le amplificazioni anche nel caso di una resa inferiore.

PANEL1



PANEL_2_Tt



PANEL_3_Tt

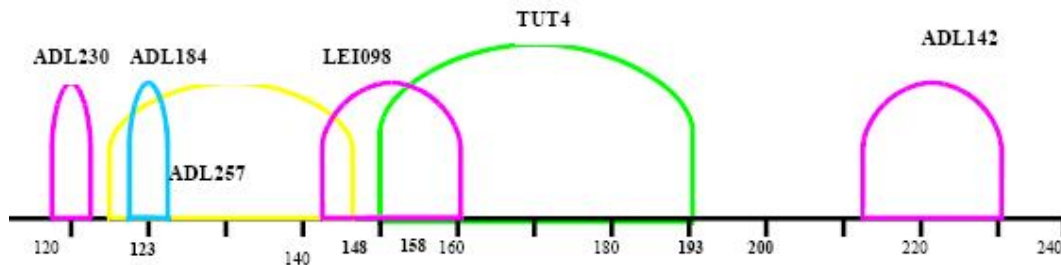


Fig. 3.3.2 Schema dei pannelli, con range nel quale cadono i picchi.

Tab. 3.3.4a. Protocolli utilizzati per l'amplificazione dei loci microsatellite. Le quantità indicate sono espresse in μ l.

Reagenti	BG19-BG20	BG10-BG12	BG15-BG16-BG18	TUT1	TUT2	TUT3	TUT4	ADL142	ADL184	ADL230	ADL257	LEI98
H2O	5,75	5,55	5,45	6,15	6,15	6,15	6,55	5,65	5,65	6,15	5,65	6,15
Buffer 10x	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Primer 1 10pmol/ μ l	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Primer 2 10pmol/ μ l	0,2	0,3	0,2									
Primer 3 10pmol/ μ l			0,25									
dNTP 10mM	1	1	1	1	1	1	0,8	1	1	1	1	1
Taq HM 5U/ μ l	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Mix per provetta	9	9	9	9	9	9	9	8,5	8,5	9	8,5	9
DNA	1	1	1	1	1	1	1	1,5	1,5	1	1,5	1
CICLI	50CICLI	45CICLI	45CICLI	45CICLI	45CICLI	45CICLI	45CICLI	45CICLI	45CICLI	45CICLI	45CICLI	40CICLI
T_a	60°C	56°C	56°C	58°C	58°C	58°C	58°C	54°C	54°C	51C	49°C	58°C
PROGRAM MA	Tt Panel1 HM	Tt Panel1 HM	Tt Panel1HM Rampa90	Tt Panel1HM 94-30sec	Tt Panel1HM 94-30sec	Tt Panel1HM 94-30sec	Tt Panel1HM 94-30sec	Lamu PANEL3 HM	Lamu PANEL3 HM	Lamu PANEL3 HM	Lamu PANEL3 HM	Lamu PANEL3 HM

Tab. 3.3.4b. Programmi di PCR utilizzati.

Tt_Panel1_HM			Tt_Panel1_HM			Tt_Panel1_HM_Rampa90			Tt_Panel1_HM_94-30sec			Lamu PANEL3 HM		
95	2'	Rampe all'80%	95	2'	Rampe all'80%	95	2'	Rampe al 90%	95	2'	Rampe all'80%	94	2'	Rampe all'80%
94	1'		94	1'		94	30"		94	30"				
60	30"		56	30"		56	30"		58	30"		varia	20"	
70	30"		70	30"		70	30"		70	45"		65	30"	
60	2'		60	2'		60	2'		60	10'		65	1'	
4	∞		4	∞		4	∞		4	∞		4	∞	

3.3.2 D-loop e sequenziamento

3.3.2.1 Lepre bianca

L'amplificazione della regione del D-loop è stata inizialmente effettuata con i primer mtLepusL e mtLepusH (Thulin et al., 1997) (Tab.3.3.5), che amplificano un frammento di 406 bp.

In seguito a difficoltà di amplificazione di questo frammento sono state testate altre tre coppie di primer disegnati presso il nostro laboratorio (Tab.3.3.5) che amplificavano frammenti più corti tra loro sovrapposti:

LtA_dloop_2F - LtA_dloop_178R;

LtA_dloop_38F - LtA_dloop_216R;

LtA_dloop_2F - LtA_dloop_216R.

Il numero che contraddistingue i nomi dei primer corrisponde alla posizione della loro sequenza nella regione del D-loop. La dimensione dei frammenti amplificati è di 176, 178 e 214bp rispettivamente.

Tab.3.3.5. Descrizione dei primer testati per l'amplificazione della regione del D-loop in *Lepus timidus*.

Nome del Primer	Sequenza	T _a
mt_Lepus_H	5'-GTTGCTGGTTTCACGGAGGTAG-3'	62
mt_Lepus_L	5'-TCCTACCATCAGCACCCAAAGC-3'	62
LtA_dloop_2F	5'-TTTCCTCCTAATAACAAAATCCAAG-3'	55,9
LtA_dloop_38F	5'-ATTGACAAAAATTCCCTTA-3'	49,1
LtA_dloop_178R	5'-TATGCATGGGGTAAGATTT-3'	53,2
LtA_dloop_216R	5'-ATGTGCTATGTCTGTAAAGC-3'	55,9

L'amplificazione è avvenuta mediante PCR, utilizzando la Taq Hot Master (HM, 5 Prime) su 18µl di mix di reazione.

Nella messa a punto del protocollo per i primer mtLepusH e mtLepusL sono state testate anche la Taq Polymed e la Taq Gold 360 (Applied Biosystem).

Di seguito il protocollo e le quantità di reagenti migliori per la Taq Polymed :

Cicli	T°C	Buffer	MgCl2	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
40	58	2	0,8	0,5	0,5	2	0,25	2

Per la Taq Gold è stato utilizzato un protocollo standard ma, vista la pessima resa anche per campioni buoni, non è stata fatta una vera messa a punto.

Cicli	T°C	Buffer	Enhancer	MgCl2	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
45	50	2	2	1,5	0,5	0,5	2	0,25	2

Il protocollo dal quale è stata ottenuta la resa migliore di amplificazione è stato quello standard per la Taq HM, che impiegava le dosi di reagenti indicate nella tabella sottostante.

Cicli	T°C	Buffer	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
40	60	2	0,5	0,5	2	0,25	2

Sebbene siano state fatte alcune modifiche per aumentare la resa, ad esempio sulla quantità di DNA, l'unica rilevante modifica è stata il dimezzamento della quantità di BSA (Tab.3.3.6). Per i campioni che davano difficoltà di resa sono state applicate delle condizioni estreme: 15µl di mix e 5 µl di DNA o 11 µl di mix e 9µl di DNA, entrambe con 0,35 µl di Taq.

Tab.3.3.6 Protocollo e programma di PCR utilizzati per l'amplificazione del D-loop con i primer mtLepusL e mtLepusH. Le quantità indicate sono espresse in µl.

Reagenti	mtLepus_L mtLepus_H
H2O	12,5
Buffer 10x	2
BSA 0,5mg/ml	0,25
Primer F 10pmol/µl	0,5
Primer R 10pmol/µl	0,5
dNTP 10mM	2
Taq HM 5U/µl	0,25
Mix per provetta	18
DNA	2

PROGRAMMA			
94°C	2'	Rampe al 100%	1 ciclo
94°C	20"		45 cicli
60°C	40"		
65°C	1'15"		
65°C	10'		
4°C	∞		1 ciclo

Sono stati inoltre messi a punto i protocolli di amplificazione dei frammenti corti (Tab.3.3.7). Le condizioni ideali corrispondono a quelle del protocollo standard applicato per le tre coppie di primer ad eccezione della modifica per LtA2F-LtA216R nella quale la quantità dei primer è stata aumentata da 1 µl a 1,2 µl e i cicli aumentati da 35 a 40.

Tab.3.3.7. Protocolli e programmi di PCR ottimizzati per i frammenti corti testati per il D-loop di *Lepus timidus*. Le quantità indicate sono espresse in μ l.

Reagenti	LtA_2F- LtA_178R	LtA_38F- LtA_216R	LtA_2F- LtA_216R
H ₂ O	11,75	11,75	11,35
Buffer 10x	2	2	2
BSA 0,5mg/ml	0	0	0
Primer 1 10pmol/ μ l	1	1	1,2
Primer 2 10pmol/ μ l	1	1	1,2
dNTP 10mM	2	2	2
Taq HM5U/ μ l	0,25	0,25	0,25
Mx per provetta	18	18	18
DNA	2	2	2

CICLI	35CICLI	35CICLI	40CICLI
T _a	53°C	50°C	51°C
PROGRAMMA	Lepre_MT HM	Lepre_MT HM	Lepre_MT HM_ta

Lepre_MT_HM		
94°C	2'	Rampe al 100%
94°C	30"	
53°C	10"	
65°C	45"	
65°C	10'	
4°C	∞	
Lepre_MT_HM_ta		
94°C	2'	Rampe al 100%
94°C	30"	
51°C	30"	
65°C	45"	
65°C	10'	
4°C	∞	

3.3.2.2 Pernice bianca

Anche per la pernice bianca è stata ricavata la sequenza del D-loop per tutti i campioni.

L'intera regione mitocondriale di controllo è stata sequenziata grazie a dei primer già impiegati in studi filogenetici sui Tetraonidi da Lucchini e Randi (1998): due primer esterni PHDH (5'-CAT CTT GGC ATC TTC AGT GCC-3') e PHDL (5'-AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC-3') accoppiati a due primer interni, PH-L400 (5'-ATT TAT TGA TCG TCC ACC TCA CG-3') e PH-H521 (5'-TTA TGT GCT TGA CCG AGG AAC CAG-3') che amplificano frammenti lunghi rispettivamente 840bp e 396bp.

I protocolli di amplificazioni di questi due frammenti, messi a punto in lavori precedenti in ambito del progetto, si sono dimostrati efficaci anche su piume e feci, con l'unica modifica dell'aumento dei cicli a 45. In tabella 3.3.8 sono riportate le mix di PCR e i programmi utilizzati.

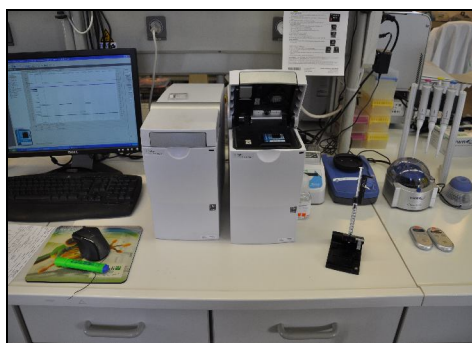
Tab.3.3.8 Protocollo e programma di PCR utilizzati per l'amplificazione del D-loop. Le quantità indicate sono espresse in μl .

Reagenti	Tt_PHDH - Tt_PHL400	Tt_PHDL - Tt_PHH521
H ₂ O	11,8	11,8
Buffer 10x	2	2
BSA 0,5mg/ml	0	0
Primer F 10pmol/ μl	1	1
Primer R 10pmol/ μl	1	1
dNTP 10mM	2	2
Taq HM 5U/ μl	0,2	0,2
Mix per provetta	18	18
DNA	2	2

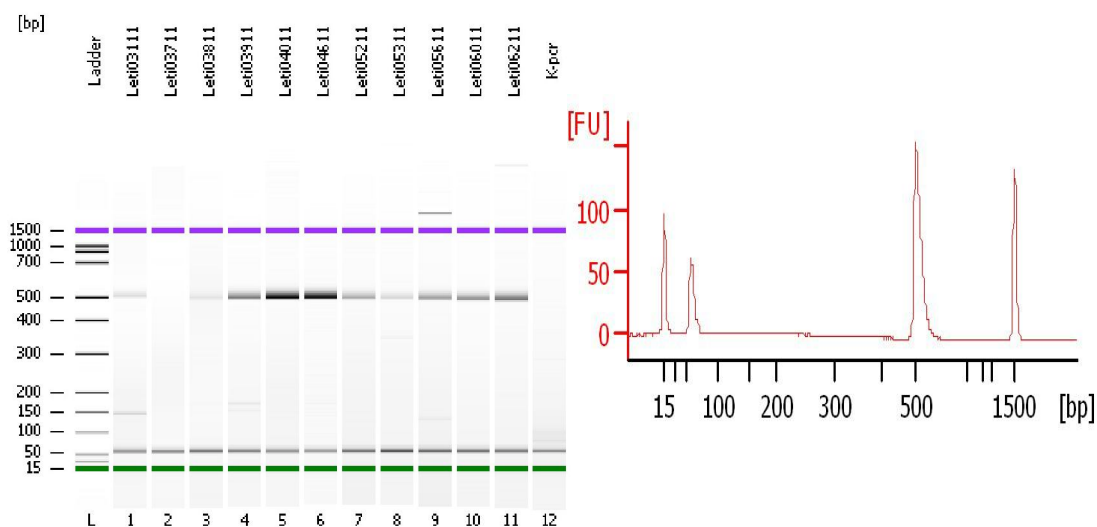
PROGRAMMA			
94°C	2'	Rampe all'100%	1 ciclo
94°C	30"		45 cicli
55/57°C	15"		
65°C	1'30"		
65°C	10'		
4°C	∞		1 ciclo

Per entrambe le specie la visualizzazione del successo di amplificazione del D-loop è stata ottenuta mediante elettroforesi su chip attraverso lo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer. Un chip composto da 12 pozzetti per i campioni, 3 per il gel (che in seguito a pressione verrà incanalato in micro canali che permetteranno la separazione elettroforetica) e uno per il ladder (lo standard necessario alla quantificazione e alla determinazione della lunghezza delle bande), viene allestito caricando 1 μl di amplificato per ogni pozzetto. Il risultato dell'elettroforesi viene visualizzato al computer sia come un gel tradizionale, a bande, sia come elettroferogramma (Fig.3.3.3).

La banda oltre che essere dimensionata in base alla posizione può anche essere quantificata in base alla sua intensità. I campioni la cui concentrazione, misurata dallo strumento, superava i 2 ng/ μl sono stati considerati sufficientemente buoni da essere portati in sequenza.



(a)



(b)

(c)

Fig.3.3.3. (a) Agilent 2100 Bioanalyzer. Esempio di visualizzazione dell'elettroresi su chip, mediante bande (b) ed elettroferogramma di un singolo campione (Leti 05011)(c).

I campioni positivi sono stati purificati con il kit exo-sap (USB Corporation – USA). La purificazione consiste in due fasi: nella prima l'enzima idrolitico Esonucleasi I (Exo) elimina i primer in eccesso e i frammenti di DNA estraneo; nella seconda l'enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) elimina i dNTPs in eccesso (Tab.3.3.9).

Tab.3.3.9. Protocollo e programma della reazione di purificazione Exo-sap

Reagenti	
H2O	3
Exosap	2
DNA	2

Programma		
37°C	15'	1ciclo
80°C	15'	
4°C	∞	

Il sequenziamento della regione del D-loop è stato effettuato, per entrambe le

specie, utilizzando i medesimi primer della reazione di PCR ma a diversa concentrazione (3,2 pmol/μl). Questi sono stati aggiunti alla mix di reazione di sequenza (Big- Dye Terminator Kit v.3.1; Applied Biosystems, Foster City, CA) e al purificato nelle dosi e con il programma indicato in tabella 3.3.10.

Tab.3.3.10. Protocollo e programma della reazione di sequenza.

Reagenti		Programma		
H ₂ O	1	96°C	1'	1 ciclo
Primer 1 3,2pmol/μl	1	96°C	10"	
BigDye	1	57°C	5"	
Sequencing Buffer	1	60°C	2'	
Mix per provetta	4	4°C	15'	
DNA (DNA+EXOSAP)	7			

Un'ultima fase di purificazione con Piastre Qiagen 96 well (Applied Biosystem) e Sephadex G50 (Sigma-Aldrich), è stata effettuata per eliminare l'eccesso di dNTPs e primer.

I frammenti di DNA così purificati vengono preparati per la corsa sul sequenziatore ABI 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), con capillare da 36cm (Applied Biosystem) e polimero POP07 (Performance Optimized Polymer, Applied Biosystem).

Le sequenze sono state controllate con il programma Sequencher 4.7 (Gene Codes corp.).

3.3.3 Sessaggio pernice bianca

Un elemento importante per comprendere meglio le dinamiche di popolazione è determinato dallo studio del sesso degli individui.

Negli uccelli la femmina è eterogametica (ZW), mentre il maschio è omogametico (ZZ).

Il sesso degli uccelli può essere identificato mediante un polimorfismo di lunghezza dell'introne CHD-1 (Chromo Helicase DNA binding protein 1), localizzato nei cromosomi Z e Y (Wang et al., 2007). Sono stati disegnati molti primer per usufruire di tale differenza di lunghezza dell'introne negli alleli Z e Y

(Jensen et al., 2003). In questa tesi, per la determinazione del sesso in *Lagopus mutus*, sono stati inizialmente utilizzati i primer P2 e P8 (Griffith et al., 1998) testati con successo sui tetraonidi da Caizergues (2003). La resa, ottima su campioni tessutali, non è stata altrettanto buona per campioni da piuma e fecali a causa della lunghezza del frammento (330bp).

In questo studio sono stati perciò messi a punto i protocolli per i primer Lamu1272H e Lamu1237L (Kahn et al., 1998), che amplificano un frammento più corto (225bp) precedentemente testati su 47 specie di uccelli di cui tre Galliformi da Jensen et al. (2003). Questi nuovi primer hanno permesso il sessaggio delle pernici bianche anche da campioni con DNA degradato (Tab.3.3.11).

Le condizioni ottimali sono state inizialmente ottenute su campioni provenienti da tessuto, poi applicate anche per campioni da piume e feci (Tab.3.3.12). Le problematiche da risolvere nell'amplificazione del frammento per il sessaggio erano legate alla scarsa qualità del DNA: le bande non erano chiare, venivano visualizzate parecchie extra-bande che compromettevano la comprensione del risultato al punto che, in alcuni casi, non era possibile distinguere i due sessi.

Tab.3.3.11. Primer utilizzati per il sessaggio della pernice bianca

Nome del Primer	Sequenza	T _a
Lamu_P8	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'	62,4
Lamu_P2	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	61,3
Lamu1272H	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'	55,8
Lamu1237L	5'-GAGAACTGTGCAAAACAG-3'	58,4

P2-P8

Per le amplificazioni con i primer P2 e P8, sono state testate le Taq HM, Polymed e Gold360 su una mix di 18µl.

L'amplificazione con la Taq HM secondo il protocollo standard riportato di seguito, non ha dato buoni risultati per campioni non invasivi.

Cicli	T°C	Buffer	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
40	57	2	0	0,5	2	0,25	2

Utilizzando la Taq Gold sono state testate differenti temperature (48-50-52°C) e

concentrazioni di MgCl₂, ottenendo la resa migliore, seppur bassa, applicando il protocollo riportato di seguito:

Cicli	T°C	Buffer	Enhancer	MgCl ₂	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
50	50	2	2	1,6	0	0,5	2	0,25	2

La resa migliore sia da tessuto che da campioni non invasivi è stata ottenuta utilizzando la Taq Polymed, partendo dal seguente protocollo standard eseguito, con 3 prove di temperatura e di MgCl₂, inizialmente su 18µl di mix, poi su 23µl di mix:

Cicli	T°C	Buffer	MgCl ₂	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
35	52-54-56	2	varia	0	1	2	0,2	2

Da questo sono state eseguite le seguenti modifiche: cicli aumentati a 40 e quantità di primer aumentata a 2,5µl. Il protocollo e il programma ottimali sono riportati in tabella 3.3.12a-b.

1272H – 1237L

I protocolli sono stati ottimizzati a partire da due tipi di Taq.

Inizialmente ci si è concentrati sulla messa a punto del protocollo con la Taq HM partendo dal seguente protocollo standard:

Cicli	T°C	Buffer	BSA	Primer	dNTPs	Taq	DNA
40	54	2	0	0,5	2	0,25	1

E' stata effettuata una prova di temperatura (50-52-54-56°C) da cui è emerso che la resa migliore si ottiene a 56°C, i cicli sono stati inizialmente abbassati a 35 (minor quantità di extra-bande), sono stati aggiunti 0,5µl di BSA (pulisce dalle extra-bande anche se diminuisce l'intensità delle bande del sesso) e la quantità di DNA aumentata a 2µl (Tab.3.3.12a). La resa è aumentata decisamente in seguito ad una modifica del programma di PCR: anziché 35 cicli a 56°C sono stati eseguiti 40 cicli con un gradiente ascendente di temperatura, aumentando la temperatura di annealing di 1°C (da 54 a 58°C) ogni 2 cicli e terminando con 30 cicli a 59°C (Tab.3.3.12c).

Un'ottima resa è stata ottenuta anche utilizzando la Taq Gold, impiegata per il recupero dei campioni più difficili. Partendo da un protocollo standard con 40

cicli, differenti temperature (50-52-54°C), 2µl di Buffer, dNTPs e Enhancer, diverse concentrazioni di MgCl₂, 0,5µl di primer, 0,25µl di Taq e 1µl di DNA, la resa migliore è stata ottenuta a 52°C, 50cicli di PCR, 1,6µl di MgCl₂ e 2µl di DNA.

Tab.3.3.12. Protocolli ottimizzati (a) e programmi (b-c) della reazione di PCR utilizzati per il sessaggio della pernice bianca.

(a)

Reagenti	P2 - P8	1272H – 1237L
H ₂ O	11,3	12,25
Buffer 10x	2	2
BSA 0,5mg/ml	0	0,5
MgCl ₂	2	0
Primer 1 10pmol/µl	2,5	0,5
Primer 2 10pmol/µl	2,5	0,5
dNTP 10mM	2	2
Taq 5U/µl	(Polymed) 0,2	(HM) 0,25
Mix per provetta	23	18
DNA	2	2
CICLI	40	incremento cicli
T°C	54°C	54°C

Programma Lam u Sessaggio New			
95	5'		1 ciclo
95	45"	Rampe 80%	45 cicli
54	45"		
72	1'		
72	7'	Rampa 100%	1 ciclo
4	∞		

(b)

Lam u sessaggio_TD (1272H – 1237L)			
94	1'30"	Rampa 100%	
94	30"	Rampa 90%	2cicli
54	1'		
65	1'10"		
94	30"	Rampa 90%	2cicli
55	1'		
65	1'10"		
94	30"	Rampa 90%	2cicli
56	1'		
65	1'10"		
94	30"	Rampa 90%	2cicli
57	1'		
65	1'10"		
94	30"	Rampa 90%	2cicli
58	1'		
65	1'10"		
94	30"	Rampa 90%	30cicli
59	1'		
65	1'10"		
54	1"	Rampa 90%	
65	2'	Rampa 100%	
4	∞		

(c)

4. ANALISI STATISTICHE

4.1 DNA mitocondriale

Tutte le sequenze sono state controllate e tagliate utilizzando il programma Sequencher 4.7 ed allineate usando il programma ClustalX 2.0.10 (Thompson et al., 1997).

Gli aplotipi sono stati determinati con il programma DNAsp 5.0 (Librado & Rozas, 2009).

Utilizzando l'approccio dell'Akaike information Criterion (AIC; Akaike, 1974) implementato nel software JmodelTest 0.1.1 (Posada & Crandall, 1998) è stato stimato il modello di evoluzione delle sostituzioni nucleotidiche che meglio spiegava i dati ottenuti dalle sequenze, secondo gli approcci dell'AIC e dell'AICc (una correzione dell'AIC per dati che presentano un rapporto tra numero di nucleotidi e di parametri inferiore a 40). L'analisi è stata avviata impostando 11 schemi di sostituzione nucleotidica (corrispondenti a 88 modelli) e includendo i siti invariabili e il tasso di variazione tra i siti. I modelli di evoluzione indicati permetteranno una ricostruzione più attendibile delle relazioni filogenetiche, nel momento della costruzione degli alberi.

Per *Lagopus mutus* le analisi sono state condotte sia per le sequenze corte (396bp) sia per le lunghe (forward e reverse, 1035bp), a livello bellunese, alpino e globale.

Per *Lepus timidus* l'analisi è stata condotta a livello di arco alpino.

Per ricostruire i rapporti filogenetici tra gli aplotipi sono stati costruiti gli alberi Neighbour Joining (NJ) utilizzando l'algoritmo implementato nel programma Phylip 3.69 (Felsenstein, 2009). Il dataset multiplo di pseudo-allineamenti è stato creato tramite il programma SeqBoot, il quale assume evoluzione indipendente dei siti. Tramite l'applicazione DNA dist sono state create 100 matrici di distanza utilizzando il modello Kimura 2 Parametri (tra i modelli proposti in Phylip è quello che sia avvicina maggiormente al modello individuato da JmodelTest). Utilizzando l'applicazione Neighbor sono stati costruiti 100 alberi tra i quali l'albero consenso è stato identificato utilizzando il programma Consense in

Phylip, impostando come tipo di consenso “Majority rule extended” perché permette di evidenziare anche i rami con valore di bootstrap inferiore al 50%.

Sono stati di seguito creati alberi filogenetici basati sul criterio della massima verosimiglianza, o Maximum Likelihood (ML, Felsenstein, 1981), utilizzando il programma PhyML, che presenta come albero consenso quello la cui probabilità, calcolata per moltiplicazione delle probabilità di ogni singola ramificazione, è la più grande (Felsenstein, 1981). L'analisi è stata impostata su 100 dataset multipli ed è stato selezionato HKY come modello di sostituzione nucleotidica.

La robustezza degli alberi NJ e ML è stata testata mediante 100 repliche di bootstrap. Questi valori percentuali, rappresentanti la bontà del rapporto filogenetico, sono indicati a ciascun nodo degli alberi creati.

Per *Lagopus mutus* sono stati costruiti alberi a partire dalle sequenze corte (396bp) e da quelle lunghe (1035bp). Per quelle corte è stato realizzato l'albero filogenetico a livello bellunese e alpino, tenendo conto della variabile gamma. Per le sequenze lunghe sono stati costruiti gli alberi delle popolazioni alpine e globali. Per le sequenze alpine da 1035bp sono state fatte due prove, una senza outgroup, l'altra ponendo come outgroup una sequenza di *Lagopus lagopus*.

Per *Lepus timidus* sono stati creati gli alberi filogenetici degli aplotipi alpini, ponendo come outgroup una sequenza di *Lepus europaeus*.

La relazione tra le sequenze è stata visualizzata mediante un network degli aplotipi utilizzando l'algoritmo Median-Joining Network (Bandelt et al., 1999) implementato nel programma Network 4.5.1.6. I network sono altamente informativi in quanto consentono di costruire rapporti filogenetici ad elevata risoluzione anche in presenza di bassa variabilità genetica e sono quindi utili per analisi intraspecifiche. I rami, rappresentanti le distanze tra gli aplotipi, hanno una lunghezza proporzionale al numero di mutazioni che separano gli aplotipi. I cerchi, che rappresentano gli aplotipi ed hanno una dimensione proporzionale alla loro frequenza, sono stati colorati in modo da rappresentare, in forma di diagrammi a torta, la distribuzione geografica degli aplotipi (ad ogni popolazione è stato attribuito un differente colore). In tal modo è immediata la comprensione di come gli aplotipi siano distribuiti tra le popolazioni ed è facile visualizzare la presenza di un eventuale pattern di tipo filogeografico.

Sono stati costruiti network per gli aplotipi di *Lagopus mutus* trovati in provincia

di Belluno, per gli aplotipi alpini e per quelli globali. E' stato costruito un network per gli aplotipi alpini di *Lepus timidus*.

Attraverso il programma Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005) è stato stimato il livello di variabilità genetica delle popolazioni di pernice bianca e lepre bianca, calcolando i seguenti indici di variabilità: il numero di aplotipi, il numero di siti polimorfici, l'haplotype diversity, la diversità nucleotidica, il numero medio di differenze a coppie. Con Arlequin è stata effettuata sia l'analisi degli aplotipi, sia un'analisi per popolazione. Sono stati inoltre ipotizzati, su base geografica e geomorfologica, dei raggruppamenti e poi testati con Arlequin per analizzarne il grado di differenziazione (per la pernice: 4 gruppi a livello globale ricavati dal network, 24 a livello di arco alpino in base ai gruppi montuosi, 2 gruppi a livello locale (destra e sinistra Adige) a seguito dei risultati ottenuti dalle analisi; per la lepre: 13 gruppi per l'arco alpino in base ai gruppi montuosi; confrontare con capitolo 5).

Tramite l'Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA, Excoffier et al., 1992) implementata in Arlequin, è stata analizzata la struttura genetica delle popolazioni. E' stato calcolato l'indice di differenziamento genetico F_{st} (Wright, 1951) e, tenendo in considerazione la distanza molecolare tra gli aplotipi è stato ricavato l'indice Φ_{st} che considera anche le informazioni di tipo molecolare. Questi indici sono stati calcolati tramite gli algoritmi di Weir e Cockerham (1984), testandone la significatività mediante 1000 permutazioni ed un livello di significatività del 5%. E' stata effettuata un'analisi F_{st} e Φ_{st} a coppie di popolazioni al fine di osservare tra quali di queste vi sia una differenziazione significativa.

Anche queste informazioni sono state raccolte a livello locale, di arco alpino e globale per *Lagopus mutus*, e unicamente per popolazioni alpine per *Lepus timidus*.

4.2 Microsatelliti

L'analisi con i microsatelliti è stata condotta unicamente per le popolazioni di *Lagopus mutus* campionate nel 2011 nel Bellunese e nel 2009-10-11 in alcune aree del Trentino.

La prima fase dell'analisi prevede di controllare la presenza di campioni doppi

dovuti alla raccolta di più campioni appartenenti allo stesso individuo durante il campionamento non invasivo. In presenza di campioni da tessuto, infatti, avvenendo il prelievo direttamente dall'animale non ci sono dubbi su chi sia l'individuo donatore, mentre con campioni fecali, peli e piume non è possibile sapere a chi appartenga il campione, se non per supposizioni fatte in base alla posizione del campione stesso.

Il programma Toolkit (Park, 2001), utilizzato per i galliformi da Hoglund (2010), permette di individuare la presenza di campioni dello stesso individuo.

Le analisi sui loci microsatellite possono essere eseguite a patto che questi siano neutrali, indipendenti ed esenti da errori di genotipizzazione che condizionerebbero le successive analisi. Gli errori di genotipizzazione più frequenti sono il dropout allelico (se sono presenti alleli di grandi dimensioni, questi possono essere amplificati meno efficacemente degli alleli di dimensioni inferiori, con la possibilità che si amplifichi un solo allele su due causando una sovrastima del grado di omozigoti del campione), la presenza di alleli nulli (sottostima del numero di eterozigoti che non vengono amplificati a causa di una mutazione sulla regione di appaiamento dei primer) e stuttering (visualizzazione di picchi supplementari formati per slippage durante l'amplificazione o dovuti ad artefatti tecnici). In campioni la cui tipizzazione abbia risentito di questo tipo di errori si registra solitamente un deficit di eterozigoti da non confondere con quello derivato da fenomeni genetici quali l'imbreding, l'accoppiamento assortativo e l'effetto Wahlund.

Utilizzando il programma MicroCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) sono stati testati i loci microsatellite per identificare la presenza di questo tipo di errori. Sono state eseguite 1000 permutazioni e applicato un intervallo di confidenza del 95%.

Il programma Convert 1.3 (Glaubitz, 2004) è stato utilizzato per creare i file di input per i diversi software utilizzati per le analisi.

Utilizzando i programmi FSTAT 2.9.3.2 (Goudet et al., 2001) e Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005) sono stati calcolati gli indici di diversità per studiare la variabilità genetica a livello di singolo locus e di popolazione.

Con FSTAT 2.9.3.2 sono state quantificate le frequenze alleliche e genotipiche, il numero di alleli, l'Allelic Richness (standardizzazione per popolazioni con

differente numero di individui, che corregge il numero di aplotipi per la dimensione della popolazione di riferimento (El Mousadik & Petit, 1996), e la Gene Diversity.

L'equilibrio di Hardy-Weimberg (Guo & Thompson, 1992) per i loci microsatellite è stato testato mediante il software Arlequin, impostando 100000 step nella catena di Markov e 10000 step di dememorizzazione (proporzione di permutazioni eliminate dall'analisi per garantire l'indipendenza della simulazione). Sono stati confrontati i valori di eterozigosità osservata ed attesa valutando la significatività dello scostamento dall'equilibrio sulla base dei p-value o, dove questo non era stato riportato, sulla base dello Z-test.

Lo scostamento dall'equilibrio di Hardy-Weimberg può essere dovuto ad accoppiamento non casuale nella popolazione. Pertanto il programma FSTAT è stato utilizzato anche per calcolare il coefficiente di $n F_{IS}$, impostando 1200 randomizzazioni ed un livello nominale per test multipli del 5%.

FSTAT e Arlequin sono stati utilizzati per testare l'indipendenza dei loci microsatellite, indagando la presenza di Linkage Disequilibrium (LD). L'assenza di linkage indica che non c'è legame fisico nella coppia di loci testata. FSTAT espleta questa funzione per ogni coppia di loci a livello di singolo campione e globale. L'analisi si basa su 7200 permutazioni con p-value al 5%, e prevede la correzione di Bonferroni (Zar, 1999). E' stato applicato a due set di dati, il primo comprendente tutte le popolazioni, per il secondo sono state escluse le due popolazioni con dimensione del campione troppo bassa: Monte Piana e Campinello. Arlequin calcola il valore di probabilità di LD sulla base di 10000 permutazioni con p-value al 5%.

Tramite AMOVA è stata indagata la presenza di struttura nelle popolazioni, tramite 1000 permutazioni ed un approccio "locus by locus" che esegue analisi separate per ogni singolo locus. Quest'analisi ha fornito gli indici F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) e R_{ST} (Slatking, 1995). Il primo misura la varianza genetica entro le sotto-popolazioni, il secondo è una variante della classica statistica F_{ST} che tiene conto anche della dimensione allelica e della frequenza degli alleli nelle popolazioni. Questi indici sono stati calcolati sia per tutti i campioni ricavandone un valore totale, sia dividendoli nelle popolazioni di provenienza ricavandone una matrice di distanze per coppie di popolazioni con la quale è stato testato il grado

di divergenza genetica tra le popolazioni. La significatività degli indici di differenziamento genetico si è basata su una soglia di p-value del 5%.

Le rappresentazioni grafiche 2D e 3D delle distanze geniche tra gli individui sono state ottenute mediante l'analisi multifattoriale delle corrispondenze implementata in GENETIX 4.052.2 (Belkhir et al., 1999). Gli individui vengono visualizzati come una nuvola di punti di diverso colore in base alla popolazione a cui appartengono, entro un grafico a due o tre assi cartesiani corrispondenti alle combinazioni lineari delle misure primarie (distanze genetiche e corrispondenze tra queste) che meglio spiegano la variabilità tra individui.

Per individuare la struttura di popolazione più compatibile con i nostri dati è stato utilizzato l'algoritmo di raggruppamento bayesiano implementato in STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al., 2000). Questo programma permette di definire il numero di cluster (K) più probabile entro cui raggruppare i nostri individui. La probabilità a posteriori del numero di popolazioni che meglio si adatta ai dati è stata calcolata utilizzando il modello di mescolamento, che prevede per gli individui la possibilità d'avere antenati comuni, e il modello delle frequenze alleliche correlate (Falush et al., 2003), che prevede che le frequenze alleliche nelle diverse popolazioni possano essere simili, ad esempio a causa della migrazione o di antenati condivisi. Sono state eseguite due corse: una prima esplorativa con burn-in pari a 25000 e 100000 iterazioni, impostando 1-16 come intervallo di possibili valori di K, ed una seconda aumentando il burn-in e le iterazioni di dieci volte, in un intervallo di valori che comprende i K indicati come più probabili dalla prima corsa (K da 1 a 6). Il numero K di popolazioni stimate, che meglio rappresenta la struttura dei nostri dati, è quello per il quale il valore del logaritmo della probabilità dei dati ($\ln \Pr(X/K)$) raggiunge il plateau.

5. RISULTATI

5.1. CAMPIONI

Lepre bianca

I campioni bellunesi di lepre bianca sono stati confrontati con quelli alpini.

Sono state utilizzate 206 sequenze fornite da studi precedenti all'interno del progetto FAUNAGEN (2008) e provenienti dalle Alpi centro occidentali nelle località comprese tra la provincia di Cuneo e il Trentino Alto Adige (Tab.5.1.1).

Sono state selezionate 12 aree per il Bellunese, 5 aree per la provincia di Trento (Parco Nazionale dello Stelvio, Valli Giudicarie, Trento, Val di Non, Valli di Fiemme e Fassa); 2 per la provincia di Bolzano (Bolzano occidentale e orientale); 1 per le Alpi piemontesi (Torino); 2 per le Alpi lombarde (Sondrio e Val Brembana); 1 per la Val d'Aosta.

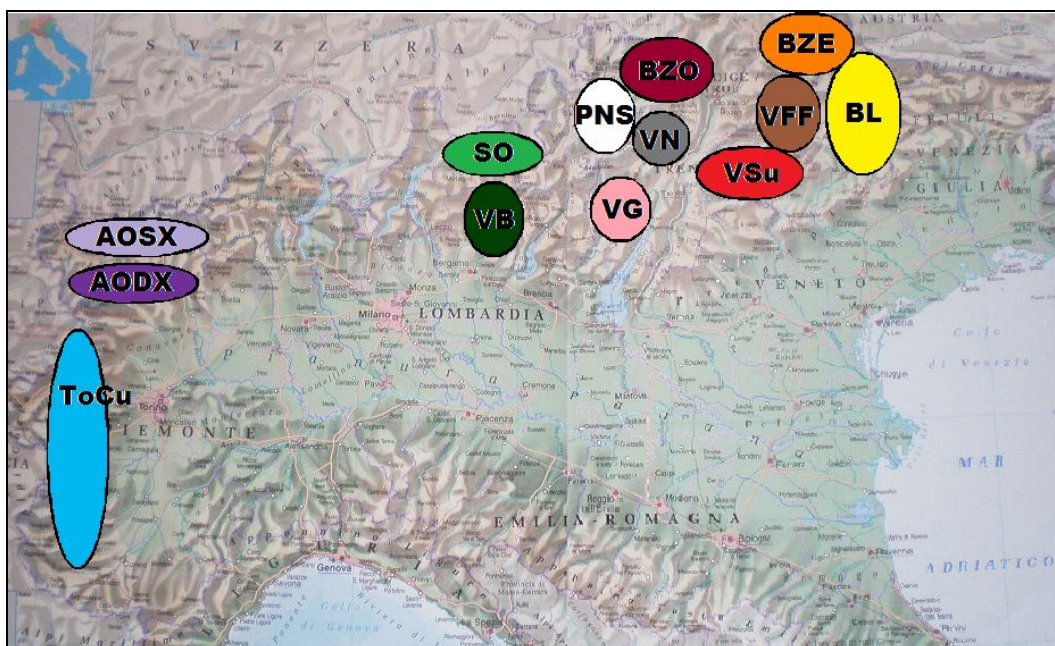


Fig.5.1.1 Aree di provenienza dei campioni di lepre bianca sull'arco alpino.

Tab.5.1.1 Aree di provenienza e numerosità dei campioni di lepre bianca sull'arco alpino.

Regione	Località	Sigla	Numerosità campione
Trentino Alto Adige	Valli Fiemme/Fassa	VFF	21
	Val Sugana	VSu	9
	Val di Non	VN	7
	Valli Giudicarie	VG	16
	P.N. Stelvio	PNS	35
	Bolzano Est	BZE	7
	Bolzano Ovest	BZO	16
Val d'Aosta	Aosta Est	AODX	34
	Aosta Ovest	AOSX	15
Lombardia	Sondrio	SO	30
	Val Brembana	VB	5
Piemonte	Torino-Cuneo	TO-CN	11
Veneto	Belluno	BL	38

Pernice bianca

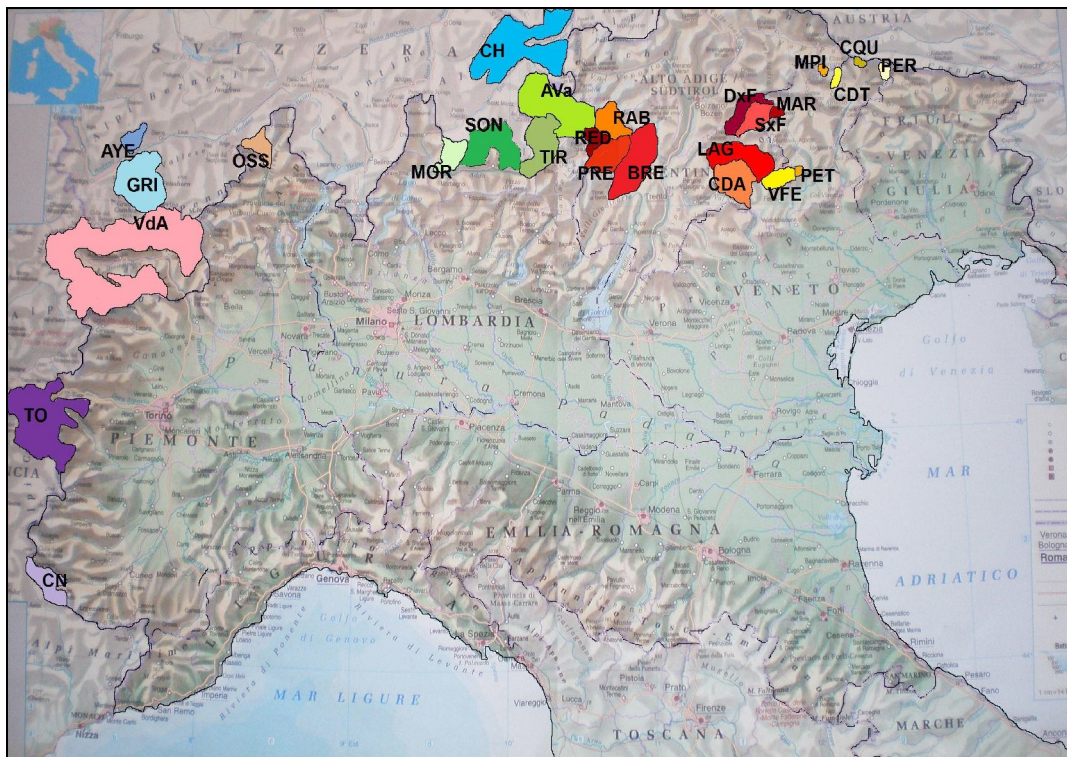


Fig.5.1.2. Aree di provenienza dei campioni di pernice bianca sull'arco alpino.

Rifacendoci a due studi sui galliformi alpini interni al progetto ACESAP (Covi, 2011; Collini, 2010) e aggiungendo i siti dei campionamenti 2011 effettuati per questa tesi, sono state selezionate 3 aree per le Alpi piemontesi, 1 per la Val d'Aosta, 4 per le Alpi lombarde, 1 area per le Alpi Svizzere, 7 per il Bellunese e 8 per il Trentino, per un totale di 24 popolazioni. I campioni trentini derivano in

parte da questo studio (Campinello, Cima d'Asta, Grosté, Marmolada), in parte dallo studio di Collini (Brenta, Destra e Sinistra Fassa, Lagorai, Presanella, Rabbi-Redival e altri campioni di Cima d'Asta; 2010). Queste popolazioni si riferiscono ad unità geografico-orografiche individuate sulla base dei gruppi montuosi.

Tab.5.1.2. Aree di provenienza dei campioni di pernice bianca sull'arco alpino. La numerosità del campione riportata si riferisce ai campioni raccolti.

Regione	Località	Numerosità campione
Lombardia	Alta Valle	29
	Morbegno	8
	Sondrio	37
	Tirano	18
Piemonte	Cuneo	5
	Ossola	2
	Torino	22
Trentino Alto Adige	Brenta-Grosté	49
	Cima d'Asta	43
	Destra Fassa	8
	Campinello	7
	Marmolada	33
	Presanella	7
	Redival-Rabbi	9
Sinistra Fassa	5	
Val d'Aosta	Val d'Aosta	13
Veneto	Cadin dei Toci	105
	Col Quatemà	3
	Cortina	2
	Monte Piana	9
	Peralba	104
	Piani Eterni	19
	Vette Feltrine	79
Svizzera	Ayent-Grimentz	18

Le sequenze per le analisi a livello globale sono state ottenute da GenBank e la loro lunghezza è stata ridotta a 1035bp. Sono state scelte in modo tale da coprire tutto l'areale distributivo di *Lagopus mutus*. Le sequenze scelte rispondono ai seguenti codici di accesso (Fig. 2.1.2):

- AF184281, AF184294 ÷ AF18430 : Holder et al., 1999; Regione del Bering, Alaska e Isole Aleutine; 13 aplotipi (verde);
- AB006673: Baba et al.; *Lagopus muta japonica*; Giappone; 1 aplotipo (nero);
- AF532445 ÷ 532449: Drovetski, 2002; Alaska e Siberia, 5 aplotipi (rosso);
- EU861049 ÷ EU861051: Bech et al., 2009; *Lagopus muta pyrenaica*; Pirenei

francesi; 3alpotipi (giallo);

- FJ746621÷FJ746635: Sahlman et al., 2009; *Lagopus muta*, Scandinavia, Islanda, Groenlandia, Isole di Svalbard e Taimyr; 15 aplotipi (blu).

Dal database di GeneBank è stata inoltre scaricata anche la sequenza di *Lagopus lagopus* (FJ746620.1) che è servita come outgroup per gli alberi filogenetici (Collini, 2010).

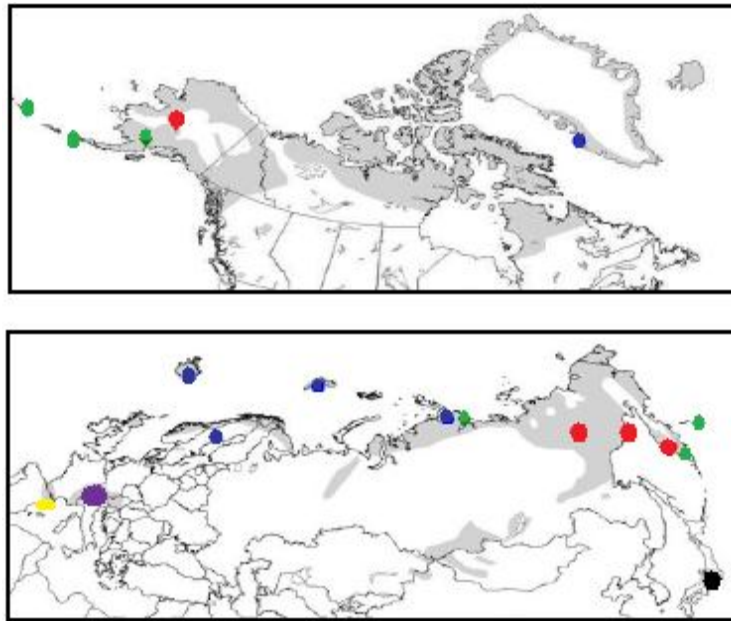


Fig.5.1.3. Provenienza delle sequenze scaricate da Gene Bank (Collini, 2010).

5.2. LEPRE BIANCA

5.2.1. Campionamento non invasivo

L'attività di campo in provincia di Belluno ha permesso di ottenere campioni fecali in 27 uscite su 38 (71%). Durante questi campionamenti sono stati raccolti da 1 a 37 campioni, a seconda dei siti e della stagione.

E' stato estratto il DNA da 118 campioni fecali di lepre bianca provenienti da 22 località distribuite nella provincia di Belluno (Tab.5.2.1).

Il 53% dei campioni ha dato esito positivo nell'amplificazione del frammento del D-loop. Di questi solo 50 sono stati portati in sequenza (il 42% sul totale degli estratti), perché 13, pur essendo stati amplificati correttamente, hanno ottenuto una banda debole in elettroforesi ($<1,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$), che corrisponde ad una resa di amplificazione del DNA insufficiente per essere sequenziata (Tab.5.2.1).

Ci sono state popolazioni, in particolare quelle del monte Giralba e della Val d'Oten, che pur presentando un elevato numero di campioni (18 per entrambe) apparentemente in buono stato di conservazione, hanno dato una pessima resa di amplificazione (0-16%), abbassando la percentuale di resa positiva di amplificazione del D-loop.

Oltre ai campioni fecali, è stato estratto il DNA da 4 campioni di tessuto. Un'estrazione ha dato esito negativo (campione di Falcade), gli altri 3 campioni (75%) sono stati amplificati con successo e portati in sequenza (Tab.5.2.1).

Tab.5.2.1 Risultati: i numeri in grassetto corrispondono alle sequenze appartenenti a lepre bruna.

Sito	Campionati	Estratti	Positivi	In sequenza
Val d'Oten	21	18	10	3
Pelmo	27	6	3	3
Dolada	23	7	3	3
m.Zovo	7	7	3	2
m.Piana	37	25	19	19
Col Quaternà	8	8	3	1
Marmarole	9	5	5	5
Marmolada	5	4	4	4
Cadin dei Toci	2	1	0	0
Cadin della Neve	1	0	0	0
Croda da Lago	3	3	3	3
Giralba	34	18	1	0
Popera	2	2	2	2
Antelao	18	12	5	4
Cimonega	1	0	0	0
Peralba	1	1	1	0
Talvena	1	1	1	1
TOTALE	200	118	63	50
OK			53%	42%
Mondeval	2	0	0	0
Falcade	2	1	0	0
Peralba	2	1	1	1
Framont	2	1	1	1
Civetta	1	1	1	1
TOTALE	9	4	3	3
OK			75%	75%

Il successo di resa di amplificazione da campioni fecali è stato considerato alto anche per le analisi con i microsatelliti, sebbene le amplificazioni siano state eseguite solo su 3 campioni fecali per le messe a punto dei protocolli. Sono stati testati 4 loci microsatellite, 3 dei quali hanno dato già dalle prime amplificazioni un esito positivo (3 campioni fecali su 3 hanno presentato picchi fuori scala ma chiari), il Sat08 ha presentato un'iniziale resa inferiore (inizialmente 2 positivi sui 3 campioni di prova) poi migliorata con la messa a punto. Le percentuali di resa positiva di amplificazione con i microsatelliti non hanno valore statistico per l'esiguo numero di campioni testati e sono perciò da riconfermare applicando tali protocolli ad un numero maggiore di campioni.

Per questa specie sono state effettuate unicamente le analisi per il DNA mitocondriale (mtDNA).

Dall'analisi del D-loop sono state ricavate 45 sequenze da 406 bp, senza ambiguità. 7 di queste sono state assegnate, dopo confronto con il database di GenBank disponibile in rete, alla specie *Lepus europaeus*.

5.2.2 Polimorfismo

Le 38 sequenze bellunesi di *Lepus timidus varronis* individuano la presenza di soli due aplotipi, uno diffuso nella provincia di Belluno (HLt10), l'altro isolato alla località Croda da Lago (HLt13; Fig.5.2.1).

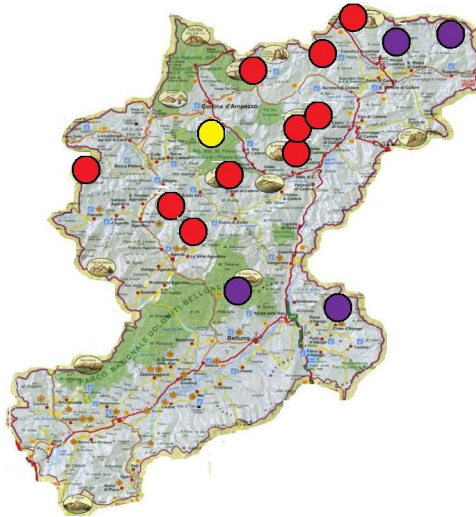


Fig.5.2.1. Distribuzione degli aplotipi in provincia di Belluno. In viola gli aplotipi di *Lepus europaeus*; gli aplotipi trovati nei campioni bellunesi per questa tesi sono indicati in rosso (HLt10) e in giallo (HLt13).

Le sequenze bellunesi sono state confrontate con le alpine, le quali individuano 42 aplotipi (HLt01-HLt27, HLt29-HLt43) definiti da 67 siti polimorfici di cui 58 transizioni, 6 transversioni, per un totale di 64 sostituzioni e 4 indel.

Le sequenze bellunesi non hanno fornito nuovi aplotipi: l'aplotipo bellunese dominante corrisponde all'aplotipo HLt10, l'altro a HLt13.

Il migliore modello di evoluzione delle sostituzioni nucleotidiche per le sequenze comprese nel nostro database è risultato TrN+G, secondo il criterio AICc.

5.2.3 Filogeografia e struttura

L'analisi della variabilità tra ed entro le popolazioni (71% e 29% rispettivamente, Tab.5.2.4) indica che le popolazioni di lepre bianca sono fortemente differenziate

tra loro, dato confermato dagli indici F_{st} e Φ_{st} che riportano valori altamente significativi ($F_{st}=\Phi_{st}=0,71$, $p=0,00$).

Tab.5.2.4. AMOVA: analisi della variazione tra le 13 popolazioni.

Sorgente	% variazione	
Tra popolazioni	70,58	70,58
Entro popolazioni	29,42	29,42
Indice di fissazione	$F_{st}=0,71$	$\Phi_{st}=0,71$

Dall'analisi dei confronti a coppie tra le 13 popolazioni, il 96% dei confronti a coppie presenta un'elevata significatività ($p<0.05$) (74% dei confronti a coppie significativi per il Φ_{st} , Tab.5.2.5). Si nota una stretta corrispondenza tra valori non significativi e vicinanza geografica, ad eccezione del confronto non significativo AOSX-BZO.

Tab.5.2.5. Calcolo del Φ_{st} nel confronto a coppie tra le 13 popolazione, mediante analisi AMOVA.

	VFF	VSu	VN	VG	SO	VB	AODX	AOSX	BZE	BZO	ToCn	PNS	BL
VFF													
VSu	-0.094												
VN	0.999	0.999											
VG	0.999	0.999	0.010										
SO	0.999	0.999	0.271	0.464									
VB	0.999	0.999	0.793	0.939	0.091								
AODX	0.887	0.865	0.326	0.427	0.569	-0.122							
AOSX	0.999	0.999	0.846	0.948	-0.092	0.498	0.010						
BZE	-0.001	-0.081	0.999	0.999	0.999	0.999	0.904	0.999					
BZO	0.999	0.999	0.209	0.454	0.032	0.235	0.341	0.103	0.999				
ToCn	0.987	0.999	0.516	0.662	0.646	-0.006	0.111	0.264	0.984	0.496			
PNS	0.999	0.999	0.193	0.422	0.069	0.389	0.232	0.286	0.999	0.010	0.586		
BL	0.010	-0.229	1.000	1.000	0.999	1.000	0.954	1.000	0.387	0.999	0.995	0.999	

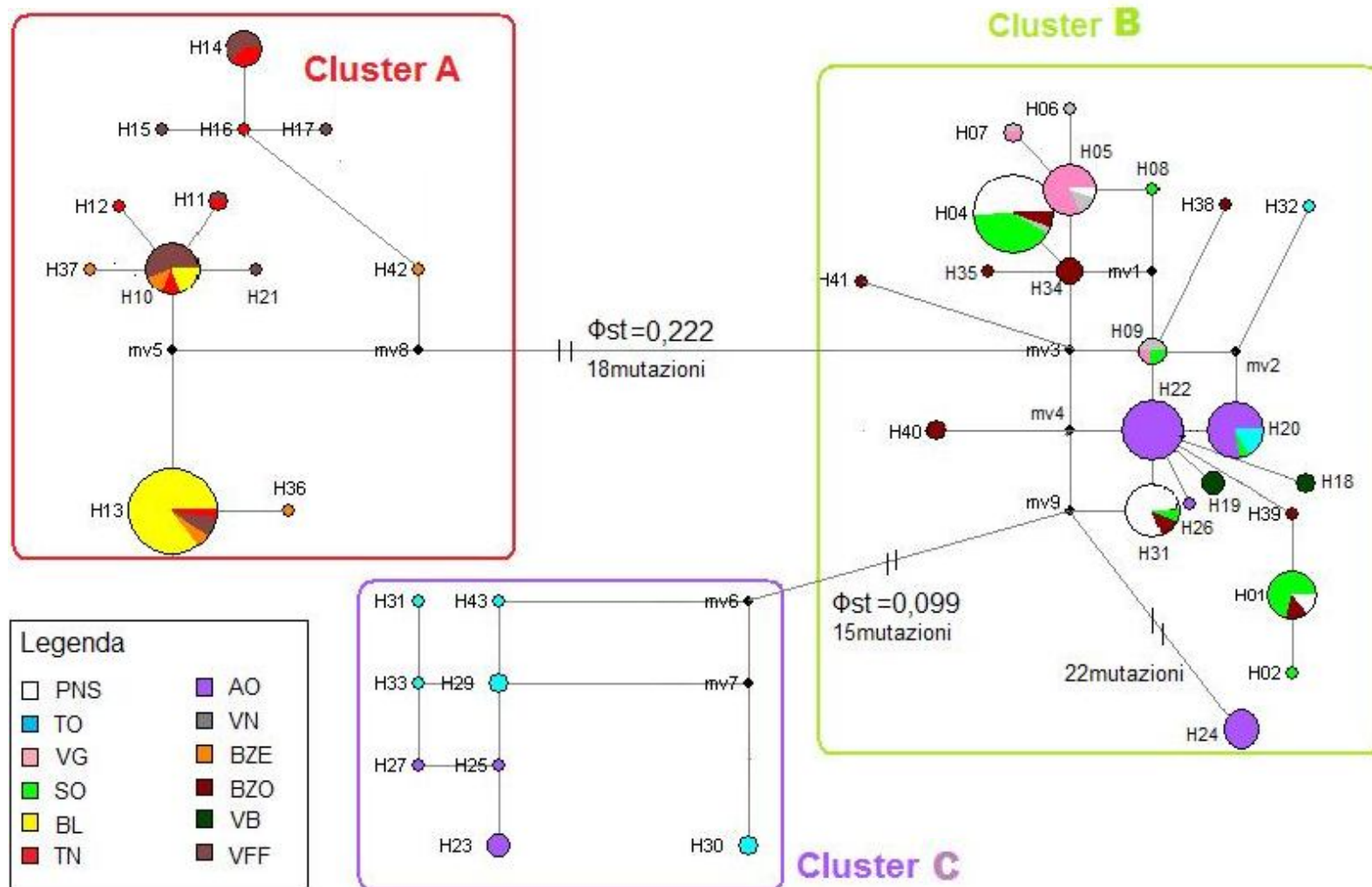


Fig..5.2.2 Network degli aplotipi alpini di lepre bianca.

Il Network descrive una distribuzione degli aplotipi fortemente legata all'origine geografica (Fig.5.2.2). Si riscontrano, infatti, 3 cluster principali:

- Cluster A: popolazioni bellunesi, del Trentino orientale e dell'Alto Adige orientale.
- Cluster B: maggiormente esteso geograficamente, comprende popolazioni del settore occidentale del Trentino Alto Adige, la Lombardia, il Piemonte e la Val d'Aosta.
- Cluster C: popolazioni piemontesi e valdostane.

Gli aplotipi della Val d'Aosta orientale ricadono nel cluster B, quelli della Val d'Aosta occidentale nel cluster C, ad eccezione di due aplotipi che rientrano nel B. Il cluster A si differenzia dal B per 18 mutazioni. Lo stesso numero di mutazioni separano il B dal C, mentre all'interno del cluster B l'aplotipo solitario HLt24 si differenzia per 22 mutazioni dal resto del gruppo.

Non si riscontra la presenza di aplotipi centrali, ma vi sono comunque aplotipi ad alta frequenza: HLt10 e HLt13 per il cluster A, HLt04, HLt05, HLt20, HLt22 e HLt31 per il cluster B.

Le variazioni tra ed entro i cluster sono state analizzate mediante l'analisi della varianza molecolare. Tutti i confronti a coppie tra i cluster sono risultati altamente significativi ($0,099 \leq F_{st} \leq 0,245$; $p = 0,00$) (Tab.5.2.5).

Tab.5.2.5. Calcolo del F_{st} nel confronto a coppie tra i 3 cluster, mediante analisi AMOVA.

Fst	ClusterA	ClusterB	ClusterC
ClusterA			
ClusterB	0,222		
ClusterC	0,245	0,099	

L'esistenza di una considerevole struttura genetica è testimoniata anche dagli indici di differenziamento ricavati dall'analisi AMOVA, dai quali si ricava che più del 80% dell'intera variabilità genetica è dovuta a differenza tra popolazioni (Tab.5.2.6). Gli indici F_{st} e Φ_{st} danno il medesimo risultato elevato e altamente significativo ($0,80$; $p=0,00$), indice che gli aplotipi tra diversi cluster sono molto differenziati.

Tab.5.2.6. AMOVA: analisi della variazione tra i 3 cluster.

Sorgente	% variazione	
Tra popolazioni	80,04	80,04
Entro popolazioni	19,96	19,96
Indice di fissazione	Fst=0,800	Φst=0,800

Tab.5.2.7. Indici di diversità genetica per il D-loop delle sequenze globali. N°ind.= n° individui; K= n° aplotipi; S= n° siti polimorfici; H= Haplotype diversity; Πd= Nucleotide diversity; Π= pairwise differences.

Statistics	N°ind.	K	S	H (±SD)	Πd (±SD)	Π
ClusterA	75	12	14	0,651 +/-0,05	0,009 +/-0,01	3,362 +/-1,743
ClusterB	157	22	41	0,885 +/-0,01	0,150 +/-0,08	5,742 +/-2,764
ClusterC	12	8	8	0,924 +/-0,06	0,007 +/-0,01	2,748 +/-1,565

Il cluster B presenta il maggior numero di campioni (157) dai quali sono stati ricavati 22 aplotipi. Il cluster A presenta 75 individui per 12 aplotipi, mentre il cluster C comprende solo 12 individui tra i quali vi è però gran diversità per un totale di 8 aplotipi. Gli indici di variabilità genetica indicano che, a livello globale, i cluster che presentano maggiore variabilità sono B e C, con dei valori di Haplotype Diversity (H) rispettivamente di 0,885 e 0,924 (Tab.5.2.7).

Per la costruzione degli alberi filogenetici è stato introdotto come outgroup 1 dei 7 aplotipi di lepre bruna campionati in provincia di Belluno (Fig.5.2.3).

Gli alberi filogenetici di ML e NJ sono risultati concordanti nella suddivisione della popolazione alpina in tre gruppi, esattamente corrispondenti ai cluster individuati con il Network.

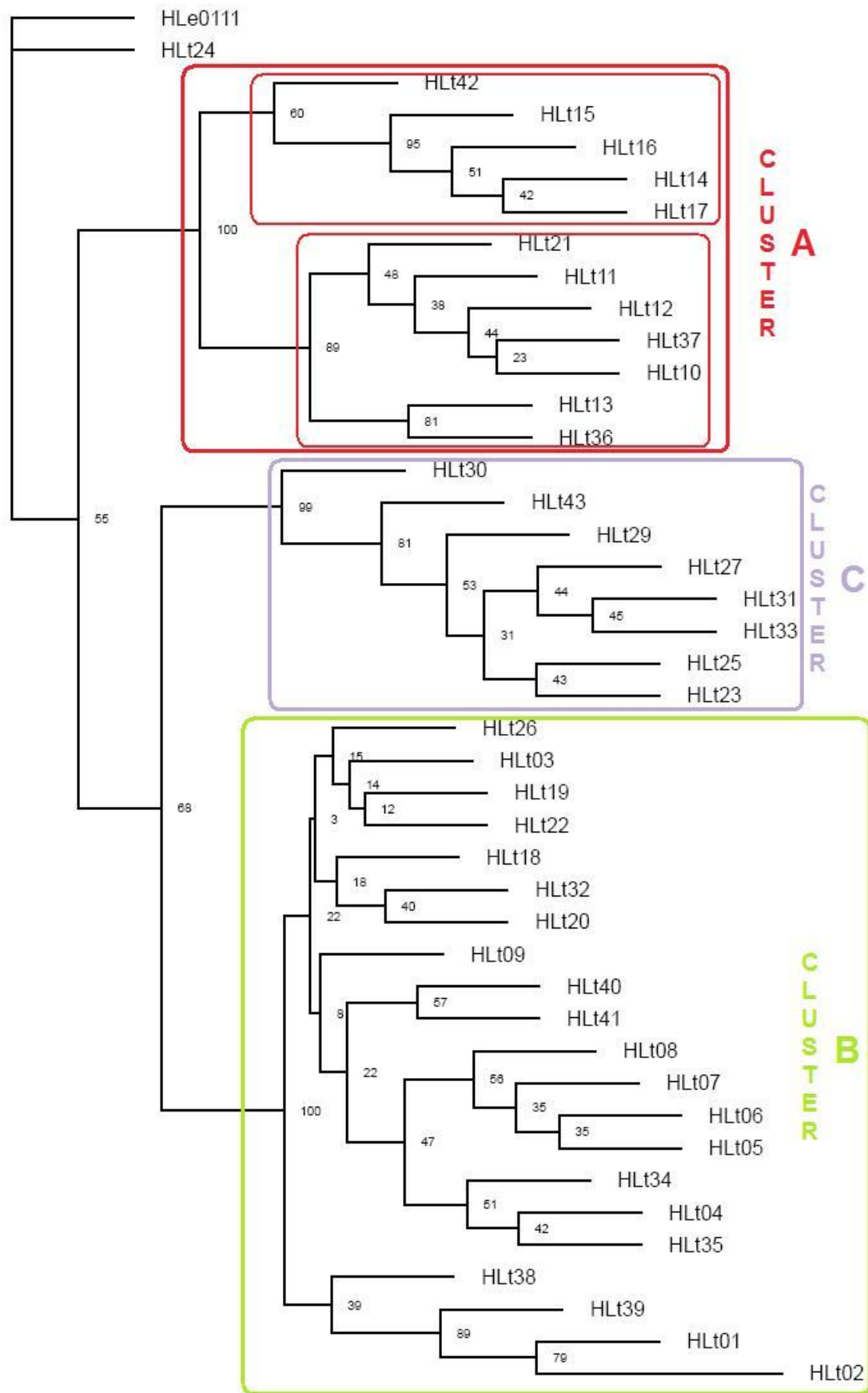
L'aplotipo valdostano HLt24 risulta esterno, confermando la distanza che era stata evidenziata dal Network.

La prima ramificazione, secondo entrambi i metodi di filogenesi, separa il cluster A dagli altri 2, ed è supportata da valori di bootstrap che, pur non essendo alti,

superano il 55%.

Secondariamente si separano i cluster B e C con un valore di bootstrap dell'86%.

La robustezza dei nodi è elevata anche per alcune ramificazioni entro i cluster. Ad esempio la biforcazione entro il cluster A che separa gli aplotipi HLt14-HLt17 (sottogruppo Aa), HLt42 da HLt10-HLt13, HLt21, HLt36, HLt37 (sottogruppo Ab), risulta supportata da un valore di bootstrap del 100% nell'albero NJ; la medesima divisione in due sottogruppi si riscontra nell'albero ML (bootstrap 95%) ed è possibile verificarla anche nel Network. Osservando la distribuzione geografica degli aplotipi, essa non sembra spiegare questa ramificazione.



10

Fig.5.2.3. Albero NJ degli aptotipi alpini di lepre bianca.

5.3. PERNICE BIANCA

5.3.1. Campionamento non invasivo

L'attività di campo ha fornito campioni in 25 uscite di campionamento su 29 (82%), durante le quali il numero di campioni raccolti variava da 2 (Col Quaternà) a 105 (Cadin dei Toci).

La resa di amplificazione da campioni non invasivi, come atteso, è risultata inferiore rispetto a quella da campione tessutale. Per l'analisi del sesso, ad esempio, è stata ottenuta una resa del 99% per quanto riguarda i campioni da tessuto e del 65% per i campioni non invasivi (feci e piume/penne) (Tab.5.3.1).

Tab.5.3.1. Risultati delle analisi sperimentali su campioni locali ottenuti mediante campionamento non invasivo.

PROVINCIA	ANNO RACCOLTA	LOCALITA'	TOTALE CAMPIONI	ESTRATTI	Positivi 10 MICRO	%Micro Piume Positivi	%Micro Feci Psitivi	Positivo Sessaggio	%OK Ses. Piume	%OK Ses. Feci	OK PHDL	OK PHDH
Trento	2009	Cima d'Asta	31	31	25 (81%)	81%	-	21 (68%)	68%	-	8 (26%)	1 (3%)
		Grostè	45	29	23 (79%)	79%	-	22 (76%)	76%	-	11 (38%)	7 (24%)
	2010	Campinello	7	7	2 (29%)	29%	-					
	2011	Forcella Marmolada	33	25	16 (64%)	64%	64%	25 (89%)	86%	100%	17 (68%)	10 (4%)
Belluno	2011	Cadin dei Toci	105	35	10 (29%)	37%	0%	22 (63%)	74%	25%	11 (31%)	2 (6%)
		Col Quaternà	3	2							2 (100%)	2(100%)
		Monte Piana	9	7	2 (29%)		29%	4 (57%)	-	57%		
		Peralba-Chiadenis	104	47	25 (53%)	50%	-	23 (49%)	32%	100%	12 (26%)	9 (19%)
		Piani Eterni	19	2							2 (100%)	2(100%)
		Vette Feltrine	79	31	14 (45%)	36%	75%	24 (77%)	70%	80%	17 (55%)	5 (16%)
			435	216	113 (54%)	60%	40%	141 (65,3%)	65%	66%	80 (40%)	38 (19%)

Per le popolazione trentine di Cima d'Asta e Grosté sono state utilizzate piume e penne raccolte nel 2009, per la popolazione di Campinello piume raccolte nel 2010, per le altre popolazioni campioni fecali, da piuma e penna raccolti nel 2011 (Tab.5.3.1). Ciò ha permesso di confrontare la resa di estrazione e amplificazione per campioni estratti poco dopo il campionamento (51%) e campioni estratti dopo due anni (61%) (Tab.5.3.2). Le percentuali ottenute sono riferite specificamente alle popolazioni campionate, è possibile che ripetendo le analisi con altri campioni

si ricavano percentuali diverse in base al loro stato di conservazione.

Tab.5.3.2. Resa delle amplificazioni su campioni da piuma estratti nel 2011, divisi in base all'anno di raccolta. L'anno 2010 non è stato incluso nel confronto perché comprende una sola popolazione di soli 7 individui.

Anno campionamento (Dimens. Campione)	Microsatelliti Positivi	Dloop fram. 396bp Positivi	Sessaggio Positivo	Media
2009 (60)	80%	32%	68%	60%
2011 (140)	48%	43%	63%	51%

Volendo osservare se la resa di amplificazione dipendesse dal tipo di campione non invasivo utilizzato, sono state calcolate le percentuali complessive di resa da penne/piume e da feci. Nelle analisi di sessaggio la resa di amplificazione per le piume è del 65%, per le feci del 60%. L'amplificazione con i loci microsatellite ha evidenziato maggiore differenza di resa: 40% di risultati positivi per le feci, 60% per le piume (Tab.5.3.1). A livello di singole popolazioni le percentuali di resa non sono in realtà sempre concordi con quanto riportato per il totale dei campioni (Tab.5.3.1).

Trattando DNA ottenuto da campioni non invasivi, è necessario effettuare un ulteriore controllo: verificare la presenza di campioni doppi, ottenuti campionando materiale deposto dallo stesso individuo. Innanzitutto sono stati controllati i campioni da piume e feci che secondo le ipotesi sul sito di raccolta dovevano corrispondere allo stesso individuo (coincidenza: 2 su 2), in seguito anche per gli altri campioni è stato confrontato l'aplotipo e controllato il risultato della genotipizzazione ai 10 loci. Degli individui doppi solo un campione è stato considerato nelle successive analisi. Ciò ha portato ad una notevole riduzione della numerosità delle popolazioni: come si può osservare dalla tabella 5.3.3 circa il 23% dei campioni è stato scartato, l'incidenza di ricampionamento degli individui è stata maggiore per alcune popolazioni rispetto ad altre.

Tab.5.3.3. Problema del pluri-campionamento di uno stesso individuo. “Campioni”=campioni positivi per l'amplificazione ai 10 loci microsatellite e al frammento da 396bp del D-loop. “Individui”=campioni rimasti dopo l'eliminazione dei campioni appartenenti allo stesso individuo.

Popolazioni	Microsatelliti		Dloop (PHDL)	
	Campioni	Individui	Campioni	Individui
CDA	25	23	8	7
GRO	23	13	11	10
CAM	2	2	-	1
MAR	16	8	15	5
CDT	10	5	11	10
CQU	-	-	2	2
COR	-	-	2	2
MPI	2	2	-	-
PER	25	20	12	10
PET	-	-	2	1
VFE	14	11	17	15
Totale	117	84 (72%)	78	63 (81%)

Ad esempio per la popolazione della Marmolada gli individui sono risultati essere il 50% dei campioni dei quali erano risultati positivi i 10 loci microsatellite e appena il 33% di quelli per i quali era stato ottenuto il frammento da 396bp del D-loop (per questa popolazione erano stati in 2 casi raccolte sia piume che feci per controllare che fosse corretta l'ipotesi di considerare campioni raccolti entro un raggio di 20 cm come appartenenti ad uno stesso individuo) (Tab.5.3.3).

Il campionamento non invasivo ha lo svantaggio di fornire DNA in bassa quantità e spesso degradato, dal quale, in molti casi, non è possibile ottenere lunghe sequenze di DNA. Questa problematica incide principalmente sull'analisi del D-loop: il frammento di 396bp ottenuto con i primer PHDL e PHH521 è stato amplificato con successo nel 40% dei casi, mentre la percentuale di successo dell'amplificazione del frammento di 840bp, amplificato con i primer PHDH e PHL400, è stata decisamente inferiore (19%). Si sarebbe potuto procedere all'individuazione di nuovi primer per amplificare l'intero D-loop, ma essendo il frammento da 396bp fortemente informativo (più del 60% delle mutazioni ricade in questa regione), è stato deciso di limitarsi all'amplificazione di questo frammento per risparmiare DNA per la successiva amplificazione dei microsatelliti.

L'amplificazione dei 10 loci microsatellite, effettuata sui 216 campioni estratti, ha dato esito positivo per 117 campioni, pari al 54% (Tab.5.3.1).

Indagando la resa per i 10 loci microsatellite, è stata calcolata la percentuale di campioni positivi per ogni singolo locus (compresi sia i campioni per i quali sono stati ottenuti i 10 loci, sia quelli per i quali ne era stato ottenuto solo qualcuno, poi esclusi dalle analisi). I valori ricavati sono compresi tra il 67% del locus BG12 e il 59% dei loci TUT2 e TUT3, con una media del 62,2% (Tab.5.3.4).

Tab.5.3.4. Resa di amplificazione PCR dei 10 loci microsatellite (testati sui 216 campioni estratti dei quali sono state fatte le analisi con i microsatelliti).

Locus	Micro OK
TUT1	142 (66%)
TUT2	127 (59%)
TUT3	127 (59%)
BG19	133 (62%)
BG20	138 (64%)
BG10	132 (61%)
BG12	144 (67%)
BG15	135 (63%)
BG16	134 (62%)
BG18	132 (61%)
Media	134,4 (62,2%)

Alcuni loci sono stati amplificati in multiplex con delle buone rese già alle prime amplificazioni BG10-BG12 (47%) e BG19-BG20 (45%).

La multiplex TUT1-TUT2-TUT3 ha dato invece una scarsa resa (inferiore al 10%).

Infine la multiplex BG15-BG16-BG18, testata per tutti i campioni, ha dato buone rese per i primi due loci (superiore a 51%), mentre il locus BG18 presentava difficoltà di resa in multiplex (26%), problema ovviato procedendo con l'amplificazione in singolo (risultati positivi nel 60% delle amplificazioni).

Per le analisi sono stati utilizzati solo i campioni dei quali tutti i 10 loci avevano dato esito positivo (54% dei campioni).

L'amplificazione dei 6 loci microsatellite testati per la prima volta in questo studio su campioni provenienti da campionamento non invasivo, ha evidenziato una buona resa per i loci ADL184, ADL230 e LEI098 amplificati in singolo (50%,

47%, 48% rispettivamente) (Tab.5.3.5). I loci ADL257 e TUT4 hanno invece evidenziato maggiori difficoltà di amplificazione (specialmente ADL257: resa del 12%) e sono stati pertanto esclusi dalle analisi per evitare spreco di DNA.

Tab.5.3.5. Resa di amplificazione PCR per gli altri 6 loci microsatellite

Locus	N° campioni su cui sono stati testati	Micro OK
ADL184	129	65 (50%)
ADL142	119	29 (24%)
ADL230	129	61 (47%)
ADL257	71	12 (17%)
LEI098	119	57 (48%)
TUT4	97	39 (40%)

Utilizzando campioni non invasivi per avere conferma degli alleli ottenuti è stato necessario ripetere l'amplificazione più volte (per campioni tessutali era sufficiente una sola amplificazione). La ripetizione dell'amplificazione, seppur con le stesse identiche modalità, ha fornito, in caso di DNA degradato, picchi diversi nelle varie prove. Ciò è avvenuto prevalentemente per campioni omozigoti; quando anche gli eterozigoti presentavano alleli diversi nelle varie ripetizioni, era perché il DNA era seriamente compromesso, tanto che questi campioni sono stati in seguito solitamente eliminati.

Le ripetizioni effettuate per gli ADL e LEI098 (intese sia quelle per ottenere dei risultati che quelle per verificare gli alleli ottenuti) sono state minori che per i primi 10 loci: in media 2,2 ripetizioni di questi 6 loci contro le 3,47 ripetizioni dei primi 10 loci. A causa della scarsa quantità di DNA per campioni estratti da piuma, in molti casi non è stato possibile estendere l'amplificazione del DNA ai 6 loci microsatellite aggiuntivi, pertanto, per avere una database completo per il maggior numero di campioni, è stato deciso di limitare le analisi ai primi 10 loci microsatellite.

5.3.2 Polimorfismo

5.3.2.1 D-loop

Dal presente lavoro sono state ricavate 115 nuove sequenze lunghe 396bp: 40

bellunesi, 23 trentine, 21 piemontesi, 8 lombarde, 13 della Val d'Aosta, 10 svizzere. Sono inoltre state ottenute 82 nuove sequenze lunghe 1035bp: 17 bellunesi, 13 trentine, 8 lombarde, 21 piemontesi, 13 della Val d'Aosta e 10 svizzere (Tab.5.3.6 a-b).

Tab.5.3.6. Aplotipi nuovi ricavati dalle sequenze locali e delle Alpi Occidentali in questo studio:
(a) sequenza da 396bp; (b) sequenze da 1035bp.

FRAMMENTO 396bp				SVIZZ	VdA	PIEMONTE			TRENTO				BELLUNO				TOT
APlotipi	APL. COLLASSATI			CH	VdA	TO	CU	OSS	GRO	MAR.	CDA	CAM	VFE	PER	CDT	PET	
HLm01	HLm17	HLm16	HLm19	5	1	11	1	1	3	2	2	-	3	5	5	-	39
HLm02				1	5	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	8
HLm03	HLm09			-	3	3	-	-	4	1	4	1	4	-	1	-	21
HLm04	HLm15			-	1	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	6
HLm05				-	-	1	-	-	2	1	1	-	1	-	-	1	7
HLm06				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
HLm07				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
HLm08				3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
HLm10				-	-	-	-	-	1	-	-	-	3	1	-	-	5
HLm11				-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
HLm12				-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
HLm18				-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
Hlm20				-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
HLm21				-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
HLm22				-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
HLm23				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
HLm24				-	2	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
HLm25				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
HLm26				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
HLm27				1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	4
TOT				10	13	24	3	2	10	5	7	1	15	10	10	1	111

(a)

1035 bp	SVIZZ	VdA	Piemonte			Sondrio	Trento				Belluno				TOT		
Aplotipi	CH	VdA	TO	CU	OSS	SON	GRO	MAR.	CDA	CAM	CQU	CDT	PER	COR	VFE	PET	
HLm01	5	1	7	-	1	2	-	2	-	-	1	1	3	-	-	-	23
Hlm01b	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
HLm02	1	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	8
Hlm04	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
HLm05	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	4
Hlm05b	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
HLm06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
HLm07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
HLm08	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
HLm09	-	3	2	-	-	1	-	2	2	1	1	1	-	-	1	-	14
HLm10	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2
HLm11	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
HLm12	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Hlm15	-	1	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Hlm16	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	3
HLm18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Hlm21	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Hlm22	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Hlm24	-	2	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Hlm25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Hlm27	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Hlm27b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Totali	10	13	16	3	2	8	5	5	2	1	2	3	7	2	1	2	82

(b)

Per l'analisi a livello locale (province di Belluno e Trento) sono state utilizzate le 63 sequenze da 396bp ottenute dai campioni estratti per questo studio e le 46 sequenze trentine recuperate dal lavoro di Collini (2010), tagliate a 396bp, per un totale di 109 sequenze (40 bellunesi, 69 trentine).

Le 109 sequenze da 396bp analizzate individuano la presenza di 15 aplotipi definiti da 12 siti polimorfici dei quali 11 transizioni, 1 transversione, per un totale di 12 sostituzioni. Di questi aplotipi 5 sono nuovi (HLm20, HLm23, HLm25, HLm26, Hlm27) e di questi 3 (HLm20, HLm23, Hlm26) non compaiono nelle analisi per le sequenze lunghe perché provenienti da sequenze delle quali era stato possibile ottenere solo il frammento corto.

Per l'analisi a livello alpino sono state utilizzate sia le sequenze corte che quelle lunghe.

Sono state ricavate 257 sequenze alpine da 396bp: alle 109 precedenti sono state aggiunte 148 sequenze provenienti dalle Alpi Occidentali, 52 di queste sono state ottenute dai campioni estratti per questo studio, 96 dal lavoro di Collini (2010), tagliate a 396bp. Le 257 sequenze individuano 22 aplotipi, definiti da 14 siti polimorfici, dei quali 13 transizioni, 1 transversione, per un totale di 14 sostituzioni. Tra questi aplotipi, 15 erano già stati rilevati negli studi precedenti del progetto, 8 sono nuovi (Hlm20-Hlm27): 3 di questi si riscontrano solo nei campioni piemontesi (HLm21, HLm22, HLm24), 4 riguardano campioni bellunesi e trentini, mentre l'aplotipo HLm27 è stato riscontrato sia a Belluno che in Piemonte.

Le 228 sequenze alpine da 1035bp (80 locali; 52 della Alpi Occidentali ricavate dal presente studio; 96 delle Alpi Occidentali dal lavoro di Collini, 2010) individuano 28 aplotipi definiti da 22 siti polimorfici di cui 17 transizioni, 5 transversioni, per un totale di 22 sostituzioni. Si riscontrano 8 nuovi aplotipi (HLm01b, HLm05b, HLm21, HLm22, HLm24, HLm25, HLm27, HLm27b) di cui 5 provengono da individui piemontesi (Hlm01b,HLm21, HLm22, Hlm24, HLm27), 3 da individui bellunesi e trentini (Hlm05b, HLm25,HLm27b).

Per l'analisi a livello globale sono state utilizzate unicamente le sequenze da 1035bp, aggiungendo alle 228 sequenze alpine, 187 sequenze provenienti da altre

aree dell'areale mondiale di *L. mutus*, per un totale di 415 sequenze. Alcune di queste presentavano delle ambiguità sparse in modo casuale all'interno della sequenza, corrette secondo un principio conservativo, sostituendole nei siti non polimorfici con il nucleotide rilevato in allineamento per tutte le altre sequenze (Collini,2010).

Le 415 sequenze da 1035bp individuano 69 aplotipi definiti da 91 siti polimorfici di cui 56 transizioni, 26 transversioni, per un totale di 82 sostituzioni e 17 indel.

I modelli selezionati in base al criterio AICc sono stati i seguenti: per le sequenze locali e alpine da 396bp HKY (Hasegawa, Kishino and Yano 1985), con le locali è stato considerato il tasso di variazione tra i siti (+G), con le alpine sono stati inoltre inclusi i siti invariabili (I+G); per le sequenze alpine e globali di 1035bp è stato invece selezionato il modello TPM (Kimura, 1981) includendo i siti invariabili e il tasso di variazione tra i siti (I+G).

5.3.2.2 Loci microsatellite

L'amplificazione dei loci microsatellite è stata effettuata per gli individui delle 8 popolazioni locali riportate in Tab.5.3.7. In seguito, le 2 popolazioni Monte Piana e Campinello sono state escluse dalle analisi perché il numero di individui tipizzati con successo era insufficiente .

Tab.5.3.7. Le 8 popolazioni locali delle quali è stata effettuata l'amplificazione con i loci microsatellite.

Nome Pop	Codice	Provincia	Numerosità
Cadin dei Toci	CDT	BL	5
Peralba	PER	BL	20
Vette Feltrine	VFE	BL	11
Monte Piana	MPI	BL	2
Groste	GRO	TN	13
Marmolada	MAR	TN	8
Cima D'Asta	CDA	TN	23
Campinello	CAM	TN	2

Testando le popolazioni per l'equilibrio di Hardy-Weimberg, nessun locus ha evidenziato problemi di disequilibrio dovuti a alleli nulli, dropout allelico o errori

di stuttering.

Il coefficiente di inbreeding è basso e non risulta significativamente diverso da 0 (Fis=-0,038; p=0,966). E' stato calcolato il Fis anche per i singoli loci, con il risultato che per il BG10 e il BG12 il valore è significativamente diverso da 0 (Tab.5.3.8).

Tab.5.3.8. Coefficiente di inbreeding per locus

Locus	FIS
BG19	-0.125
BG20	-0.142
TUT1	0.032
TUT2	-0.028
TUT3	-0.131
BG10	0.131
BG12	0.121
BG15	-0.070
BG16	-0.129
BG18	0.014

Nel calcolo del Linkage Disequilibrium, solo la popolazione del Grosté presenta problemi di linkage per la maggior parte dei loci . Nelle altre popolazioni pochi loci risultano in Linkage e non si osserva una ripetizione di questo problema nelle varie popolazioni, segno di un'assenza di Linkage di tipo fisico (Tab.5.3.9). La situazione del Grosté fa quindi pensare ad un Linkage di tipo popolazionistico, pertanto questa popolazione è stata esclusa dalle successive analisi con i microsatelliti.

Tab.5.3.9. LD per locus per popolazione. Nelle caselle sono riportate le popolazioni che presentano Linkage per quei loci.

Loci	BG19	BG20	TUT1	TUT2	TUT3	BG10	BG12	BG15	BG16	BG18
BG19										
BG20	GRO MAR.									
TUT1	PER									
TUT2		CDA VFE	GRO							
TUT3		CDT GRO MAR.	CDA	GRO						
BG10	GRO		VFE	GRO	GRO					
BG12	GRO	GRO	CDT GRO	GRO	GRO	CDT GRO PER				
BG15		CDT	CDT	CDA VFE						
BG16	CDA GRO MAR.	GRO PER	GRO	GRO		GRO	GRO PER	CDT		
BG18	CDA GRO PER		CDT		CDT	CDT GRO	CDT VFE	CDT	CDT MAR.	

5.3.3 Filogeografia e struttura

E' stato possibile effettuare le analisi con i loci microsatellite solo a livello locale, in quanto per le restanti popolazioni alpine e globali non erano disponibili in letteratura analisi con gli stessi 10 loci microsatellite analizzati in questo studio, né avevamo la possibilità di ottenere campioni di quelle zone da cui estrarre il DNA e procedere con le amplificazioni dei loci microsatellite. Pertanto ci siamo limitati ad uno studio sul DNA mitocondriale (mtDNA) a livello globale e alpino, mentre a livello locale è stato possibile effettuare entrambe le analisi: quella sul DNA nucleare attraverso lo studio dei loci microsatellite sui soli campioni estratti per questo studio, quella mitocondriale attraverso lo studio del D-loop per tutti i campioni provenienti dalle provincie di Trento e Belluno (per il trentino sono state anche utilizzate le sequenze ricavate dallo studio di Collini, 2010).

5.3.3.1 mtDNA

Contesto globale

Il Network di Fig.5.3.1, ricostruito con gli aplotipi provenienti da gran parte del range distributivo della specie, evidenzia la presenza di 4 cluster principali riconducibili all'origine geografica degli individui campionati:

Cluster A: popolazioni alpine e pirenaiche;

Cluster B: popolazioni scandinave;

Cluster C: popolazioni delle Isole di Svalbard, Taymir, Islanda e Groenlandia;

Cluster D: popolazioni circumpolari della Siberia, dell'Alaska e delle Isole Aleutine.

Il cluster A si differenzia da B per un minimo di 4 mutazioni, così come il cluster C da D .

Il cluster A risulta divergere da D per almeno 6 mutazioni. L'aplotipo centrale del cluster D è BE1 che comprende il 58% delle sequenze di questo gruppo. Da esso per 21 mutazioni si differenzia *Lagopus mutus japonicus*. Il nodo di collegamento tra i due aplotipi della specie *L. lagopus* diverge invece per 37 mutazioni dal cluster A.

Gli aplotipi pirenaici rientrano nel cluster A e si differenziano per una sola mutazione dall'aplotipo HLm09 (il più rappresentato nelle Alpi, dopo HLm01).

Le analisi di variabilità e differenziazione dei 4 cluster individuati sono state condotte escludendo gli aplotipi di cui non si conoscevano le frequenze: nel cluster A le sequenze pirenaiche e LMU, nel cluster D gli aplotipi dab713, dab630, dab107, jmb1041 e svd611.

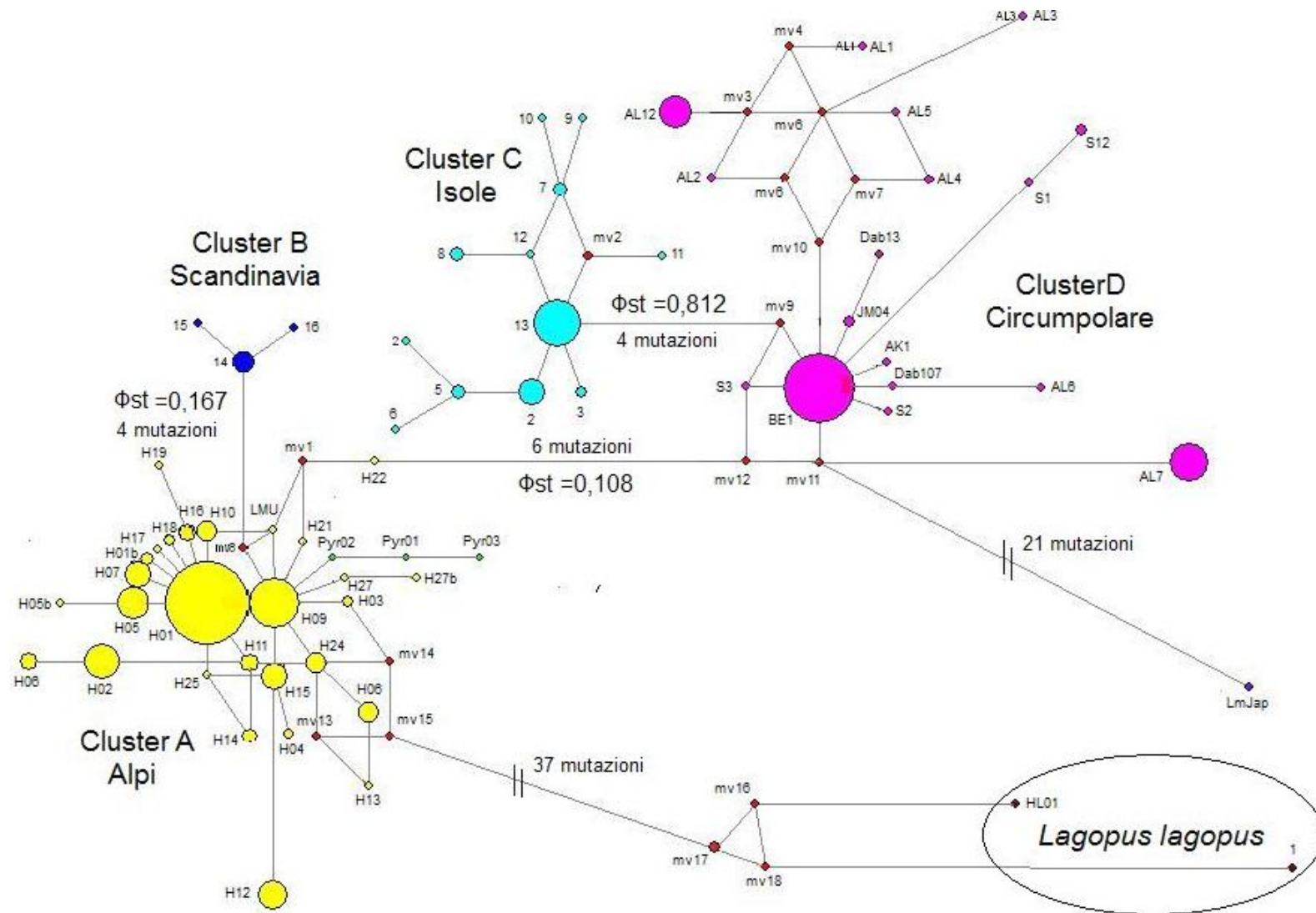


Fig.5.3.1. Nella pagina precedente: network globale degli aplotipi di *Lagopus mutus*. Sui rami sono stati riportati i valori di Φ_{st} trovati. I colori indicano la provenienza: giallo=Alpi; verde=Pirenei; blu=Scandinavia; rosa=isole Aleutine, isole di Svalbard, Siberia e Stati Uniti; azzurro=Groenlandia e Islanda; viola=Giappone; rosso=*Lagopus lagopus*.

Il confronto a coppie tra i 4 cluster ha evidenziato valori di F_{st} elevati e significativi ($p \leq 0,05$) (Tab.5.3.10). Le differenziazioni maggiori si riscontrano tra il cluster delle scandinave e quello delle isole nordiche (B-C; $F_{st}=0,852$) e tra il cluster delle pernici alpine/pirenaiche e quello delle circumpolari (A-D; $F_{st}=0,812$). Valori più bassi ma significativi ($p < 0,05$) di F_{st} si riscontrano tra il cluster delle alpine/pirenaiche e quello delle scandinave (A-B; $F_{st}=0,167$), e tra il cluster delle isole nordiche e quello delle circumpolari (C-D; $F_{st}=0,109$). Effettivamente questi dati coincidono con quanto osservato nel network, per cui A-D e C-D sono molto vicini tra loro, distanziandosi in entrambi i casi per sole 4 mutazioni.

Tab.5.3.10. Calcolo del F_{st} nel confronto a coppie tra i 4 cluster, mediante analisi AMOVA.

Fst	ClusterA	ClusterB	ClusterC	ClusterD
ClusterA				
ClusterB	0.16655			
ClusterC	0.77818	0.85182		
ClusterD	0.81229	0.77609	0.10906	

Questa marcata differenziazione su base geografica è resa ancor più evidente dall'analisi con AMOVA che riporta un'elevata percentuale di differenziazione tra popolazioni, bassa invece a livello intra-popolazionistico (Tab.5.3.11).

Tab.5.3.11. AMOVA: analisi della variazione tra i 4 cluster.

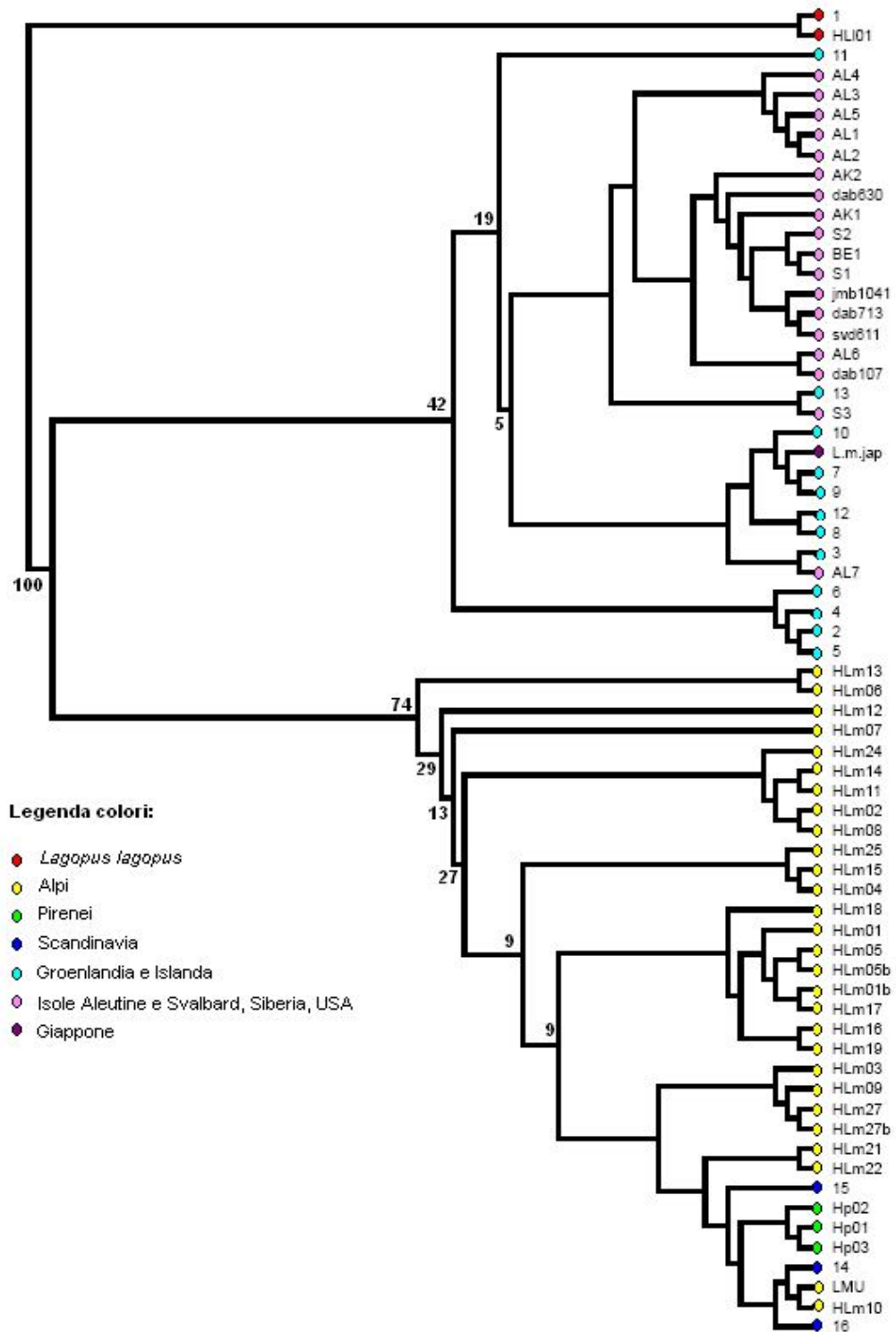
Sorgente variazione	Percentuale variazione	
Tra popolazioni	81.315	81.389
Entro popolazioni	18.685	18.612
Indici di fissazione	$F_{st}=0,81315$	$\Phi_{st}=0,81388$

Gli alberi filogenetici ottenuti a livello globale con i metodi di Maximum Likelihood e Neighbor Joining sono risultati concordanti.

Usando i due campioni di *Lagopus lagopus* come outgroup dell'albero filogenetico si osserva la suddivisione di *Lagopus mutus* in due gruppi, uno comprendente le popolazioni alpine, pirenaiche e scandinave, l'altro tutte le restanti popolazioni.

Questa clusterizzazione è supportata da un valore di bootstrap del 100% con entrambi i metodi, sia con le sequenze corte che con quelle lunghe. Non risultano altri raggruppamenti geografici significativi (Fig.5.3.2).

Fig.5.3.2. Albero NJ globale ottenuto con le sequenze del D-loop completa (1035bp) di *Lagopus mutus*.



Contesto alpino

Nome Popolazione	Codice	Nome Popolazione	Codice
Col Quaternà	CQU	Marmolada	MAR
Cadin dei Toci	CDT	Redival-Rabbi	RedRab
Peralba	PER	Torino	TO
Cortina	COR	Alta Valle	AVA
Vette Feltrine	VFE	Sondrio	SON
Piani Eterni	PET	Morbegno	MOR
Sinistra Fassa	SxF	Ossola	OSS
Destra Fassa	DxF	Cuneo	CUN
Cima D'Asta	CDA	Val d'Aosta	VdA
Brenta	BRE	Tirano	TIR
Presanella	PRE	Ayent-Grimentz	Aye-Gri

Tab.5.3.12. Le 26 popolazioni alpine

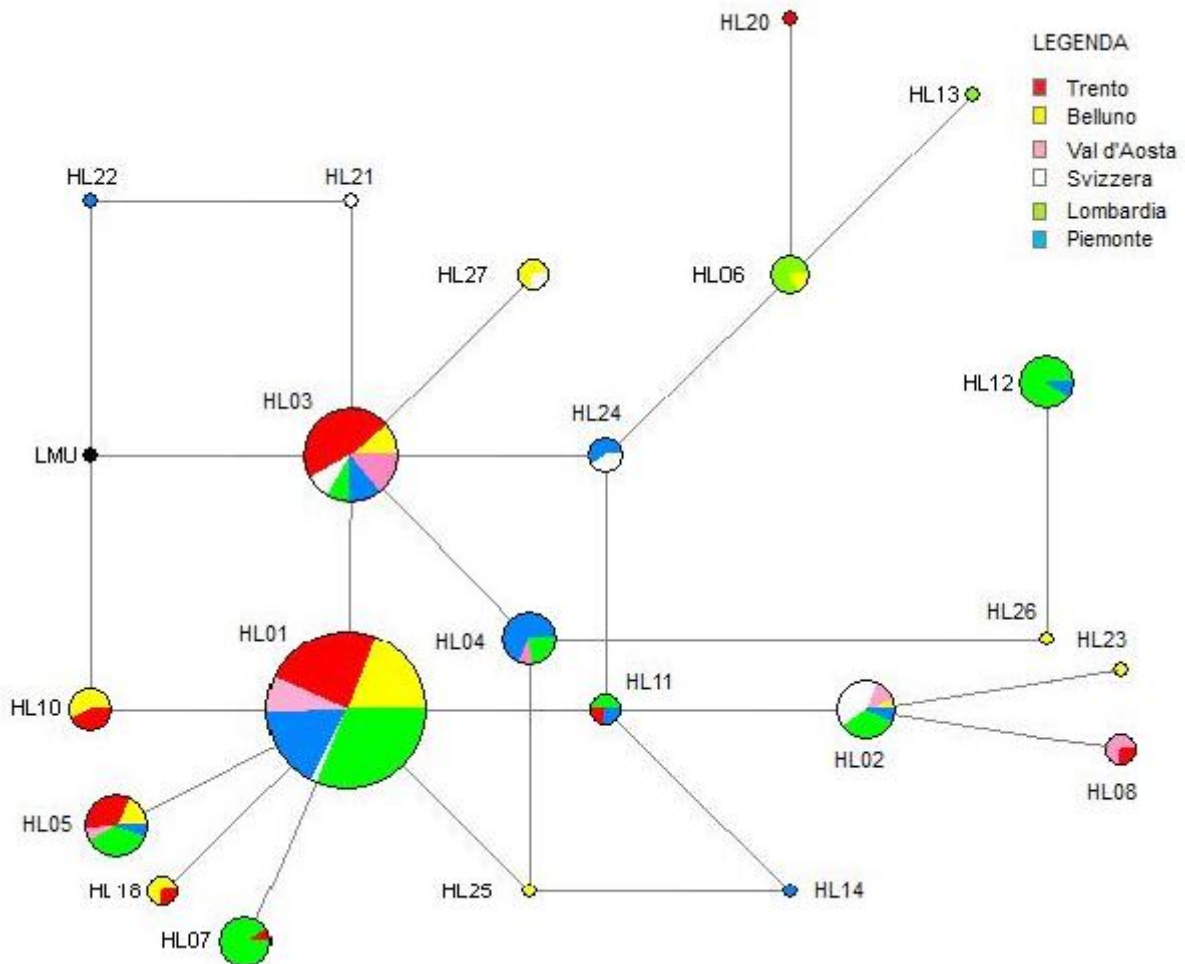


Fig.5.3.3. Network delle sequenze alpine da 1035bp. I vari colori rappresentano le popolazioni alpine raggruppate sulla base della regione di provenienza del campione

Il Network realizzato per le 228 sequenze alpine di 1035bp (Fig.5.3.3), evidenzia la mancanza di raggruppamenti degli aplotipi su base geografica. I risultati ottenuti a partire dalle sequenze corte e da quelle lunghe concordano perfettamente, con l'unica eccezione che utilizzando le sequenze da 1035bp viene spiegata un'incertezza che nel Network delle corte aveva reso necessaria l'introduzione di un nodo supplementare.

HLm01 è l'aplotipo centrale nonché quello maggiormente rappresentato nelle popolazioni alpine. Il 37% delle sequenze analizzate ricade in questo aplotipo. La percentuale aumenta a 40% considerando le sequenze corte, in quanto gli aplotipi HLm16, HLm17, HLm19 e HLm01b collassano entro HLm01.

A livello di arco alpino entrambi gli indici F_{st} e Φ_{st} sono bassi ma altamente significativi ($F_{st}=\Phi_{st}=0,058$; $p=0,00$), indice di una leggera differenziazione genetica fra le popolazioni. Solo alcuni confronti per coppie di popolazioni hanno dato un risultato significativo ($p \leq 0,05$) (Tab.5.3.13). In modo particolare la destra Fassa, la Svizzera e la Val d'Aosta sono le tre aree che presentano maggior numero di confronti a coppie significativi.

Tab.5.3.14. AMOVA: analisi della variazione tra le 26 popolazioni alpine.

Sorgente variazione	Percentuale variazione	
Tra popolazioni	5,818	5,818
Entro popolazioni	94,182	94,182
Indici di fissazione	$F_{st} 0,058$	$\Phi_{st}=0,058$

La suddivisione nelle 22 popolazioni alpine ha evidenziato che la percentuale di variazione risulta notevolmente superiore a livello intra-popolazionistico (94,18%) piuttosto che tra popolazioni differenti (5,82%) (Tab.5.3.14).

Gli alberi degli aplotipi alpini indicano l'assenza di una struttura filogeografica per le popolazioni alpine di *Lagopus mutus*, in quanto, seppur alcuni raggruppamenti concordano tra le varie tipologie di alberi create, questi non sono sostenuti da buoni livelli di bootstrap. Inoltre queste coincidenze riguardano nodi agli apici, mentre la divisione in gruppi a livello basale è diversa per ogni albero creato.

Tab.5.3.13. Calcolo del Φ_{st} nel confronto a coppie tra le 22 popolazioni alpine, mediante analisi AMOVA. In grassetto i valori significativi.

Φ_{st}	SxF	DxF	CDA	PRE	RedR	TO	AVA	SON	MOR	TIR	AyeG	GroB	MAR,	CQU	CDT	PER	COR	VFE	PET	VdA	OSS	CUN	
SxF																							
DxF	0.015																						
CDA	-0.123	0.047																					
PRE	-0.034	0.071	-0.029																				
RedR	-0.047	0.041	-0.065	-0.052																			
TO	-0.002	0.189	0.066	0.062	0.098																		
AVA	-0.051	0.067	0.051	0.029	0.014	0.058																	
SON	-0.022	0.114	0.084	0.061	0.054	0.029	-0.015																
MOR	-0.029	0.144	0.108	0.012	0.082	0.013	-0.038	-0.050															
TIR	-0.044	0.154	0.081	0.115	0.112	0.100	0.067	0.089	0.070														
AyeG	-0.051	0.135	0.024	0.093	0.067	0.115	0.134	0.170	0.164	0.018													
GroB	-0.039	-0.007	-0.002	-0.091	-0.043	0.105	0.062	0.096	0.069	0.144	0.115												
MAR	-0.066	0.096	-0.056	-0.156	-0.024	-0.031	-0.033	-0.014	-0.089	0.040	0.040	-0.091											
CQU	-0.224	-0.026	-0.218	-0.245	0.032	-0.306	-0.237	-0.241	-0.346	-0.184	-0.146	-0.212	-0.424										
CDT	0.179	0.295	0.209	0.157	0.383	0.047	0.090	0.071	-0.031	0.110	0.160	0.165	0.040	-0.344									
PER	-0.102	-0.020	0.010	0.046	0.030	0.064	-0.081	-0.046	-0.038	0.011	0.063	0.018	0.000	-0.204	0.166								
COR	0.148	0.230	0.191	0.271	0.442	0.283	0.176	0.246	0.196	-0.023	-0.115	0.247	0.289	-0.047	0.257	0.163							
VFE	0.212	0.201	-0.004	-0.069	0.560	-0.600	-0.412	-0.494	-0.895	-0.429	-0.214	-0.100	-0.237	-1.000	-1.149	-0.113	-0.425						
PET	0.166	0.021	0.092	-0.024	0.232	0.212	0.029	0.104	0.012	0.130	0.081	-0.038	0.066	0.000	0.218	0.084	0.000	0.000					
VdA	0.060	0.276	0.159	0.214	0.235	0.155	0.188	0.203	0.176	-0.01	-0.016	0.237	0.141	-0.065	0.187	0.157	-0.081	-0.281	0.225				
OSS	0.195	0.281	0.232	0.177	0.427	-0.067	-0.026	-0.098	-0.164	0.081	0.170	0.168	0.082	-0.359	-0.062	0.073	0.106	-1.298	0.090	0.175			
CUN	-0.140	0.178	0.013	0.069	0.174	-0.010	0.003	-0.003	-0.032	-0.077	-0.040	0.084	-0.019	-0.300	0.047	0.014	0.064	-0.452	0.172	-0.025	0.062		

Contesto locale

Le analisi per il mtDNA a livello locale rispecchiano quanto riportato per il contesto alpino, senza evidenziare particolarità in merito alle popolazioni bellunesi e trentine. Vengono pertanto riportati unicamente i risultati dell'analisi dei loci microsatellite.

5.3.3.2 nDNA

Contesto locale

Dall'analisi AMOVA emerge un valore di Fst basso ma altamente significativo (Fst=0,036; p=0,00), mentre l'Rst risulta appena sotto la soglia di significatività (0,044; p=0,051). Dai confronti a coppie emerge che quasi tutte le popolazioni sono significativamente differenziate seppure con valori di Fst bassi (0,021<Fst<0,069; p<0,05). Nei confronti a coppie, solo CDT-CDA e CDT-PER hanno dato valori di Fst non significativi (rispettivamente -0,000 e 0,019). I valori di Rst sono anch'essi bassi e i confronti a coppie significativi (p<0,05) riguardano le popolazioni del PER con CDA, MAR, VFE (0,039<Fst<0,095) e delle VFE con MAR Fst=0,6) (Tab.5.3.15).

Tab.5.3.15. Calcolo degli indici di diversità Fst (sotto la diagonale) e Rst (sopra la diagonale) nel confronto a coppie tra le 5 popolazioni locali. In grassetto i valori significativi.

Fst/Rst	CDT	CDA	MAR	PER	VFE
CDT		0.031	-0.017	0.046	0.009
CDA	-0.000		0.031	0.039	0.026
MAR	0.069	0.046		0.084	0.060
PER	0.019	0.021	0.051		0.095
VFE	0.041	0.035	0.057	0.054	

L'Analisi Fattoriale delle Corrispondenze (AFC, Fig.5.3.4) ha evidenziato come la maggior parte dei campioni ricada entro una nuvola eterogenea di punti, in cui non si nota una differenziazione in base alla popolazione di provenienza.

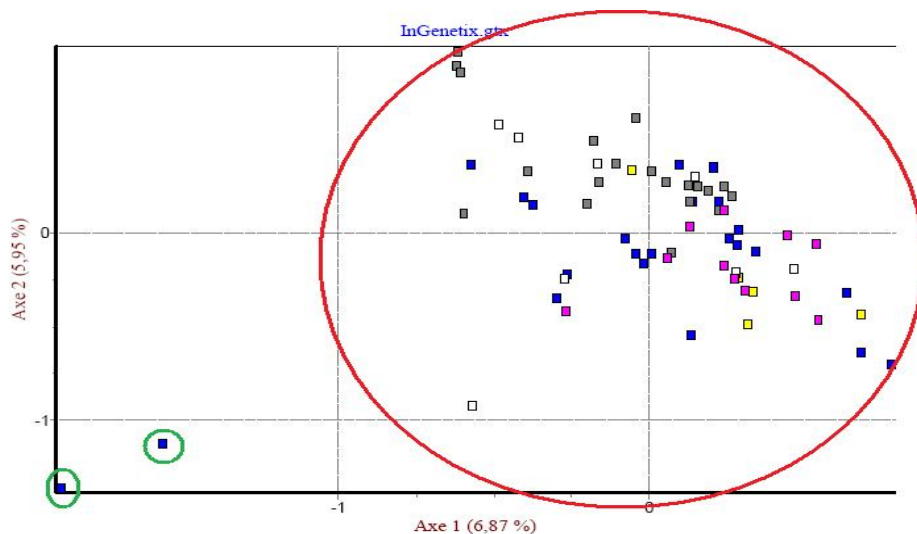
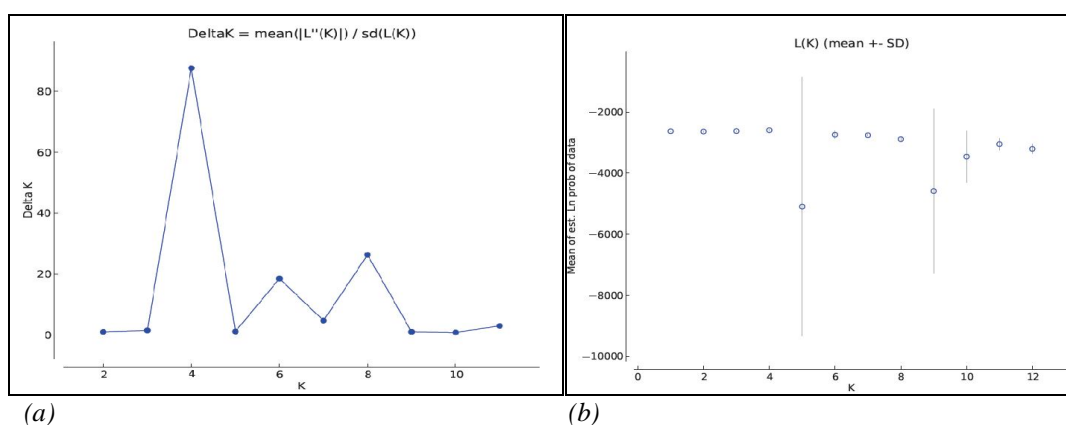


Fig.5.3.4. AFC per le 5 popolazioni locali. Ogni colore corrisponde ad una popolazione: Giallo=CDT; blu=CDA; rosa=VFE; bianco=MAR; grigio=PER. Con l'ellisse rossa è evidenziata la nuvola di punti entro la quale ricadono tutte le popolazioni.

L'indice ΔK , calcolato attraverso la clusterizzazione bayesiana effettuata con STRUCTURE, ha indicato 3 picchi principali corrispondenti a valori di K pari a 4 ($\Delta K=87,63$), 6 ($\Delta K=18,52$) e 8 ($\Delta K=26,34$), designando come più verosimile una divisione in 4 cluster (Fig.5.3.5a).

Fig.5.3.5. Stima della probabilità con STRUCTURE per $1 < K < 12$: (a) grafico per i valori di ΔK ; (b) andamento della media del logaritmo della probabilità di appartenenza stimata.



Dalla clusterizzazione non risulta però una reale assegnazione dei campioni a questi 4 gruppi, bensì i genotipi appaiono tutti mescolati. Dal grafico della media del logaritmo delle probabilità a posteriori ($L(K)$) non emerge una

clusterizzazione più probabile (Fig.6.3.5b), andando a confrontare i valori di L(K) però, i più alti risultano per K=4 (-2593,43), K=3 (-2626,53), K=1 (-2631,77) e K=2 (-2641,27).

5.3.4 Variabilità genetica

E' stata studiata la variabilità genetica entro i gruppi evidenziati nell'analisi filogeografica. A livello globale ed alpino è stato utilizzato il mtDNA, a livello locale il mtDNA e il nDNA.

6.3.4.1 mtDNA

Contesto globale

Tab.5.3.16. Indici di diversità genetica per il D-loop delle sequenze globali. N°ind.=n° individui; K=n° aplotipi; S=n° siti polimorfici; H=Haplotipe diversity; Π_d =Nucleotide diversity; Π =pairwise differences.

Statistics	N°ind.	K	S	H (±SD)	Π_d (±SD)	Π
ClusterA	231	31	24	0,823 +/-0,02	0,002 +/-0,00	2,087 +/-1,17
ClusterB	7	3	2	0,571 +/-0,52	0,001 +/-0,00	0,571 +/-0,52
ClusterC	56	12	9	0,688 +/-0,06	0,001 +/-0,00	1,348 +/-0,85
ClusterD	116	15	16	0,605 +/-0,05	0,002 +/-0,00	2,344 +/-1,29

A livello globale è stata analizzata la variabilità entro i 4 cluster evidenziati dal network e dagli alberi filogenetici. I cluster che presentano maggiore variabilità sono A e C con dei valori di Haplotipe Diversity (H) rispettivamente di 0,823 e 0,688 (Tab.5.3.16). Il cluster B presenta il livello di variabilità più basso, seppur non molto differente dal valore ricavato per il cluster D, è da sottolineare però la bassa numerosità del campione per il cluster B, che potrebbe aver causato una sottostima della variabilità genetica. La bassa variabilità entro il cluster D rappresenta invece un dato interessante dato che questo gruppo comprende aplotipi provenienti da una zona molto vasta, in cui anche le popolazioni sono molto più distanti tra loro rispetto alla distribuzione geografica degli individui negli altri cluster.

Contesto alpino

A livello alpino è stata mantenuta la divisione delle popolazioni in base al gruppo montuoso di provenienza. L'Haplotype Diversity risulta compresa tra 0,417 di Redival-Rabbi (TN) e 0,929 di Morbegno (SO), senza significative differenze in base all'area geografica. Sono state escluse 6 popolazioni (COR, CDT, VFE, PET, OSS, CQU) che davano come valore di Haplotype Diversity 1,000 a causa della ridotta numerosità del campione (Tab.5.3.17).

Tab.5.3.17 Indici di diversità genetica per il D-loop delle sequenze alpine.

ALPI	N°ind.	K	S	H (±SD)	Πd (±SD)	Π
SxF	5	3	2	0,700 ±0,218	0,001 ±0,001	0,907 ±0,744
DxF	8	6	5	0,893 ±0,111	0,002 ±0,001	1,660 ±1,086
CDA	15	5	7	0,629 ±0,125	0,002 ±0,001	1,561 ±0,986
PRE	7	4	3	0,857 ±0,102	0,001 ±0,001	1,458 ±1,000
RedR	9	3	2	0,417 ±0,191	0,001 ±0,001	0,498 ±0,465
TO	22	7	8	0,766 ±0,065	0,002 ±0,001	2,191 ±1,260
AVA	29	10	10	0,825 ±0,056	0,004 ±0,002	3,594 ±1,878
SON	37	11	11	0,818 ±0,049	0,003 ±0,002	2,338 ±1,306
MOR	8	6	8	0,929 ±0,084	0,004 ±0,003	4,234 ±2,347
TIR	18	6	8	0,817 ±0,054	0,004 ±0,002	3,795 ±2,004
AyeG	18	6	7	0,797 ±0,066	0,003 ±0,002	3,299 ±1,779
GroB	9	6	5	0,917 ±0,073	0,002 ±0,001	1,891 ±1,188
MAR	5	3	2	0,800 ±0,164	0,001 ±0,001	1,152 ±0,882
CQU	2	2	1	1,000 ±0,500	0,001 ±0,002	1,104 ±1,078
CDT	3	3	3	1,000 ±0,272	0,003 ±0,002	2,545 ±1,845
PER	7	5	5	0,857 ±0,137	0,002 ±0,002	2,059 ±1,306
COR	2	2	4	1,000 ±0,500	0,006 ±0,006	6,071 ±4,633
VFE	1	1	0	1,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000
PET	2	2	2	1,000 ±0,500	0,002 ±0,003	2,448 ±2,054
VdA	13	6	6	0,821 ±0,082	0,003 ±0,002	3,536 ±1,923
OSS	2	2	3	1,000 ±0,500	0,004 ±0,004	4,082 ±3,221
CUN	5	3	3	0,800 ±0,164	0,002 ±0,002	1,950 ±1,317

Contesto locale

A livello locale gli indici F_{st} e Φ_{st} non risultano significativi ($F_{st}=\Phi_{st}=0,036$; $p>0,5$) e la percentuale di variazione si conferma essere quasi interamente dovuta alla variabilità che si riscontra entro le popolazioni, piuttosto che tra le popolazioni. Dall'analisi AMOVA del confronto a coppie, solo 6 confronti tra le 14 popolazioni locali risultano significativi: BRE con CDT, VFE, CDA; VFE ancora con RED, CDA e CDT.

5.3.4.2 nDNA

Contesto locale

Tab.5.3.18 Indici di diversità genetica per locus per la popolazione locale: Na=numero di alleli per locus; Ra=Range allelico; Ho=eterozigosità osservata; He=eterozigosità attesa.

Locus	Na	Ra	Ho	He
BG19	6	6	0,810	0,725
BG20	7	8	0,805	0,729
TUT1	5	10	0,349	0,361
TUT2	10	16	0,825	0,834
TUT3	8	9	0,906	0,765
BG10	5	12	0,405	0,486
BG12	8	18	0,643	0,753
BG15	6	7	0,761	0,695
BG16	8	9	0,818	0,763
BG18	8	13	0,751	0,771
Media	7,1	10,8	0,707	0,688

I 10 loci microsatellite analizzati a livello locale presentano da 5 a 10 alleli per locus, con una media di 7,1. Le variazioni alleliche sono comprese tra 6 e 18 ripetizioni, con una media di 10,8. L'eterozigosità osservata media della popolazione locale (0,707) è significativamente ($p<0,05$) diversa dall'eterozigosità attesa media (0,688) (Tab.5.2.18).

Indagando la variabilità per locus, 8 loci su 10 presentano una Gene Diversity compresa tra 0,512 e 0,900, con un valore medio per locus e popolazione di 0,684. La Gene Diversity per il locus BG10 è inferiore a 0,5 per 3 popolazioni su 5, mentre per il TUT1 è inferiore a 0,5 per tutte le popolazioni (Tab.5.3.19).

Tab.5.3.19 Gene Diversity per locus nelle popolazioni locali.

	CDT	CDA	MAR	PER	VFE
BG19	0,700	0,631	0,804	0,770	0,700
BG20	0,775	0,700	0,696	0,758	0,686
TUT1	0,200	0,445	0,339	0,382	0,441
TUT2	0,900	0,809	0,848	0,851	0,768
TUT3	0,675	0,745	0,804	0,776	0,764
BG10	0,375	0,649	0,446	0,591	0,382
BG12	0,825	0,800	0,786	0,687	0,682
BG15	0,825	0,717	0,696	0,705	0,514
BG16	0,750	0,754	0,866	0,643	0,777
BG18	0,700	0,824	0,732	0,804	0,791

5.3.5 Risultati del sessaggio

Il sessaggio molecolare è stato effettuato per campioni bellunesi, trentini, e alcuni campioni piemontesi forniti dai cacciatori.

Per questi ultimi, nelle schede da compilare con i dati sull'individuo abbattuto, i cacciatori avevano annotato nel 97,7% dei casi, anche il sesso degli animali.

Questa analisi ci ha permesso di effettuare una verifica del dato fornito. Il 100% dei campioni ha dato esito positivo, in quanto provenienti da tessuto. Da questo è emerso che nel 14,1% dei casi c'è stato un errore di attribuzione del sesso: di questi nel 61% dei casi un maschio era stato considerato femmina, nel 39% era avvenuto il contrario. Il controllo, effettuato mediante la ripetizione dell'amplificazione per tutti i campioni, ha dato i medesimi risultati.

Ad eccezione di queste analisi di controllo, è stato effettuato il sessaggio unicamente per campioni locali non invasivi. Il sessaggio ha dato un risultato positivo nel 65,3% dei casi. Di questi, il 24,8% dei campioni sono risultati femmine, il rimanente 75,2% maschi (Tab.5.3.20).

Tab.5.3.20 Risultati dell'analisi di sessaggio molecolare eseguito per le popolazioni locali estratte per questa tesi.

	CDA	GRO	MAR	PER	CDT	VFE	MPI	TOT
M	11	22	9	21	21	19	3	106
F	10	0	16	2	1	5	1	35
TOT	21	22	25	23	22	24	4	141

6. DISCUSSIONE

6.1. Campionamento non invasivo

L'attività di campo ha permesso il recupero di materiale non invasivo (piume/penne, feci) nel 82% delle uscite di campionamento per la pernice e nel 71% delle uscite per la lepre bianca.

Il minor successo di campionamento per la lepre bianca è dovuto principalmente a tre fattori. Innanzitutto rintracciare i siti abitualmente occupati dalla lepre bianca è più difficile rispetto a quanto avvenga per la pernice che tende ad occupare, in base al periodo dell'anno, gli stessi siti. Inoltre le uscite di campionamento alla pernice sono state effettuate in occasione dei censimenti primaverile ed estivo durante i quali la localizzazione dei siti è stata facilitata dalla presenza di personale esperto e, in alcuni casi, dei cani. Infine, una problematica riscontrata solo per la lepre è stata la difficoltà nel distinguere gli escrementi della specie alpina da quelli della bruna. La discriminazione durante l'attività di campo è stata effettuata principalmente in base al territorio e all'altimetria: a quote inferiori a 1400 m le feci trovate sono state attribuite a lepre bruna, a quote superiori le feci sono state invece sempre raccolte perché attribuite a lepre bianca. Abbiamo però riscontrato dei casi che non confermerebbero l'assoluta validità di tale metodica di campionamento. I campionamenti effettuati sui monti Dolada e Terne appartenenti alle Prealpi bellunesi e sul monte Zovo in Comelico a quote comprese tra 1600 e 1900 metri, hanno fornito sequenze che, a seguito delle analisi sul mtDNA, sono risultate di lepre bruna. Una prima ipotesi prevede che le lepri brune, a causa del disturbo antropico a quote inferiori, si spingano a fasce altimetriche superiori ai 1400m. Questa possibile spiegazione troverebbe conferma nel fatto che sia i paesi della Val Belluna, sia quelli del Comelico formano un continuum anche a quote abbastanza elevate (per il bellunese: Tisoì, Libàno e Barp a 600-700m alle pendici del monte Terne e il comune di Pieve d'Alpago a 700m alle pendici del monte Dolada; in Comelico: Costalta a 1327m alle pendici del monte Zovo). Secondo un'altra ipotesi questi individui sarebbero ibridi tra il maschio di bianca e la femmina di bruna. Se così fosse, la prole dovrebbe risultare vitale, fertile, e, all'analisi del D-loop, uguale alla madre (lepre bruna) a causa dell'ereditarietà

materna del mtDNA e si spiegherebbe la presenza della specie a quote elevate. Si sottolinea che la presenza di individui ibridi era già stata riscontrata in trentino (Pecchioli et al., 2008).

L'unico problema che ha interessato i campionamenti alla pernice bianca è stato riscontrato per la popolazione della Marmolada, località nella quale è stato particolarmente evidente e dannoso al fine delle analisi il problema del pluricampionamento (Tab.5.2.3), ovvero la raccolta di più campioni appartenenti allo stesso individuo in siti particolarmente ricchi di resti biologici perché occupati durante la notte da gruppi di pernici (prelievo avvenuto seguendo il protocollo che prevede di considerare i campioni trovati entro un cerchio immaginario di diametro inferiore o uguale a 25 cm come appartenenti allo stesso animale).

Il campionamento non invasivo è risultato una metodica molto utile per l'ottenimento di materiale da sottoporre ad indagine genetica. Per entrambe le specie è stato affermato il successo di amplificazione del D-loop e dei loci microsatellite (14 per la pernice, 4 per lepre bianca), mentre solo per la pernice è stato effettuato con successo il sessaggio molecolare degli individui.

L'analisi dei risultati ottenuti dall'amplificazione del DNA da campioni non invasivi, ha permesso di fare alcune considerazioni riguardanti l'utilizzo di questo tipo di materiale per le analisi genetiche. E' emerso che la resa di amplificazione del DNA dipende maggiormente dallo stato di conservazione del campione, piuttosto che dal tipo di campione non invasivo utilizzato (piuma/penna o fatte). Nonostante ciò, constatazioni effettuate a proposito dell'amplificazione con i loci microsatellite nella pernice bianca, indicano che i problemi connessi alla conservazione del campione inficiano maggiormente i campioni fecali rispetto a quelli da piume/penne: mentre le piume danneggiate o vecchie hanno dato nella visualizzazione al sequenziatore picchi deboli e a volte incerti per alcuni loci ma è stato possibile, aumentando il numero delle prove, recuperare i campioni migliori, le fatte vecchie davano esito negativo per tutti i loci. In caso di campioni fecali in buono stato di conservazione invece, i picchi erano presenti e generalmente alti e chiari per tutti i loci. Ciò ha consentito per i campioni fecali, di accorgersi subito della condizione del DNA, in modo tale da scartare immediatamente campioni non buoni senza spreco di tempo e reagenti.

I piumini hanno manifestato una resa di estrazione del DNA particolarmente buona. Quando avevamo a disposizione piumini sufficientemente piccoli, abbiamo messo in provetta il campione intero e verosimilmente è stato proprio questo a determinare il successo di estrazione e amplificazione, poiché essendo i piumini aderenti al corpo dell'animale a causa della funzione termica che svolgono, riteniamo che essi potrebbero avere sul loro vessillo una buona quantità di cellule epiteliali esfoliate, che porterebbero ad un incremento nella quantità di DNA reperibile da questi campioni.

Per le analisi sono stati utilizzati anche campioni trentini di piuma raccolti nel 2009-2010 ed estratti nel 2011 per questo studio. Ciò ha permesso di osservare come in piume e penne conservate nella corretta modalità (asciugate e poi inserite con un pezzo di carta assorbente entro una bustina di plastica) il DNA si mantenga in buono stato, al punto da non constatare una differente efficienza di resa di amplificazione tra campioni estratti subito ed estratti dopo due anni e poter concludere che, per campioni da piuma correttamente conservati, il periodo intercorso dall'anno di campionamento al momento dell'estrazione non incide sulla resa (intervallo di tempo massimo testato: due anni).

L'analisi del sesso degli individui a partire da campioni non invasivi ha dato risultati soddisfacenti (65,3% di positivi tra i 216 campioni estratti). Da queste analisi è emerso che la maggior parte degli individui campionati sono maschi (oltre il 75%). Ciò non indica necessariamente una sex ratio fortemente sbilanciata verso il sesso maschile, infatti la percentuale di maschi e femmine varia principalmente in base alla popolazione a causa dei diversi tipi di campionamento effettuati. Il campionamento alla pernice bianca effettuato sul ghiacciaio della Marmolada, ad esempio, è avvenuto durante il censimento estivo con i cani. In questi casi vengono individuati i siti dove si riuniscono le femmine con le covate, pertanto i campioni raccolti sono risultati appartenere prevalentemente ad individui di sesso femminile. Le altre popolazioni sono rappresentate principalmente da maschi, probabilmente perché durante quei campionamenti sono state pattugliate alla ricerca di campioni, aree più esposte e ad altitudini maggiori dove si formano e si riuniscono per l'estate i gruppi di maschi non accoppiati con quelli che hanno lasciato la femmina dopo la schiusa delle uova.

6.2. Filogeografia e struttura

L'analisi filogeografica permette di capire le relazioni tra le popolazioni nell'areale di studio e studiarne l'evoluzione anche in relazione alla presenza di barriere geomorfologiche o antropiche.

6.2.1 Lepre bianca

L'elevata frammentazione territoriale che si riscontra in ambito alpino (Lassen et al., 2005) presupporrebbe popolazioni isolate tra loro, geneticamente differenziate e, di conseguenza, una popolazione alpina fortemente strutturata. L'esistenza di una considerevole struttura genetica viene effettivamente evidenziata dalle analisi condotte sul DNA mitocondriale della lepre bianca. Studi precedenti sulla specie alpina, avevano già evidenziato l'elevata differenziazione tra popolazioni alpine delle Alpi Centro-Occidentali (Pecchioli et al., 2008), che viene confermata dalla presente tesi nella quale viene ampliato lo studio della specie verso le Alpi Orientali (provincia di Belluno).

Il network (Fig.5.3.2) e gli alberi filogenetici (Fig.5.3.3) degli aplotipi alpini di lepre bianca evidenziano la presenza di 3 principali gruppi: il primo comprende le Alpi piemontesi e valdostane, il secondo, più ampio, comprende aplotipi provenienti da zone comprese tra il Piemonte e il fiume Adige e infine un terzo gruppo nel quale ricadono gli aplotipi del Trentino Alto Adige orientale e di Belluno. La significatività della divisione in questi tre gruppi viene confermata dagli indici di fissazione (F_{st} e $\Phi_{st}=0,8$; $p=0,00$). Fortemente significativi risultano i confronti a coppie tra le 13 popolazioni individuate sull'arco alpino in base ai gruppi montuosi: il 74% dei confronti presenta un'elevata significatività ($0,232 \leq \Phi_{st} \leq 1,000$; $p \leq 0,05$). La differenziazione più evidente si osserva tra popolazioni a destra e a sinistra del fiume Adige, che si riconferma come forte barriera geografica (Pecchioli et al., 2008). Tutti gli aplotipi campionati sulla sinistra orografica dell'Adige sono esclusivi di quest'area e presentano un livello di differenziamento massimo dagli aplotipi delle popolazioni occidentali rispetto al fiume ($0,887 \leq \Phi_{st} \leq 1,000$) dai quali si distanziano per 17 mutazioni. Barriere geografiche altrettanto significative non sono state riscontrate nell'arco alpino,

sebbene vi sia un gruppo di aplotipi valdostani e torinesi che si differenzia dal cluster B per 14 mutazioni.

6.2.2 Pernice bianca

Per la specie *Lagopus mutus*, oltre allo studio in ambito alpino, è stata effettuata anche un'analisi nell'intero areale distributivo. Le Alpi e i Pirenei rappresentano delle sorgenti di biodiversità estremamente importanti per l'isolamento geografico dalle aree nordiche con le quali condividono simili caratteristiche di habitat e fauna. Tale singolarità è confermata anche a livello genetico. I Network e gli alberi filogenetici indicano infatti che le popolazioni alpine e pirenaiche di pernice bianca formano un cluster nettamente separato rispetto alle popolazioni nordiche, divise ulteriormente in 3 cluster: scandinave, circumpolari e delle isole nordiche. Gli indici di differenziamento tra questi 4 cluster sono elevati e altamente significativi segno di una notevole struttura genetica a livello di distribuzione globale della specie.

Una caratteristica comune ai cluster più rilevanti in termini di numerosità del campione, è la presenza di aplotipi dominanti e centrali entro i quali ricade il maggior numero delle sequenze. Nel cluster delle popolazioni circumpolari (D) l'aplotipo dominante (BE1) comprende il 58% delle sequenze di questo gruppo, nella popolazione alpina (cluster A) il 37% delle sequenze ricade entro l'aplotipo HLm01. La presenza di questi grossi nodi centrali, dai quali si differenziano per poche mutazioni tutti gli altri aplotipi, potrebbe essere la prova di forti contrazioni numeriche avvenute nel passato a seguito delle quali da un unico aplotipo rimasto si sarebbero create delle differenziazioni in diverse direzioni corrispondenti agli altri aplotipi che vi si discostano per poche mutazioni dai quali, a loro volta, sarebbero avvenute ulteriori differenziazioni, dando un quadro a raggera, com'è quello che si osserva ad esempio nel network delle sequenze alpine (Fig.5.2.3).

La situazione di *Lagopus mutus* sulle Alpi risulta molto diversa da quanto precedentemente osservato per *Lepus timidus*. Dallo studio di Collini (2010) è emerso che le popolazioni di pernice bianca sull'arco alpino possono essere considerate un'unica grande popolazione, caratterizzata da un notevole flusso genico tra le sotto-popolazioni. Le analisi effettuate per il D-loop e i microsatelliti

non avevano infatti evidenziato alcun segno di struttura e la divisione in 12 popolazioni in base ai gruppi montuosi aveva riportato valori globalmente significativi ma molto piccoli ($0,019$; $p \leq 0,05$) e solo 4 confronti a coppie significativi.

Con il presente studio, oltre a introdurre le nuove sequenze e i 3 nuovi aplotipi delle popolazioni bellunesi, è stato ampliato il numero di campioni per popolazioni trentine, piemontesi, valdostane e svizzere con l'aggiunta di 5 nuovi aplotipi per le Alpi Occidentali. L'aumento della numerosità del campione, in alcuni casi esigua nello studio di Collini, darà maggiore validità statistica alle analisi.

Gli alberi filogenetici e i network realizzati per la popolazione alpina non evidenziano la presenza di una struttura filogeografica.

Dalle analisi effettuate sui campioni alpini emerge però una leggera struttura genetica: dall'analisi del DNA mitocondriale il calcolo degli indici di fissazione totali per l'arco alpino riporta valori bassi ma maggiori rispetto a quanto ottenuto dallo studio di Collini e altamente significativi ($F_{st}=0,058$; $p=0,00$), inoltre dal confronto a coppie tra le 22 popolazioni alpine emergono 27 confronti significativi che corrispondono ad un pattern di differenziazione Est-Ovest lungo l'arco alpino: la popolazione della Destra Fassa, ad esempio, risulta significativamente differenziata da tutte le popolazioni localizzate nel settore Occidentale delle Alpi (Svizzera, Val d'Aosta, Cuneo, Torino, Morbegno e Tirano) eccetto Sondrio e Ossola, inoltre presenta un confronto significativo con la popolazione bellunese Cadin dei Toci. Questa differenziazione non è però così netta per tutte le popolazioni, tanto è vero che ad esempio la popolazione della Sinistra Fassa non presenta alcun confronto significativo con le altre popolazioni, siano esse delle Alpi Orientali o Occidentali.

Una leggera differenziazione è stata riscontrata anche a livello locale nelle aree trentina e bellunese, per le quali ai dati mitocondriali è stata aggiunta l'analisi con i microsatelliti. Dall'analisi del nDNA emerge un valore di F_{st} basso ma significativo ($F_{st}=0,05$; $p=0,00$), mentre l'indice R_{st} non raggiunge la soglia di significatività ($p > 0,05$). Dal confronto a coppie tra le popolazioni, 8 confronti su 10 risultano significativi (fanno eccezione CDT-CDA e CDT-PER).

6.3 Variabilità

Studiare la variabilità genetica delle popolazioni permette di comprenderne le capacità di adattamento ed evoluzione in risposta ai cambiamenti climatici, alle malattie e ad un territorio che si sta rapidamente trasformando a causa del riscaldamento globale e dell'uomo. Quest'analisi, unita allo studio della struttura genetica, permette di valutare lo stato di salute di una popolazione.

6.3.1 Lepre bianca

La variabilità genetica indagata per la popolazione alpina di lepre bianca risulta alta ($H=0,920$) e paragonabile a quanto riscontrato nell'areale nordico: Scandinavia $H=0,90$, monti Urali $H=1,00$ ed estremo est della Russia $H=0,99$ (Thulin et al., 2003; Ferreira et al., 2007). Analizzando la variabilità entro i 3 cluster identificati per le popolazioni alpine si riscontrano valori, mediamente meno alti rispetto a quelli totali, compresi tra 0,65 del gruppo ad est del fiume Adige e 0,92 delle popolazioni torinesi e valdostane.

Un caso del tutto particolare è rappresentato dalle popolazioni bellunesi che per 38 sequenze provenienti da 11 località hanno presentato soli 2 aplotipi che rientrano tra quelli trovati nel settore orientale del Trentino Alto Adige: 10 popolazioni distribuite omogeneamente nella provincia presentano l'aplotipo HLt10, mentre il secondo aplotipo (HLt13) proviene dalla località Croda da Lago (zona centrale della provincia). La bassissima variabilità riscontrata in provincia di Belluno è un dato preoccupante che potrebbe essere spiegato in due modi: il quadro meno preoccupante deriverebbe da un recentissimo evento di reintroduzione della specie alpina a partire da individui prelevati nel Trentino Alto Adige orientale, a ciò potrebbe essere seguita una notevole espansione demografica tale da spiegare la numerosità di individui. L'altra ipotesi, molto più allarmante, indicherebbe il verificarsi di un evento a collo di bottiglia in atto, che sarebbe la causa dell'elevata perdita di variabilità genetica a livello mitocondriale.

6.3.2 Pernice bianca

A livello globale i cluster che presentano maggiore variabilità sono quello delle popolazioni delle Isole di Svalbard, Taymir, Islanda e Groenlandia e il cluster delle pernici alpine e pirenaiche (Tab.5.2.18). Confrontando le popolazioni alpine con quelle circumpolari (numerosità del campione paragonabile), si osserva che la diversità genetica entro la popolazione alpina è maggiore ($H=0,823$ per il cluster A alpino/pirenaico, $H=0,688$ per il cluster C delle isole nordiche e $H=0,605$ per il cluster D delle popolazioni circumpolari della Siberia, dell'Alaska e delle Isole Aleutine).

Nel contesto alpino l'indice di variabilità per il mtDNA calcolato sia a livello di popolazione alpina totale ($H=0,825$), sia entro le sotto-popolazioni individuate in base ai gruppi montuosi di provenienza ($0,417 \leq H \leq 0,929$) è elevato e maggiore rispetto ad altre popolazioni dell'areale nordico: Islanda ($H=0,56$), Canada ($H=0,84$), Alaska ($H=0,18$), isole Aleutine (Adak: $H=0,14$; Amchitka: $H=0,33$) (Holder et al., 2004), indice di buona salute per la sottospecie alpina.

Anche dalle analisi locali con i 10 loci microsatelliti è emerso un valore elevato di variabilità ($G=0,684$), paragonabile a quanto riscontrato in Groenlandia ($G=0,67$) e maggiore rispetto ad altre zone dell'areale nordico quali l'isola di Svalbard ($G=0,47$), l'Islanda ($G=0,52$) e la Scandinavia ($G=0,66$) (Sahlman, 2009).

7. CONCLUSIONI

Da questo studio emerge un differente quadro generale sullo status genetico delle popolazioni alpine di lepre bianca e pernice bianca.

I risultati ottenuti per la lepre bianca indicano la presenza di un'elevata variabilità genetica, paragonabile a quella di specie nordiche dall'areale continuo, ma riscontrano anche, per questa specie, una struttura genetica considerevole. Questa marcata struttura è dovuta alla presenza di fattori (ad esempio barriere geomorfologiche) che limitano lo scambio genetico tra gli individui; l'elevata variabilità entro le popolazioni indica invece che queste si trovano ancora in uno stato di buona salute seppur minacciato dall'isolamento fisico e genetico tra le sotto-popolazioni. La particolare situazione riscontrata in provincia di Belluno è un campanello d'allarme per le condizioni di salute genetica di questa sottospecie: in quest'area, infatti, viene riscontrata una bassissima variabilità a livello mitocondriale. A seguito di un confronto con i dati raccolti dall'Ufficio faunistico in Provincia, è stato escluso che possa trattarsi delle conseguenze di una reintroduzione di esemplari di lepre bianca dal Trentino Alto Adige, in quanto non sono avvenute reintroduzioni. Questa bassa variabilità genetica è dunque probabilmente una conseguenza della contrazione demografica che sta subendo questa specie, per cui alla perdita di individui seguirebbe una perdita di linee genetiche. Se il dato venisse confermato dai microsatelliti, la specie si troverebbe realmente in una situazione di estremo pericolo. Si consiglia pertanto di riservare un'attenzione particolare alla specie per favorire un incremento della variabilità genetica entro e tra le sotto-popolazioni.

Per quanto riguarda la pernice bianca, l'elevata variabilità genetica della popolazione alpina, con indici di diversità maggiori rispetto alle popolazioni nordiche, e la lieve struttura riscontrata tra sotto-popolazioni, indicano delle buone condizioni genetiche per la specie. Studi precedenti sulla specie alpina indicavano l'assenza di differenziazione genetica tra sotto-popolazioni, mentre da questo studio emerge una lieve struttura genetica con gradiente est-ovest sull'arco alpino. Questa differenza rispetto ai precedenti studi potrebbe essere dovuta all'incremento sostanzioso nel numero dei campioni per popolazione ottenuto con questa tesi, che porterebbe alla minimizzazione di errori statistici legati alla

numerosità del campione. Sarebbe importante valutare se questa leggera struttura rappresenti o meno l'inizio di un processo di graduale differenziamento tra le sotto-popolazioni.

La marcata divergenza genetica delle due sottospecie alpine dalle conspecifiche nordiche, le rende di estremo interesse conservazionistico per la tutela della biodiversità alpina. Salvaguardare l'unicità di questo patrimonio naturale significa mettere in atto delle misure di tutela verso queste specie e l'ambiente nel quale esse vivono e di proseguire il monitoraggio genetico per valutare l'eventuale criticità delle dinamiche popolazionistiche (isolamento genetico, inbreeding, etc.). Ai fattori climatici che stanno lentamente ma inevitabilmente modificando gli ambienti d'alta quota, si aggiungono in diversa misura quelli di origine antropica. Sarebbe importante, ai fini della conservazione, valutare più attentamente i siti dove costruire mete turistiche ed intervenire sul territorio con progetti di ripristino degli habitat per recuperare i corridoi di collegamento tra le popolazioni e minimizzare la frammentazione del territorio; si suggerisce, inoltre, di applicare a tutte le provincie alpine interessate dalla presenza delle due specie una gestione accurata del piano di abbattimenti che sia coerente con le problematiche affrontate da queste specie (in particolare la valutazione delle condizioni climatiche in periodo riproduttivo, che in annate particolarmente sfavorevoli possono ridurre drasticamente il tasso riproduttivo).

La caccia alla pernice, in particolare, richiede molta esperienza dei cacciatori e cani appositamente addestrati, caratteristiche che la rendono una specie di particolare pregio venatorio. Le limitazioni imposte sulla caccia dalle direttive regionali e provinciali sull'arco alpino, da un lato incentivano la collaborazione dei cacciatori durante i censimenti, interessati a ricavare annualmente dei dati aggiornati sulla dimensione delle popolazioni e quindi sulla quantità di individui venabili, dall'altra possono condurre ad un incremento del fenomeno del bracconaggio. Va dunque richiesta alle provincie e a chi ha competenza nella gestione del territorio, un'incentivazione delle attività di sorveglianza, e un costante monitoraggio della specie.

Un esempio valido è la proposta di gestione presentata dalla Regione Piemonte nel 2004. Essa prevede non solo delle linee guida per il prelievo venatorio, ma

anche degli interventi sull'habitat, attività di monitoraggio, controllo e formazione. Per quanto riguarda la caccia, sono stati definiti i seguenti punti: piani di prelievo in funzione del numero effettivo di animali; differenziazione delle giornate venabili in funzione dei tipi di caccia; riduzione degli eccessi privilegiando i cacciatori esperti; formazione dei cacciatori con corsi sulla biologia delle specie, sulla gestione delle popolazioni, con partecipazione attiva ai censimenti e controlli nei confronti degli altri cacciatori; orientazione verso una caccia di specializzazione. Inoltre si prevede la verifica dello stato delle popolazioni attraverso censimenti primaverili ed estivi; finanziamento di ricerche e studi volti alla gestione delle popolazioni. Come interventi attivi sul territorio, si propone il ripristino dell'habitat idoneo, con particolare attenzione alla tutela delle aree maggiormente vocate come le aree di riproduzione o, per la pernice bianca, di canto, e misure a sostegno di allevatori e proprietari terrieri che occupano queste zone (Bruciamacchie et al., 2006).

Una gestione di questo tipo effettuata anche nelle altre regioni italiane interessate dalla presenza delle due specie e di altre a rischio, potrebbe portare dei risultati positivi sulla densità e sulla variabilità genetica delle popolazioni.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abram S., 1999. Fauna delle Alpi - Uccelli. Nitida Immagine Editrice, Cles (Tn).
- Akaike H., (1974), A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic control, 19(6): 716-723.
- Awise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 18: 489-522.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology Evolution, 16: 37-48.
- Barbieri F, 1998. Indagine sulla lepre variabile (*Lepus timidus Linnaeus*, 1758) nel Parco Adamello Brenta. Relazione Conclusiva. Dipartimento di Biologia animale Università degli studi di Pavia.
- Barnosky A.D., Matzke N., Tomiya S., Wogan G.O.U., Swartz B., Quental T.B., Marshall C., McGuire J.L., Lindsey E.L., Maguire K.C., Mersey B., Ferrer E.A., 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? Nature, 471: 51-57.
- Beaumont M. A., Bruford M. W., 1999. Microsatellites in conservation genetics. In: Goldstein D. B., Schlötterer (Ed), Microsatellites-Evolution and application. Oxford University Press, 165-182.
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L, Bonhomme F., 1999. GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier.
- Bocca M., 1986. Situazione delle popolazioni valdostane di pernice bianca, fagiano di monte e coturnice, e problemi di gestione venatoria. Atti seminario "Biologia dei Galliformi" 51-62.
- Brenot J.F., Ellison L., Rotelli L., Novoa C., Calenge C., Léonard P., Menoni E., 2005. Geographic variation in body mass of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in the Alps and Pyrenees. Wildlife biology 11(4): 281-285.

Brichetti P (red.), 1982. Atlante degli uccelli nidificanti sulle Alpi italiane. I
Rivista Italiana di Ornitologia, 52:3-50.

Bruciamacchie M., Conte C., Manfrin D., Parodi A., 2006. Tipica fauna alpina.
Proposte per una gestione ed un prelievo compatibile. ARCI-CACCIA Comitato
Regionale del Piemonte, 82-88.

Caizergues A., Bernard-Laurent A., Brenot J.F., Eliison L., Rasplus J.Y., 2003.
Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and
Western Europe. Molecular Ecology 12: 2267-2274.

Cheng, H.H., Crittenden, L.B., 1994. Microsatellite markers for genetic mapping
in the chicken. Poultry Science, 73: 539-546.

Clementi T., Stadler M., Gerstgrasser L., Carmignola G., 2009. Relazione sulla
situazione dei galliformi alpini ai fini della pianificazione del prelievo. Parte 3 –
Situazione della Pernice bianca. Ufficio Caccia e Pesca & Associazione Cacciatori
Alto Adige, 26-32.

Collini M., 2010. La pernice bianca alpina (*Lagopus muta helvetica*): una
sottospecie endemica in declino, filogeografia, variabilità genetica e aspetti
biologici. Università degli studi di Padova.

Covi R., 2011. Genetica di popolazione e del paesaggio sulle Alpi: due tetraonidi a
confronto. Università degli studi di Siena.

Cramp S., Simmons K.E.L., 1980. The birds of western Palearctic. Hawks to
Bustards, University Press, Oxford, 2: 295.

Dahl F., Willebrand T., 2004. Natal dispersal, adult home ranges and site fidelity
of mountain hares *Lepus timidus* in boreal forests of Sweden. Wildlife Biology,
11:4.

De Franceschi P., 1986. I Tetraonidi alpini. Consistenza ed evoluzione delle
popolazioni italiane. Dendronatura 2: 32-42.

De Franceschi P., 1988. La situazione attuale dei Galliformi in Italia. Ricerche
recenti o ancora in corso. Problemi di gestione e prospettive per il futuro.
Supplemento Ricerche di Biologia della Selvaggina 14: 129-168.

- De Franceschi P., 1992. Fauna d'Italia. Vol. XXIX Aves. I Gaviidae-Phasianidae. Calderini, Bologna.
- Del Hoyo J., Elliot A., Sargatal J., 1994. Handbook of the birds of the world. Lynx Editions, Barcelona, 2.
- Dingerkus S.K. e Montgomery W.I., 2002. A review of the status and decline in abundance of the Irish Hare (*Lepus timidus hibernicus*) in Northern Ireland. Mammal Society, Mammal Review, 32(1): 1-11.
- Direttiva Uccelli 79/409/CEE del Consiglio, del 2 aprile 1979, concernente la conservazione degli uccelli selvatici. Gazzetta ufficiale n. L 103 del 25/04/1979, 1-18.
- Dobson A., Hudson P., 1995. The interaction between the parasites and predators of Red Grouse *Lagopus lagopus scoticus*. IBIS 13(7): S8 7-S96.
- Drovetsky S.V., 2003. Plio-Pleistocene climatic oscillations, Holarctic biogeography and speciation in avian subfamily. Journal of Biogeography, 30: 1173-1181.
- El Mousadik A., Petit R., 1996. High levels of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa Skeels*) endemic to Morocco. Theoretical and Applied Genetics, 92: 832-839.
- Excoffier L., Laval L.G., Schneider S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1:47-50.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J.K., 2003. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, 164:1567-87.
- Favaron M., Scherini G.C., Preatoni D., Tosi G., Wauters L.A., 2006. Spacing behavior and habitat use of rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) at low density in the Italian Alps. Journal of Ornithology, 147: 618-628.
- Ferreira J.M., Boursot P., Rando E., Kryukov A., Suchentrunk F., Ferrand N., Alves P., 2007. The rise and fall of the mountain hare (*Lepus timidus*) during Pleistocene glaciation: expansion and retraits with hybridisation in Iberian peninsula. Molecular Ecology, 16:605-618.

Felsenstein J., 1981. Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *Journal of Molecular Ecology*, 17: 386-376.

Felsenstein J., 2009. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.69. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Figuerola I., Lopez B.C., Lopez A., Potrony D., 2009. What happens to ptarmigan when marmots arrive? *Ethology Ecology & Evolution*, 21: 251-260.

Flux J.E.C., 1970. Colour change of mountain hares (*Lepus timidus scoticus*) in north east Scotland. *Journal of Zoology*, 162:345-358.

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.

Gamboni A.S.G., Bisi F., Masseroni E., Nodari M., Preatoni D.G., Wauters L.A., Martinoli A., Tosi G., 2008. Home range dynamics of mountain hares (*Lepus timidus*) in the Swiss Alps. *Hystrix Italian Journal of Mammalogy*, 19(2): 157-163

Genini-Gamboni A.S., Bisi F., Masseroni E., Nodari M., Preatoni D.G., Wauters L.A., Martinoli A., Tosi G., 2008. Home range dynamics of mountain hares (*Lepus timidus*) in the Swiss Alps. *Hystrix Italian Journal of Mammalogy*, 19(2):157-163.

Gidely J. W., 1912. The lagomorphs are an independent order. *Science*, 36: 285-286.

Glaubitz J. C., 2004. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4: 309-310.

Griffith R., Double M.C., Orr K., Dawson R.J.G., 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7: 1071-1075.

Guo S.W., Thompson E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.

Hancock J.M., 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. Goldenstein D.B., Schlotterer (Ed), *Microsatellites-Evolution and application*, Oxford University Press, 1-9.

Harrison C., 1988. Nidi, uova e nidiacei degli uccelli d'Europa. Scienze Naturali. Franco Muzzio Editore, Padova.

Hasegawa M., Kishino H., Yano T., 1985. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160–174.

Hewitt G. M., 2004. The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, 1: 4.

Hoffman R.W., Braun C.E., 1975. Migration of a wintering population of white-tailed ptarmigan in Colorado. *Journal of Wildlife Management*, 39: 485–490.

Hogan F.E., Cooke R. Burridge C.P., Norman J.A., 2007. Optimizing the use of shed feathers for genetic analysis. *Molecular Ecology Notes*, 8(3): 561-567.

Hoglund J., Larsson J.K., Corrales C., Santafé G., Baines D., Segelbacher G., 2011. Genetic structure among black grouse in Britain: implications for designing conservation units. *Animal Conservation Print ISSN*, 1367-9430.

Holder K., Montgomerie R., Friesen V. L., 1999. A Test of the Glacial Refugium Hypothesis using patterns of mitochondrial and nuclear DNA sequence variation in rock ptarmigan (*Lagopus mutus*). *Evolution*, 53(6): 1936-1950.

Holder K., Montgomerie R., Vicki L.F., 2004. Genetic diversity and management of Nearctic rock ptarmigan (*Lagopus mutus*). *Canadian Journal of Zoology*, 82: 564-575.

Iason G.R., 1989. Growth and mortality in mountain hares: the effect of sex and date of birth. *Oecologia* 81:540-546.

IUNC Red List, 2010

Jensen T., Pernasetti F.M., Durrant B., 2003. Condition for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. *Zoo Biology* 22: 561-571.

Kahn N.W., St John J., Quinn T.W., 1998. Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex

identification in birds. *Auk*, 115: 1074-1078.

Kauhala K., Hiltunen M., Salonen T., 2005. Home ranges of mountain hares *Lepus timidus* in boreal forests of Finland. *Wildlife Biology*, 11:3.

Kovach A.I., Litvaitis M.K., Litvaitis J.A., 2003. Evaluation of faecal mtDNA analysis as a method to determine the geographic distribution of a rare lagomorph. *Wildlife Society Bulletin*, 31(4): 1061-1065.

Kuz'mina M.A., 1992. Tetraonidae and phasianidae of the USSR - Ecology and Morphology. Scientific Editor Douglas Siegel-Cousey. Smithsonian Institution libraries and the National Science Foundation, Washington D.C..

Lasagna A. (a cura di) 2009. La pernice bianca *Lagopus mutus helveticus* (Thienemann 1829) in Valle d'Aosta: indagine preliminare sullo status delle popolazioni. Regione Autonoma Valle d'Aosta, Assessorato Agricoltura e Risorse Naturali, Dipartimento Risorse Naturali e Corpo Forestale, Direzione Flora, Fauna, Caccia e Pesca.

Lassen B., Savoia S., Arduino S., Baumüller A., Brombach T., Calegari D., Schönenberger J., Sourd C., Spiegel H., Toniutti N., Vetterli W., Weibel K., Weissen A., 2005. Ecoregion Conservation Plan for the Alps. WWF European Programme.

Librado P., Rozas J., 2009. DNAsp v5: A Software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 1451-1452.

Litvaitis, 2005. DNA extraction of rabbit faecal pellets using Qiagen stool kit.
<http://mlitvaitis.unh.edu/>

Lucchini V., Höglund J., Klaus S., Swenson J., Randi E., 2001. Historical biogeography and a mitochondrial DNA phylogeny of grouse and ptarmigan. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 149–162.

McCarty J.P., 2001. Ecological consequence of recent climate change. *Conservation Biology*. 15: 320-331.

Menoni E., Novoa C., 2007. Les effets des changements climatiques sur les oiseaux : l'exemple des galliformes de montagne en France. ONF, Forêts et milieux naturels face aux changements climatiques. 3: 53-61.

Montgomerie R., Lyon B., Holder K., 2001. Dirty ptarmigan: behavioral modification of conspicuous male plumage. *Behavioral Ecology*, 12(4): 429-438.

Newey S., Thirgood S., Hudson P.J., 2004. Do parasite burdens in spring influence condition and fecundity of female mountain hare *Lepus timidus*? *Wildlife Biology*, 10(3): 171-176.

Mougel F, Mounolou J-C, and Monnerot M, 1997. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics*, 28: 58–71.

Newey S., Thirgood S., 2004. Parasite-mediated reduction in fecundity of mountain hares. *Proceeding of the Royal Society, London Series B (Suppl.)*, 217: S413-S415.

Newey S., Willebrand T., Haydon D.T., Dahl F., Aebischer N.J., Smith A.A., Thirgood S.J., 2007. Do mountain hare populations cycle? *Oikos* 116:1547-1557.

Novoa C., Besnard A., Brenot J.F., Ellison L.N., 2008. Effect of weather on the reproductive rate of rock ptarmigan *Lagopus muta* in the eastern Pyrenees. *Ibis*, 150: 270-278.

Park, S.D.E., 2001. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. PhD thesis. University of Dublin.

Parisini M., Osservatorio sulla fauna selvatica della Regione Piemonte, Istituto per le piante da legno e l'ambiente, SPA, 2008. La nostra fauna. I galliformi alpini. Regione Piemonte, Assessorato Agricoltura, Tutela della Fauna e della Flora, Direzione Agricola, Osservatorio regionale fauna selvatica. Torino.

Pecchioli E., Vernesi C., Crestanello B., Davoli F., Caramelli D., Bertorelle G., Hauffe H.C., 2006. Conservazione e gestione della fauna: un approccio genetico. Progetto FAUNAGEN, report 35.

Peterson R., Mountfort G., Hollom P.A.D. (Eds.), 1998. Guida degli uccelli d'Europa. Franco Muzio Editore, Padova.

Piertney S. B., Höglund J., 2001. Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes*, 1: 303-304.

Posada D. & Crandall K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitutions. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945-959.

Protocol: Isolation of DNA from Stool for Human DNA Analysis. QIAamp DNA Stool Handbook 07/2007

Protocol: Isolation of DNA from Stool for Human DNA Analysis. QIAamp DNA Stool Handbook, 04/2010, 22-25.

Protocol: Isolation of totale DNA from Nail Clippings and Hair. QIAamp DNA Investigator Handbook, 12/2007, 30-32.

Randi E., Lucchini V., 1998. Organisation and evolution of the mitochondrial DNA control region in the Avian genus *Alectoris*. *Journal of Molecular Evolution*, 47: 449-462.

Regnaut S., Lucas F.S., Fumagalli L., 2006. DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations. *Conservation Genetics*, 7: 449-453.

Sandercock B.K., Martin K., Hannon S.J., 2005. Life history strategies in extreme environments: comparative demography of arctic and alpine ptarmigan. *Ecology*, 86(8): 2176-2186.

Scandura M., Cossu A., Iacolina L., 2008. Indagine conoscitiva per il monitoraggio non-invasivo di una popolazione di lepre variabile (*Lepus timidus*). Dipartimento di zoologia e genetica evolutiva, Università degli studi di Sassari. Programma Interreg IIIA, Italia-Francia (Alpi) 2000-2006. Progetto n.194 Gestalp: Modelli di gestione per la valorizzazione della biodiversità nel territorio alpino transfrontaliero.

Segelbacher G., Paxton R.J., Steinbruck G., Trontelj P., Storch I., 2000. Characterization of microsatellites in capercaillie Tetrao urogallus (AVES). *Molecular Ecology*, 9:1919–1952.

Segelbacher G., 2002. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Molecular Ecology Notes*, 2: 367-369.

Segelbacher G., Höglund J., Storch I., 2003. From connectivity to isolation: genetic consequence of population fragmentation in capercaillie across Europe. *Molecular Ecology*, 12: 1773-1780.

Sergio F., Pedrini P., 2007. Biodiversity gradients in the Alps: the overriding importance of elevation. *Biodiversity Conservation*, 16: 3243-3254.

Sahlman T., Segelbacher G., Höglund J., 2009. Islands in the ice: colonization routes for rock ptarmigan to the Svalbard archipelago. *Ecography*, 32: 840-848.

Spangesi M., Serra L. (a cura di), 2004. Uccelli d'Italia. Quaderno della Conservazione della Natura, 21: 80-81. Ministero dell'Ambiente – Istituto Nazionale Fauna Selvatica.

Storch I., 2007. Grouse: Status Survey and Conservation Action Plan 2006–2010. Gland, Switzerland: IUCN and Fordingbridge, UK: World Pheasant Association: 114.

Surridge A.K., Bell D.J., Rico C., Hewitt G.M., 1997. Polymorphic microsatellite loci in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other lagomorph species. *Animal Genetics*, 28: 302–305

Taberlet P., Griffin S., Goossens B. Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Molecular Ecology*, 6: 869-876.

Tamura, K., Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10:512-526.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.

Thulin C.G., Isaksson M., Tegelström H., 1997. The origin of Scandinavian mountain hares (*Lepus timidus*). *Game Wildlife* 14: 463-475.

Thulin C.G., 2003. The distribution of mountain hares *Lepus timidus* in Europe: a challenge from brown hares *L. euopaeus*? *Mammal Society, Mammal Review*, 33:1,29-42.

Thulin C.G., Tegelström H., Fredga K., 2003. Haplotype diversity of mountain hare mtDNA among native mountain hares and introduced brown hares in Scandinavia. *Annales Zoologici Fennici*, 40:54-52.

Thulin C.G., 2003. The distribution of mountain hares *Lepus timidus* in Europe: a challenge from brown hares *L. europaeus*? *Mammal Review*, 33(1): 29-42.

Trocchi V., Riga F. (a cura di), 2005. I Lagomorfi in Italia. Linee guida per la conservazione e la gestione. Min. Politiche Agricole e Forestali. Istituto Nazionale Fauna Selvatica, Documenti Tecnici, 25:1-128.

Wanng L.C., Chen C.T., Lee H.Y., Li S.H., Lir J.T., Chin S.C., Pu C.E., Wang C.H., 2007. Sexing a wider range of avian species based on two CHD1 introns with a unified reaction condition. *Zoo Biology*, 26:425–431.

Weir B.S., Cockerham C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6): 1358-1370.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*, 4th edition. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall

Zhan X., Zheng X., Bruford M.W., Wei F., Tao Y., 2010. A new method for quantifying genotyping errors for noninvasive genetic studies. *Conservation Genetics*, 11: 1567-1571.

Zohmann M., Wöss M., 2008. Spring density and summer habitat use of alpine rock ptarmigan *Lagopus muta helvetica* in the southeastern Alps. *European Journal of Wildlife Research*, 54: 379-383.

9. SITOGRAFIA

<http://www.bighunter.it/Portals/0/Allegati/pernice%20bianca.pdf>. Pernice bianca *Lagopus mutus*. Dossier dell'ISPRA relativo allo stato di conservazione delle specie oggetto di prelievo venatorio in Italia, gennaio 2009.

<http://www.campagnalipu.it>. LIPU, 2009.

<http://lipu.it/news/no.asp?892>. Cambiamenti climatici: il caldo colpisce le Alpi e la pernice bianca rischia l'estinzione. Al via la campagna Lipu per salvare cinque specie: nell'elenco anche Capovaccaio, berta maggiore, tarabuso e gallina prataiola. LIPU, 2009.

http://www.creaf.uab.es/eng/projects/27_432.htm. Claramunt B. Impact assessment of Alpine marmot (*Marmota marmota*) expansion on Ptarmigan (*Lagopus muta*) population. CREAM.

<http://www.interreg-alcotra.com>. ALCOTRA, 2007-2013.

<http://www.iuncredlist.org/apps/redlist/details/141362/0>. IUNC, 2010.

http://www.parcobarro.lombardia.it/_parco/areeprotette/specie/lepal/scheda.rtf. Carlini E.. Lepre alpina. Parco Monte Barro, Regione Lombardia.

http://www.wwf.it/UserFiles/File/News%20Dossier%20Appti/DOSSIER/comunicati%20stampa/2009_6_17_pernice.pdf. WWF: stop alla caccia alla pernice bianca. Appello alle Province per la prossima stagione venatoria. 17 giugno 2009.

10. RINGRAZIAMENTI

A conclusione della mia tesi, desidero tanto ringraziare tutte le persone che hanno reso possibile questo grande traguardo.

Quest'anno di tirocinio è stato senza dubbio il più intenso e gratificante del mio percorso di studi. Ho imparato molto dalla mia esperienza in laboratorio e sul campo: ho appreso tecniche, metodo, conoscenze in vari ambiti; ma sono anche cresciuta molto imparando cosa vuol dire organizzare il proprio lavoro, collaborare, affrontare e superare dei propri limiti.

Grazie a Cristiano per avermi dato la possibilità di questo tirocinio.

Ringrazio Barbara per i tuoi insegnamenti e la pazienza.

Grazie a Matteo, Chiara, Margherita, Alexis, Luca, Fausta e Francesco per il vostro aiuto in quest'anno e mezzo di tirocinio ma soprattutto per la vostra simpatia, compagnia e amicizia.

Grazie ad ogni persona che lavora al centro di Ecologia Alpina perché in un modo o nell'altro avete reso più bello il mio lavoro in Bondone.

Grazie al mio relatore, il Dr. Lorenzo Zane, per avermi introdotta a questo tirocinio e per la grande disponibilità.

Questo tirocinio è stato in parte condotto sul campo, e mi ha permesso in questo modo di realizzare il sogno di poter lavorare sulle mie montagne bellunesi per la tutela e la protezione degli animali.

Devo ringraziare per questa opportunità il settore Tutela e Gestione della Fauna e delle Risorse Idriche della Provincia, l'Ente Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi, il Corpo Forestale dello Stato e i cacciatori del bellunese.

Grazie infinite agli Agenti della Polizia Provinciale che mi hanno accompagnata nelle uscite insegnandomi tantissime cose del meraviglioso territorio in cui vivo. In particolare un grande grazie a Roberto, Sergio, Maurizio, Mario, Mirco, Elvi e Daniele.

Grazie a Lorenzo e a Vittorio per la vostra passione per la natura e le foto che mi avete inviato, alcune delle quali sono inserite in questo lavoro.

Ed ora il mio più grande grazie alle persone speciali della mia vita perché con la vostra presenza e il vostro amore mi avete sempre sostenuta in questi anni.

Grazie a mamma e papà per il vostro amore, appoggio e per avermi permesso tutto questo!

Grazie Laura, perché sei la mia splendida e unica sorellina!

Grazie Fede, per il tuo amore, la tua presenza e la tua fiducia in me.

Grazie a nonna Ines per avermi sempre spronata e per il tuo sempre sincero e appassionato interesse per i miei progressi!

Grazie ai miei grandi amici: Vale, Simo, Cinzia, Dile, Elena, Cate, Alice, Michele, Adri, Irene, Chiara, Vale e Marta. Tengo tantissimo alla vostra amicizia e vi ringrazio perché rendete la mia vita ancor più divertente e piena!

Grazie ai miei cugini Chiara, Matteo, Martino, Francesco, Michele e Chiara; e agli zii: zia Anna, zio Albino, zia Donni, zio Claudio, zia Mirca, zio Alvise; a Piera, a Vittorio, ad Alessandra, Michele e la piccola Miriam.

Grazie a Silvia, Marghe, Elisa, Luca, Magi, Giulia, Simone e Betta, per le belle esperienze che condividiamo insieme.

Grazie in ricordo alla nonna Dedu e al nonno Angelin.

Grazie in ricordo a Gluck.

Grazie al Signore, per la Tua presenza, il Tuo amore e sostegno in questi anni di studio...e molto di più.

Grazie a tutti, e a tutti voi dedico questa tesi!