

Esame di Monitoraggio delle Comunità Biologiche

Modulo di Genetica della Conservazione

***“La popolazione di lupo appenninico italiano:
isolamento e ibridazione
con il cane domestico”***



Tesina di [REDACTED]

Gennaio 2010

<u>1. INTRODUZIONE</u>	3
<u>2. L'ISOLAMENTO DELLA POPOLAZIONE DI LUPO ITALIANO</u>	5
<u>2.2. La popolazione di lupo italiano è geneticamente distinta dalle altre?</u>	5
<u>2.2. Da quando inizia l'isolamento della popolazione del lupo italiano?</u>	8
<u>3. IBRIDAZIONE TRA LUPO E CANE DOMESTICO</u>	10
<u>3.1. “Bayesian admixture analyses” della variazione dei microsatelliti</u>	11
<u>3.2. “Admixture linkage disequilibrium analysis”</u>	14
<u>4. CONCLUSIONI: POSSIBILI STRATEGIE PER LA CONSERVAZIONE</u>	16
<u>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</u>	18

1. Introduzione

Il lupo (*Canis lupus*) è un animale altamente adattabile che si distribuisce in ecosistemi anche estremamente diversi tra di loro (dalla tundra Artica al deserto Arabico). La sua particolare etologia implica, tuttavia, che la persistenza delle popolazioni in un dato luogo sia legata ad un'ampia disponibilità di risorse trofiche e spaziali.

Osservazioni dirette e studi genetici sulle popolazioni indicano che i lupi possono espandersi anche attraverso notevoli distanze (Fritts 1993; Forbes & Boyd 1996; Vilà et al. 1999; Walton et al. 2001, citati da Lucchini, Galov & Randi 2004).

Tuttavia esistono delle barriere (antropogeniche o anche costituite da tratti fisiografici permanenti) che comportano la frammentazione dell'habitat del lupo e che possono limitare la dispersione degli individui e il flusso genetico. Ad esempio il lupo non si espande nel paesaggio agricolo.

I lupi si sono diffusi presumibilmente in tutta l'Eurasia nell'Olocene. La persecuzione dell'uomo, la deforestazione e la diminuzione delle prede ha portato al declino della popolazione di lupo in Europa durante l'ultimo secolo. Sono sopravvissute popolazioni consistenti nei Balcani e nell'Europa dell'Est, mentre la specie era stata eradicata nell'Europa centrale e in Scandinavia e sopravviveva solo in popolazioni frammentate nella penisola iberica e in Italia. I lupi scomparvero dalle Alpi negli anni '20 del secolo scorso e subirono un drastico declino in Italia nei due decenni successivi alla Seconda Guerra Mondiale. Nel 1973 rimanevano circa 100 individui, isolati nell'Appennino centrale (*Canis lupus italicus*), in una superficie di 8.500 km² (Boitani, 1984). La protezione legale successivamente introdotta e l'espansione delle popolazioni di prede naturali, hanno contribuito a fermare il declino del lupo ed un successivo censimento del 1983 verificò la presenza di 220 lupi in un'area totale di 13.500 km², indicando un notevole incremento sia nel numero di individui che nell'area di distribuzione in appena un decennio.

Successivamente il lupo si è espanso rapidamente nell'arco appenninico (Figura 1), ricolonizzando l'Italia occidentale e le Alpi francesi. Ciucci & Boitani (1991, citati in Lucchini, Galov & Randi 2004) hanno stimato un aumento annuale della popolazione del 7% dal 1973 al 1988, ipotizzando che il numero di individui di lupo in Italia fosse di circa 600.



Fig 1. Distribuzione del lupo appenninico nella penisola italiana. disegno basato sui dati della società di ricerche svizzera Kora (<http://www.kora.unibe.ch/>), raccolti su mandato dell'Ufficio federale svizzero dell'ambiente delle foreste e del paesaggio (Office fédérale de l'environnement, des forêts et du paysage - UFAFP) aggiornati all'agosto 2005. Fonte: www.wikipedia.org

Il lupo italiano rappresenta quindi una popolazione ridotta e frammentata che può andare incontro a due importanti problemi per la sua conservazione:

- perdita di diversità genetica
- ibridazione con il cane domestico (*Canis lupus familiaris*)

Il primo ordine di problemi è tipico delle piccole popolazioni.

Le piccole popolazioni sono inclini a gravi perdita di fitness e di potenziale evolutivo, tanto da poter essere soggette ad estinzione, nel breve o lungo periodo.

Nelle piccole popolazioni la deriva genetica è più intensa, dal momento che ogni generazione porta solo una frazione del pool genetico totale della generazione precedente: questo processo è la causa di un aumento dell'omozigosità e della graduale perdita di variabilità genetica, a prescindere dai processi concomitanti di selezione e mutazione.

È stato chiaramente dimostrato che esiste una correlazione diretta tra eterozigosità e fitness in una popolazione: ad una diminuzione di eterozigosità corrisponde una graduale diminuzione della fitness.

Effetto del fondatore, isolamento e prolungati bassi tassi di flusso genetico possono ridurre la diversità genetica e il potenziale di adattamento, aumentando nel contempo l'inbreeding e la probabilità di estinzione della popolazione colonizzatrice (Hedrick & Kalinowski 2000, citato in Fabbri et al. 2007)

Franklin (1980, citato da Boitani, 1984) individua tre effetti principali che possono essere osservati a livello fenotipico come conseguenza della deriva genetica:

1. una diminuzione della variabilità genetica che porta ad una ulteriore perdita di fitness
2. cambiamenti casuali nel fenotipo, soprattutto cambiamenti nella media dei tratti quantitativi, che suggerisce un più veloce tasso di evoluzione nelle popolazioni altamente frazionate;
3. depressione da inincrocio

In condizioni di inincrocio i tratti che possono essere maggiormente condizionati sono quelli dominanti, a favore di quelli recessivi che possono essere fissati. Quando un numero eccessivo di alleli recessivi è deleterio, l'espressione fenotipica dei geni recessivi può sfociare in una riduzione della fitness. Infatti i primi tratti con dominanza ad essere modificati sono quelli legati alla riproduzione e ci si può attendere che la progenie abbia una significativa riduzione della fertilità, fecondità, numero della prole: di conseguenza dalla linea di discendenza della prole inincrociata ci si dovrà attendere un minore tasso di crescita della popolazione.

La depressione da inincrocio può portare alla fissazione di alleli deleterei recessivi, ad un tasso più veloce di quello con cui può comportarne la perdita.

L'ibridazione rappresenta l'altro aspetto fondamentale da considerare per la conservazione del lupo italico. L'ibridazione può produrre cambiamenti morfologici, fisiologici e comportamentali. Inoltre, l'ibridazione e l'introggressione di geni dalle specie domestiche può minacciare l'integrità del pool genetico delle specie selvatiche (Boitani 1984; Gottelli et al. 1994, citato in Randi e Lucchini 2002).

Lupi e cani domestici hanno cariotipi identici e sono interfertili.

Studi genetici e paleontologici indicano infatti che il cane discenda dal lupo grigio (*Canis lupus lupus*) e che possa essere considerato una sottospecie del *Canis lupus* (*Canis lupus familiaris*).

Il processo di domesticazione del cane ha fatto sì che il suo habitat diventasse sostanzialmente differente da quello del lupo. Tuttavia, il *Canis lupus familiaris* ha mantenuto attraverso i secoli tratti eco-etologici molto simili a quelli dei lupi selvatici. In condizioni di randagismo, dunque, l'etologia del cane non si discosta da quella del lupo.

L'ibridazione tra specie differenti (o tra sottospecie appartenenti alla stessa specie) avviene quando si verifica un contatto tra popolazioni diversificate geneticamente in condizioni di allopatria, a seguito della caduta della barriera (geografica od etologica) che le teneva separate.

Il rischio di ibridazione naturale (cioè non in condizioni di cattività) è più alto nelle aree in cui una specie localmente è meno abbondante ed è affine ad un'altra specie (o sottospecie) notevolmente

più numerosa. I lupi che vivono alla periferia del loro areale di distribuzione, a volte in aree di recente colonizzazione, sono rari e quindi più soggetti all'incrocio con i cani randagi.

Caratterizzare bene da un punto di vista genetico la popolazione del lupo Italiano diventa quindi fondamentale al fine di poter mettere in atto le strategie più adeguate per la sua conservazione.

2. L'isolamento della popolazione di lupo italiano

Per risolvere i problemi legati alla conservazione del lupo in Italia bisogna prima rispondere a due domande: siamo davvero di fronte ad una popolazione geneticamente distinta dalle altre popolazioni di lupo presenti in Europa e nei paesi del Mediterraneo? E ancora, se si tratta di una popolazione distinta ed isolata, a quanto tempo indietro si può far risalire tale isolamento?

Conoscere le dinamiche della popolazione, attraverso le informazioni ricavabili dagli studi genetici, diviene essenziale per capire quali sono i processi reali che hanno portato alla attuale struttura e consistenza della popolazione di lupo in Italia.

2.2. La popolazione di lupo italiano è geneticamente distinta dalle altre?

Per rispondere a questa domanda, lo studio portato avanti da Lucchini, Galov e Randi (2004) ha analizzato 384 campioni di lupi e cani provenienti da 11 regioni in Europa, Turchia, Israele e Arabia Saudita, come mostra la Tabella 1. I cani sono stati campionati casualmente da 30 differenti razze, includendo cani randagi provenienti dal centro Italia. Sono stati inoltre inclusi nello studio ibridi di origine nota.

Tabella 1 Origine e numero dei campioni di Lupi e Cani utilizzati nello studio citato di Lucchini, Galov e Randi (da Lucchini Galov e Randi, 2004)

Group	Origin	Samples	Collectors
Wolves	Turkey	4	C. Vilà, Uppsala University, Uppsala, Sweden
	Spain	32	C. Vilà; J. C. Blanco, Madrid, Spain
	Bulgaria	39 (5 dogs)	P. Genov, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria
	Croatia	28 (3 dogs; 1 hybrid)	D. Huber, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
	Israel	4 (1 hybrid)	G. Kahila, Hebrew University, Jerusalem, Israel
	Finland	13	I. Gade-Jorgensens and R. Stagegaard, Copenhagen, Denmark
	Greece	6	Y. Mertzanis, Thessaloniki, Greece
	Latvia	47 (9 hybrids)	Z. Andersone, Kemer National Park, Jurmala, Latvia
	Italy	105 (2 hybrids)	INFS, Bologna, Italy
	Saudi Arabia	10	C. Vilà
Dogs	Switzerland	72	G. Dolf, University of Berne, Berne, Switzerland
	Italy	23	INFS

Presumptive wolves were phenotypically identified by collectors. Bayesian admixture analyses of microsatellite genotypes showed that some presumptive wolves (in brackets) were mislabelled dogs or hybrids with dogs.

È stato analizzato il genotipo di tutti gli esemplari di cane e lupo esaminati utilizzando un gruppo di 18 loci microsatelliti canini, assegnati a 16 differenti cromosomi.

Utilizzando GENETIX 4.04, il lavoro di Lucchini Galov e Randi (2004) ha stimato la differenza statistica tra le popolazioni. In particolare, i campioni di lupo italiano sono stati suddivisi in 20 sottocampioni casuali, ciascuno di 30 individui, ovvero di dimensione media simile a quella dei campioni di lupo europeo utilizzate nel medesimo studio. I sottocampioni sono stati utilizzati per stimare l'eterozigosità attesa (H_E) nei corrispondenti campioni di lupo non italiano.

Tutti i 18 microsatelliti erano polimorfici nei lupi e nei cani (con l'eccezione di 5 loci monomorfici nel piccolo campione dell'Arabia Saudita). Utilizzando il programma STRUCTURE (con $n=383$, 18 loci e utilizzando solo informazioni genetiche) è emerso che la più alta probabilità a posteriori dei dati era ottenuta dividendo l'intero campione in 7 cluster.

Tutti i cani risultano assegnati ad un unico cluster (IV) con una probabilità di appartenenza $q_{IV}=0.941$ e sono distinti dai lupi. I lupi campionati in Turchia, Spagna Grecia, Italia e Arabia Saudita sono assegnati a cluster distinti (rispettivamente II, VII, III, V e I).

La differenziazione tra popolazioni è stata valutata attraverso il Fisher's exact test, F_{ST} e l'analisi della varianza molecolare (ANOVA).

Sugli 8 gruppi di campioni individuati (vedi tabella 2, in cui alcune provenienze sono state accorpate per risolvere il problema del basso numero di individui per campione), il valore della media dei multiloci $F_{ST} = 0.23$ mostra che la diversità genetica è ripartita in maniera significativa tra i gruppi.

L'analisi della corrispondenza fattoriale mostra che tutti i lupi italiani sono distinti e raggruppati separatamente dagli altri lupi (Figura 2).

Tale distinzione è confermata dall'albero dei "gruppi vicini" (neighbour-joining), che mostra tutti i lupi italiani raggruppati in un unico cluster, distinto da tutti gli altri lupi e dai cani (Figura 3).

Tabella 2. Diversità genetica nei campioni di cane e lupo in 18 loci microsatelliti. (da Lucchini Galov e Randi, 2004)

Origin of samples	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>na</i>	<i>H_O</i> (SD)	<i>H_E</i> (SD)	<i>F_{IS}</i> (95% CI)
Wolves						
Spain	32	4.7	4	0.50 (0.16)	0.60 (0.14)	0.17 (0.08 to 0.22)*
Italy	103	4.4	0	0.44 (0.21)	0.49 (0.22)	0.10 (0.06 to 0.14)*
Croatia	24	5.4	5	0.63 (0.12)	0.69 (0.11)	0.09 (-0.02 to 0.14)*
Greece + Bulgaria	39	6.8	6	0.69 (0.13)	0.73 (0.10)	0.06 (-0.01 to 0.10)*
Turkey + Israel	7	3.7	2	0.66 (0.21)	0.67 (0.10)	0.00 (-0.32 to 0.08)
Saudi Arabia	7	2.4	2	0.48 (0.36)	0.42 (0.29)	-0.14 (-0.45 to -0.11)
Latvia	38	6.8	2	0.71 (0.09)	0.73 (0.08)	0.03 (-0.03 to 0.06)
Finland	13	5.5	3	0.69 (0.13)	0.73 (0.07)	0.06 (-0.13 to 0.10)
Total	263	9.2		0.56 (0.09)	0.72 (0.08)	0.23 (0.21 to 0.25)*
Dogs	92	7.9	15	0.51 (0.14)	0.67 (0.17)	0.24 (0.19 to 0.28)*

Wolves from Greece and Bulgaria, and from Turkey and Israel were pooled to avoid low sample sizes. *N* = mean number of genotyped individuals per locus; *A* = mean number of alleles per locus; *na* = number of unique alleles found in a group when it is compared to all the other groups (an allele is considered as unique if it is present at frequency $f \geq 0.01$ in a group). *H_O* and *H_E* = observed and expected heterozygosity (SD = one standard deviation). Values of the fixation index *F_{IS}* are reported with their 95% confidence intervals (CI). The asterisks (*) indicate significant ($P \leq 0.01$) departures from Hardy-Weinberg equilibrium, as estimated using GENEPOP.

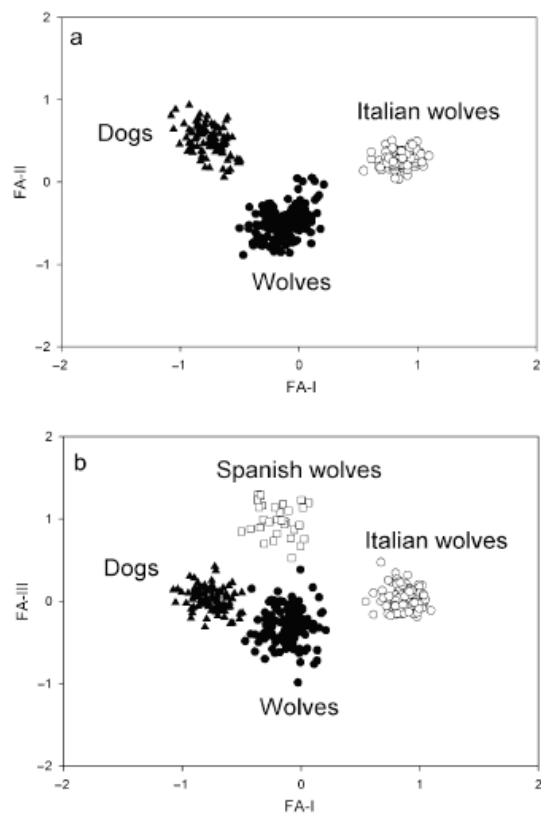


Figura 2. Analisi di corrispondenza tra fattori, calcolata utilizzando GENETIX, che mostra la relazione tra genotipi multilocus di lupi individuali. FA-I, FA-II (a) e FA-III (b) sono, rispettivamente, il primo, il secondo e il terzo fattore principale di variabilità (da Lucchini Galov e Randi, 2004).

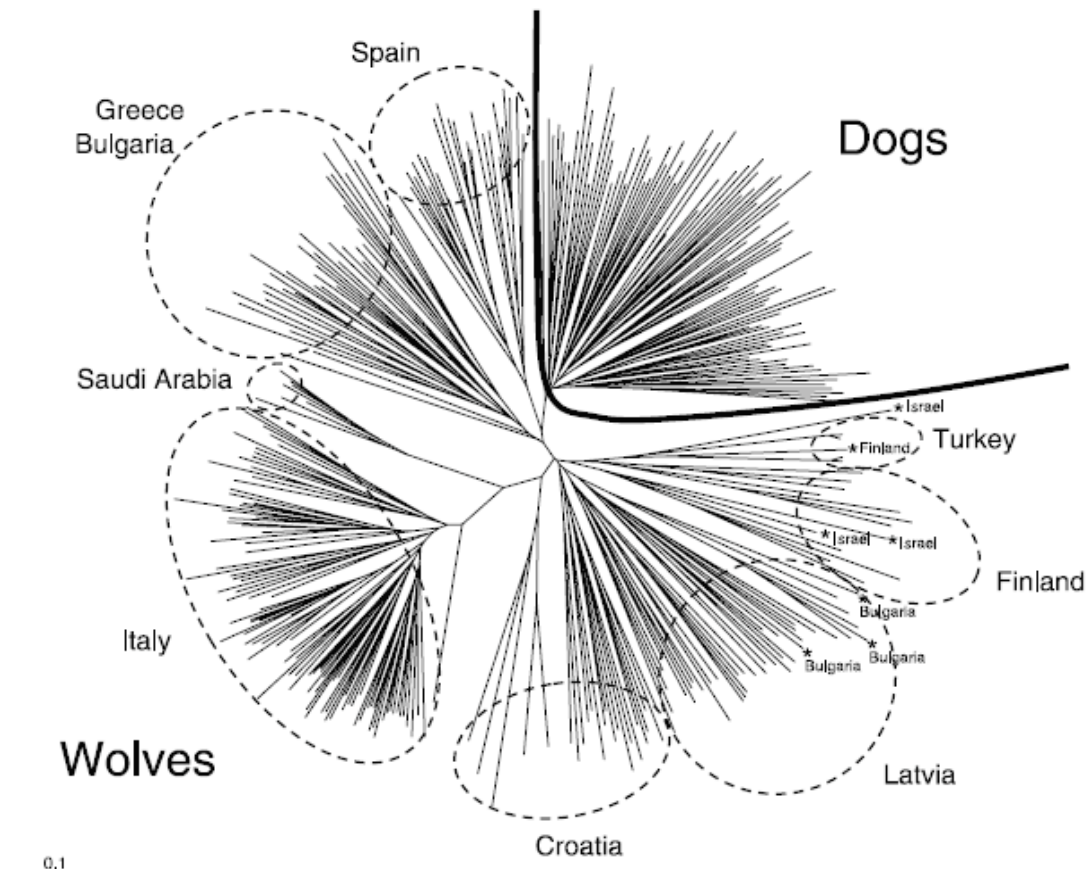


Figura 3. "Unrooted neighbour-joining tree" calcolato con PHYLIP usando distanza genetica (1-ps) tra genotipi individuali microsatelliti multilocus. I cluster di cani e lupi, e i principali cluster di lupo riconoscibili sono indicati con una linea spessa o con un ellisse (da Lucchini Galov e Randi, 2004).

2.2. Da quando inizia l'isolamento della popolazione del lupo italiano?

Lo stesso studio di Lucchini, Galov e Randi (2004), attraverso l'analisi del DNA di mitocondri e microsatelliti, mostra che i lupi nella penisola italiana hanno una bassa variabilità rispetto agli altri lupi europei, dai quali, come mostrano nel precedente paragrafo della presente relazione, sono geneticamente distinti.

Lo studio di Lucchini et al. (2004) ha analizzato due diversi scenari ipotetici relativi all'isolamento del lupo dell'Italia peninsulare. Il primo scenario ipotizza che l'isolamento sia avvenuto migliaia di anni fa, come conseguenza di un cambiamento naturale nel paesaggio conseguente all'ultima glaciazione del Pleistocene. I ghiacciai che coprivano le Alpi e l'ampia espansione del fiume Po, che ha creato la pianura alluvionale durante l'Olocene, ha probabilmente isolato i lupi nell'Appennino centro-meridionale dall'ultimo Glaciale-Massimo (18.000 anni fa).

L'altra ipotesi considera un isolamento avvenuto più di recente, come conseguenza della deforestazione provocata dall'uomo (già diffusa nel quindicesimo secolo nel nord Italia) e dell'eradicazione della specie dalle Alpi (anche a seguito della persecuzione diretta da parte dell'uomo), che avrebbe portato a limitare il flusso genetico con le altre popolazioni di lupo europeo durante gli ultimi secoli.

Entrambe le ipotesi prevedono la presenza di un collo di bottiglia (bottleneck).

I bottlenecks possono produrre segnali genetici distintivi nella distribuzione degli alleli, nella eterozigosità attesa e nella genealogia dei loci microsatelliti (Cornuet & Luikart 1996; Beaumont 1999; Garza & Williamson 2001, citati in Lucchini et al. 2004).

Un bottleneck test basato sulla distribuzione di frequenza della dimensione degli alleli microsatelliti, mostra l'allontanamento dall'equilibrio "deriva-mutazione" nel lupo italiano, ma non altrove in Europa.

Le prove di cambiamenti demografici storici sono state indagate attraverso la procedura MSVAR.

Il modello di Beaumont implementa un approccio Bayesiano in cui i dati e i parametri sono variabili casuali che hanno qualche distribuzione comune che può essere esplicitamente modellizzata. La prima distribuzione dei parametri e la distribuzione condizionale dei dati rispetto ai parametri permette la stima delle distribuzioni a posteriori attraverso il teorema di Bayes. L'MSVAR utilizza un modello di mutazione "passo-passo" e stima la distribuzione di probabilità a posteriori del tasso di cambiamento della popolazione $r=N_0/N_1$ (dove N_0 è il numero effettivo attuale di assetti cromosomici aploidi e N_1 è il numero di assetti cromosomici aploidi al tempo in cui la popolazione ha subito declino o espansione), il tempo in generazioni in cui la popolazione ha iniziato ad espandersi o declinare è espresso come $tf=ta/N_0$ (dove ta è il numero di generazioni dall'inizio dell'espansione/declino), e il parametro genetico $\mu = 2N_0\mu$.

Il modello assume che i parametri demografici siano identici per i vari loci, sebbene il tasso di mutazione sia libero di variare.

La procedura MSVAR è stata utilizzata per analizzare l'intero campione ($n=103$) e i 20 sottocampioni casuali ($n=30$) di lupi italiani. Sono inoltre stati analizzati i campioni provenienti dalle altre aree. Cinque simulazioni indipendenti per ciascun campione hanno mostrato risultati concordi che mostrano che per i campioni i quantili al 5% e 95% della distribuzione a posteriori dei due parametri demografici $\log_{10}(r)$ e $\log_{10}(tf)$ sono più bassi rispetto ai valori a priori. La distribuzione a posteriori $\log_{10}(r)$ dai campioni di lupo italiano ha i quantili 5% e 95% nella regione negativa del plot, il che indica un netto declino nella popolazione. Il quantile 50% di $\log_{10}(r)$ è negativo sia nel campione completo che in ciascuno dei 30 sottocampioni di lupo italiano. I valori a posteriori di $\log_{10}(tf)$ sono nettamente positivi, indicando un antico declino nel lupo in Italia.

Un valore di $r=0.008$, calcolato all'antilogaritmo del 50% quantile, indica un declino di 125 volte (range = 33.5-500.0) nella popolazione attuale (N_0) rispetto all'ancestrale (N_1) di lupo italiano. La contrazione delle popolazioni di lupo è iniziata a $ta=15.8 N_0$ (range = 5.2-57.5) generazioni fa.

L'analisi bayesiana dei microsatelliti supporta quindi con alta probabilità l'ipotesi di un forte declino o isolamento per i lupi in Italia molto più antico che poche centinaia di generazioni. Sulla base dei dati disponibili, dei modelli utilizzati e delle assunzioni fatte, i risultati suggeriscono che la popolazione di lupi in Italia è diminuita più di 100 volte in dimensione durante le ultime migliaia di anni. Tali risultati sono incompatibili con un singolo bottleneck nell'ultimo secolo.

Una popolazione contratta con $ta=15.8N_0$ generazioni fa sarebbe congruente con le informazioni storiche solo se $N_0=2$ assetti cromosomici aploidi che corrisponde ad un solo individuo al bottleneck. Anche se si assume che i lupi nell'Appennino fossero effettivamente isolati negli ultimi due secoli, come risultato del declino della popolazione delle Alpi, sarebbe necessario ipotizzare una dimensione effettiva di popolazione estremamente bassa, di $N_e=2-4$ per secolo, che non è realistico.

In accordo con le informazioni storiche, il più recente collo di bottiglia è stato corto (circa 10 anni, corrispondenti a circa tre generazioni di lupo, dagli anni '60 ai '70), ed apparentemente non forte, in quanto circa 100 lupi sopravvissero. I dati di censimento e l'inferenza del mtDNA suggeriscono che un valore di $N_e/N = 0.2-0.4$ può essere appropriato per il lupo italiano al più recente collo di bottiglia. In ogni caso, i parametri demografici della popolazione di lupo italiano sono sconosciuti e una stima affidabile di N_e non può essere ottenuta direttamente, usando dati indipendenti di natura non genetica.

Esiste una sensibilità rispetto alla dimensione del campione nell'analisi: con un campione di $n=103$ viene indicata una riduzione di 125 volte nella popolazione attuale rispetto all'ancestrale, iniziando da $ta = 15.8 N_0$ generazioni fa, che corrisponde a circa 2000-4000 anni fa. Al contrario, i sottocampioni con $n=30$ indicano una diminuzione di 1000 volte in N_0 al tempo $ta = 79.4 N_0$, che corrisponde a circa 9000-19.000 anni fa. L'effetto della dimensione del campione sull'analisi MSVAR è sconosciuto dal momento che non esistono studi che mostrano la tipologia di correlazione tra dimensioni del campione e valori a posteriori dei parametri. Tuttavia, i risultati ottenuti usando un piccolo campione supportano ulteriormente l'idea di un modello a lungo termine del declino della popolazione di lupo italiano.

Spiegare la distribuzione osservata della diversità di microsatelliti nell'attuale popolazione di lupo in Italia in termini di un recente isolamento (circa un secolo) e del collo di bottiglia (circa 100 individui per circa tre generazioni) è più difficile rispetto allo scenario alternativo che suggerisce un più antico isolamento e/o bottlenecks.

3. Ibridazione tra lupo e cane domestico

Nel 1983 Boitani & Fabbri stimavano la presenza in Italia di 850.000 cani randagi, di cui 80.000 potevano essere considerati selvatici (Boitani 1984). Gli stessi autori affermano che durante l'ultimo bottleneck il numero di cani randagi era cresciuto drammaticamente, aumentando il rischio di ibridazione. Nel 2000, la popolazione di lupo in Italia era stimata essere di circa 500 individui, mentre i cani almeno in parte liberi di muoversi nelle aree rurali superavano il milione (Corsi et al. 1999; Genovesi and Dupré 2000, citati in Randi e Lucchini, 2002)

Questi cani hanno lo stesso range di distribuzione del lupo, innescando inevitabilmente competizione e incrocio.

Esistono differenti metodi per valutare l'ibridazione.

L'mtDNA ereditato per via materna è un marker altamente diagnostico dell'ibridazione, in quanto nessuna popolazione di lupi nel mondo condivide aplotipi con qualche tipo di cane. L'mtDNA ereditato per via materna può identificare solo gli ibridi derivanti dall'incrocio di femmine di cane e maschi di lupo. I dati genetici e comportamentali indicano che l'ibridazione nei canidi è generalmente asimmetrica, ma la direzione predominante dell'accoppiamento e del flusso genetico può cambiare a seconda delle specie o delle popolazioni che interagiscono (Randi e Lucchini, 2002). Ad esempio, in nord America, nelle zone in cui vi è sovrapposizione di areali tra lupo e coyote, i lupi ibridizzati presentano mtDNA del tipo di quello del coyote e le frequenze alleliche mostrano introgressione, mentre le frequenze alleliche del coyote non presentano variazioni. La direzione prevalente, in questo caso è da coyote a lupo, con accoppiamento di femmine di coyote con maschi di lupo.

In generale, i dati e le osservazioni del DNA mostrano che prevalentemente sono le femmine di lupo ad accoppiarsi con maschi di cane randagio (Boitani 1982; Randi et al. 2000, citati in Randi e Lucchini 2002).

Un'altra spiegazione del fatto che le analisi dell'mtDNA falliscono nel rilevare l'introgressione del mtDNA canino nelle popolazioni di lupo può essere data dal fatto che gli ibridi di prima generazione (F1) sono incapaci di tornare nella popolazione di lupo.

I motivi di tale incapacità sono molteplici. In primo luogo, le femmine gravide di lupo accoppiate con cani non sono accettate nel branco di origine: quindi la loro prole quindi spesso non sopravvive (alto tasso di mortalità infantile) o comunque non si integra nella popolazione originale (Smith et al. 1997; Vilà and Wayne 1999 citati in Randi e Lucchini 2002).

Inoltre, negli ibridi il periodo di accoppiamento è spostato rispetto a quello del lupo e questo restringe ulteriormente le possibilità di un reintegro nella popolazione di lupo (Randi e Lucchini 2002).

L'ibridazione nei canidi è stata documentata principalmente attraverso la genotipizzazione dei microsatelliti. Questi marker genetici biparentali sono in genere sufficientemente variabili da consentire una identificazione inequivocabile di tutti gli individui campionati nella popolazione. In questo caso, gli individui, e non le popolazioni, possono essere usati come unità per la procedura di clusterizzazione, con l'ordinamento multivariato di punteggi individuali, o attraverso un approccio basato sulla distanza.

Metodi più efficienti comprendono la procedura di assegnazione della massima probabilità e i modelli di cluster Bayesiano. In tali procedure, i genotipi individuali possono essere assegnati ad una popolazione indipendentemente dal fatto che la loro possibile popolazione di origine sia conosciuta. L'origine degli individui può essere determinata calcolando la probabilità di ciascun genotipo multilocus individuale in ciascuna popolazione, assumendo che l'individuo provenga da quella popolazione. Cornuet et al. (1999, citato in Randi e Lucchini 2002), descrive anche un metodo basato sulla distanza che calcola la distanza media inter-individuale dalla popolazione più vicina.

Il modello Bayesiano è finalizzato a dedurre la struttura del dataset assumendo che le osservazioni provenienti da ciascun campione siano estratte a caso da una distribuzione di frequenza dei geni che è sconosciuta e in cui esiste l'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) e il Linkage Equilibrium (LE). La struttura della popolazione in un dataset è individuata con la presenza di HWE e LD (Linkage Disequilibrium), e viene modellizzata assumendo che il genotipo di ciascun individuo è una miscela estratta a caso da un numero di differenti popolazioni.

Il numero di popolazioni che contribuiscono può essere stimato e, per un dato numero di popolazioni, possono essere stimate congiuntamente sia la frequenza di geni sia la proporzione di mescolanza per ciascun individuo. In questo modo, la popolazione campionata viene suddivisa in un numero di differenti sottopopolazioni che contengono effettivamente i cluster degli individui. Così, individui che a priori avevano un'origine conosciuta o sconosciuta sono comunque assegnati in maniera probabilistica ad una sottopopolazione.

Nella presente relazione vengono riportati i risultati di due studi relativi all'ibridazione cane-lupo:

- uno che utilizza l'analisi Bayesiana di mescolamento (Bayesian admixture analyses) della variazione di microsatelliti (Randi e Lucchini, 2002);
- l'altro che utilizza l'analisi di mescolamento per il Linkage Disequilibrium (admixture linkage disequilibrium analysis) (Verardi, Lucchini, Randi 2006).

3.1. “Bayesian admixture analyses” della variazione dei microsatelliti

Lo studio di Randi e Lucchini (2002) analizza la variazione allelica in 18 microsatelliti, tipizzati in origine nel cane domestico. A tal fine sono stati utilizzati complessivamente 211 campioni provenienti da lupi distribuiti nell'intero range di specie in Italia, da cani di 30 differenti razze e da 8 cani selvatici campionati in una area dell'Appennino centrale in cui è documentata la compresenza del lupo. Sono inoltre stati analizzati quattro ibridi lupo-cane ottenuti in cattività e cinque lupi in cattività di cui erano conosciuti i progenitori e che si pensa derivino dall'accoppiamento tra lupo italiano e lupo non indigeno. I campioni sono stati pre-classificati utilizzando esclusivamente i tratti morfologici esterni, che ha permesso di identificare la maggior parte dei campioni raccolti come lupi fenotipicamente “puri”, senza segni apparenti di ibridazione, ad eccezione di due lupi neri (W334 and W508), e un lupo “cinque dita” (W520).

Lo scopo dello studio era quello di:

1. stimare l'intensità della differenziazione genetica tra lupi e cani che erano stati distinti su base morfologica (informazioni fenotipiche a priori);
2. indagare la presenza di cluster geneticamente differenti, assumendo che tutti i campioni possono appartenere ad una sola indistinta “popolazione, indipendentemente dalla classificazione “a priori”

Nell'analisi dei microsatelliti si parte dal fatto che tre loci (CXX.213, C09.250, vWF.X) sono polimorfici nei lupi europei e nord-americani e cinque loci (CPH4, CPH7, CPH9, CPH12, CPH22) mostrano differenze significative nelle frequenze alleliche nei lupi italiani e nei cani.

L'amplificazione per PCR è stata portata avanti in un volume di 10 μ l.

La distribuzione della frequenza allelica, la presenza di alleli privati (gruppo-specifici), l'eterozigosità osservata (H_0) e attesa (H_E) per i singoli loci e come valore medio è stata valutata separatamente per il cane italiano e per il lupo, usando Genepop 3.1d e Fast 2.9.1. La differenza nell'eterozigosità tra lupi e cani è stata testata con il Wilcoxon signed rank test.

La determinazione dei genotipi individuali per 18 loci microsatelliti in 107 lupi, 95 cani e più altri 9 esemplari di lupi di origine sconosciuta o ibridi noti, mostra che tutti i microsatelliti sono polimorfici, mostrando 4-15 differenti alleli per locus (con una media di 8.5 ± 2.6) e valori di H_E che oscillano tra 0.161 e 0.839. La distribuzione della frequenza allelica varia tra i loci e mostra una marcata differenza tra lupi e cani.

I loci risultano sufficientemente distanti da permettere una ricombinazione allelica indipendente. Infatti le combinazioni a coppie alleliche sono al LE in tutti i loci nei due gruppi, ad eccezione di 4 casi nei cani (livello di probabilità $p < 0.05$).

La diversità genetica è significativamente ridotta nel lupo italiano che mostra un numero più basso di alleli e una minore eterozigosità rispetto al cane. H_0 non è significativamente diversa in media tra lupo e cane, mentre H_E è significativamente più bassa nei lupi. Cani e lupi mostrano un deficit significativo di eterozigosità a 12 e 3 in 18 loci e soprattutto i loci non sono in HWE.

È stato inoltre calcolato il valore di F_{IS} , il coefficiente di inbreeding, che stima il deficit di eterozigosità in una popolazione ($F_{IS} > 0$ è significativo). Il F_{IS} medio è significativamente positivo sia nei cani ($F_{IS} = 0.241$; $p < 0.05$) che nei lupi ($F_{IS} = 0.101$; $p < 0.05$). I cani non appartengono ad una

sola popolazione di razza e l'allontanamento dal HWE può essere attribuita agli incroci riproduttivi tra razze differenti.

L'allontanamento dal HWE dovuta al deficit di eterozigotità può indicare inbreeding in strutture locali e presenza di popolazioni strutturate localmente nei lupi italiani.

L'individuazione dei cluster di appartenenza è stata effettuata costruendo i neighbor-joining trees (NJ; Saitou and Nei 1987) con il programma Neighbor in Phylip 3.5c e partendo dalla matrice delle distanze genetiche inter-individuali. L'NJ tree clustering inter-individual microsatellite DPS distances (1-ps, cioè 1 meno la proporzione degli alleli condivisi) è mostrata in figura 4.

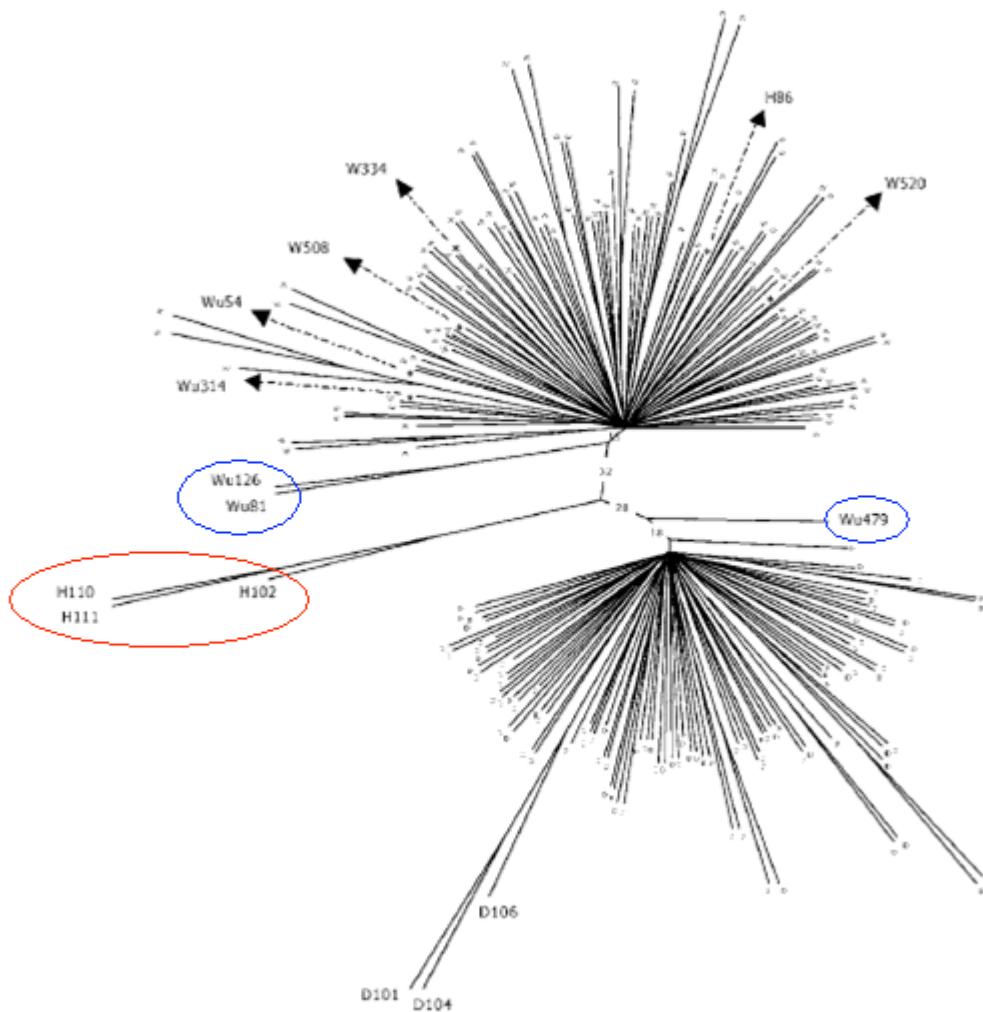


Figura 4. Albero delle relazioni tra i campioni di lupo e cane calcolati utilizzando la distanza a coppie DPS e l'algoritmo del neighbor-joining. (Da Randi e Lucchini 2002). Con il cerchio rosso sono stati segnalati gli ibridi noti, i cerchi blu indicano i lupi allevati in cattività che risultano intermedi tra lupi e cani.

Tre (H102, H110 and H111) dei quattro ibridi conosciuti sono intermedi tra lupi e cani. L'ibrido H86 è incluso nel cluster del lupo. Tre (Wu81, Wu126 and Wu479) dei cinque lupi allevati in cattività sono intermedi tra lupi e cani, ma Wu54 e Wu314 sono inclusi nel cluster del lupo. Tre lupi con anomalie fenotipiche (W334, W508 and W520) sono comunque inclusi nel cluster del lupo.

È stata inoltre effettuata la principal coordinate analysis (PCA) utilizzando Pagen. I risultati della PCA per i genotipi individuali sono riportati in figura 5.

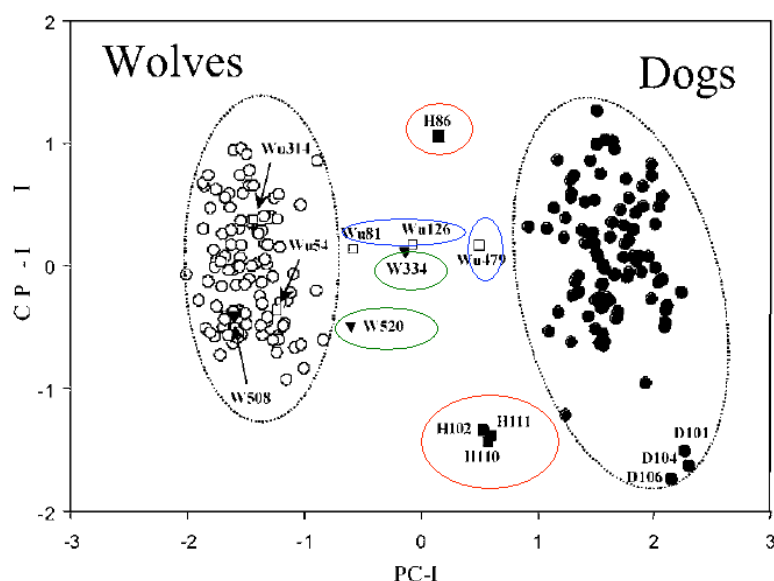


Figura 5. Punteggi individuali per i genotipi microsatelliti di lupo e cane plottati sui primi due assi (PC-I, PC-II) della “principal coordinate analysis” elaborata utilizzando Pagen.. H = lupi ibridi conosciuti; Wu = lupi in cattività di origine sconosciuta; W334 e W508 = “lupi neri”; W520 = “fifth finger wolf” (da Randi e Lucchini, 2002). I campioni risultati intermedi tra lupo e cane sono stati segnalati in figura (cerchio rosso= ibridi preventivamente riconosciuti, cerchio blu = lupi in cattività di origine sconosciuta, cerchio verde = altri lupi)

I punteggi individuali sono plottati lungo gli assi principali (PC-I and PC-II), che insieme spiegano il 32.4% della diversità genetica totale. Il plot mostra una chiara separazione dei punteggi individuali in due differenti gruppi su PC-I, in quanto tutti i cani e i lupi sono collocati rispettivamente nella parte destra e in quella sinistra del plot. Lupi e cani sono quasi completamente sovrapposti in PC-II e su tutti gli altri assi. Tutti gli ibridi (H86, H102, H110 and H111), più tre lupi in cattività (Wu81, Wu126 and Wu479), risultano intermedi tra il lupo e il cane. Anche due lupi selvatici italiani che mostravano tratti fenotipici anomali (Wu54 and Wu314) sono intermedi tra i lupi e i cani.

In sintesi, senza utilizzare le informazioni a priori sui campioni individuali attraverso la PCA, sono stati correttamente individuati i lupi selvatici e i cani come appartenenti a due gruppi distinti, e tutti gli ibridi noti e alcuni lupi in cattività come intermedi tra i due gruppi.

Per la Genetic admixture analysis è stato utilizzato un modello Bayesiano di clustering descritto da Pritchard et al. (2000, citato in Randi e Lucchini 2002), implementato con il programma Structure, che usa genotipi multilocus per dedurre la struttura della popolazione e contemporaneamente per assegnare gli individui alle popolazioni. Questo modello assume che ci siano K popolazioni (in cui K può non essere noto) ciascuna delle quali è caratterizzata da un set di frequenze alleliche in ciascun locus. Gli individui nel campione sono assegnati in maniera probabilistica alle popolazioni, o congiuntamente a due o più popolazioni se il loro genotipo indica che sono incrociati.

Nello studio di Randi e Lucchini, Structure è stato utilizzato con due diversi approcci di modellizzazione. Innanzi tutto è stato assunto che, prima di applicare il modello, tutti i campioni appartenessero ad una sola “popolazione”. La classificazione degli individui effettuata su base morfologica non è stata utilizzata e tutti i lupi e i cani sono stati attribuiti ad una unica ipotetica popolazione. La probabilità del numero di popolazioni (K) per l'insieme di dati è stata stimata fissando a priori un valore di K=1-5 (option MAXPOPS), e confrontando il ln della probabilità dei dati. Se l'ipotetica singola popolazione è ammessa e include più di una sottopopolazione, la probabilità dei dati crescerà con K.

I risultati dell'analisi sono riportati in tabella 3, in cui si può vedere che il ln della probabilità è minimo per K=1 e massimo per K=3 il che suggerisce che l'intera “popolazione” di lupi, cani e ibridi è eterogenea e contiene gruppi geneticamente distinti.

Tabella 3. Probabilità del numero di popolazioni (K) per l'insieme di campioni di lupo e cane (da Randi e Lucchini 2004)

Table 4. (a) Probability of the number of populations (K) for the pooled wolf and dog samples (211 individuals, 18 loci); and (b) Proportion of membership of each pre-defined population in two or three inferred clusters computed using STRUCTURE

(a)	
K	Ln probability of the data
1	-11296.9
2	-8878.6
3	-8827.6
4	-9066.5
5	-9127.2

(b)					
Population (ID)	Two inferred clusters		Three inferred clusters		
	I	II	I	II	III
Dogs (D)	0.993	0.007	0.892	0.003	0.104
Wolves (W)	0.004	0.996	0.007	0.990	0.003
Hybrids (H)	0.571	0.429	0.489	0.403	0.108
CaptiveWolves (Wu)	0.270	0.730	0.087	0.698	0.215

Sia cani che lupi mostrano deficit significativi nell'eterozigosità, valori positivi di F_{IS} e allontanamento dall'HWE. Risultati simili sono riportati nella maggior parte degli studi effettuati sulle popolazioni di lupo del Nord America, il che suggerisce l'assenza sia di riproduzioni non-casuali dovute all'inbreeding sia di subpopolazioni geografiche strutturate.

La diversificazione genetica tra lupi e cani è data dai valori di $F_{ST}=0.33$ e $R_{ST}=0.26$, che significa che circa il 30% della diversità genetica totale è distribuita tra i due gruppi. La conseguenza genetica della domesticazione, così come l'isolamento storico e le fluttuazioni demografiche hanno portato cani e lupi a divergere in maniera significativa nelle loro frequenze alleliche dei microsatelliti. La presenza di alleli esclusivi, ciascuno dei quali si presenta con frequenze relativamente alte nei cani o nei lupi, suggeriscono in maniera diretta che c'è un basso flusso genico tra lupi e cani, almeno nelle ultime generazioni.

3.2. "Admixture linkage disequilibrium analysis"

Lo studio di Verardi, Lucchini e Randi (2006) ha studiato il genotipo di lupi allo stato selvatico usando markers microsatelliti associati (linked microsatellites markers) al fine di rilevare il segnale di ibridazione e introgressione con i cani randagi in Italia. I genotipi dei multiloci sono stati analizzati utilizzando un linkage model implementato attraverso il programma STRUCTURE 2.1.

Lo studio ha analizzato complessivamente 313 campioni (220 lupi, 85 cani e 7 ibridi di origine certa) usando 16 microsatelliti da quattro gruppi associati mappati in quattro differenti cromosomi di canide (Melleresh et al. 1997, Neff et al. 1999, citato dagli autori) e quattro loci non associati.

I microsatelliti non associati (unlinked) danno informazioni nella misura in cui essi rappresentano markers di cromosomi indipendenti. In questo caso, la struttura della popolazione viene modellizzata assumendo che il mescolamento generi disequilibri transitori, che comunque, ci si aspetta declinino rapidamente, portando il segnale del mescolamento a scomparire nel giro di poche generazioni.

Al contrario, ci si aspetta che il linkage disequilibrium derivante da mescolamento decada molto più lentamente con markers strettamente associati; per questi motivi il linkage model può migliorare il clustering di popolazioni e può portare a verificare la presenza di mescolamenti più antichi.

Tabella 4. Sintesi della variazione allelica nel genotipo di lupo (*Canis lupus*) e cani in loci microsatelliti associati e 4 non associati (loci FH2164, C20.622, FH2593 e FH2295 sono utilizzati in entrambi i datasets). Da Verardi, Lucchini e Randi 2006. [ID dei Microsatelliti, linkage groups e distanza nella mappa (espressa in megabasi, Mb, c corrispondenti circa ai Morgans) sono indicati secondo quanto riportato in Mellersh et al. (1997), Breen et al. (2001), e Guyon et al. (2003). La deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg è stata stimata con l' FIS per ciascun locus e ciascuna popolazione. I valori significativi di FIS (con un livello di probabilità di $P < 0.05$ e una correzione sequenziale di Bonferroni per le comparazioni multiple) sono indicati con un asterisco *; SE è l'errore standard]

	Linkage groups (Mb)	Alleles	Allele size	H_E-H_0 in wolves	H_E-H_0 in dogs	F_{IS} in wolves	F_{IS} in dogs
Linked loci							
CPH3	CFA6 (52.1)	14	158–188	0.72–0.61	0.78–0.77	0.150*	0.078
C06.69	CFA6 (56.6)	8	146–168	0.51–0.48	0.70–0.68	0.070*	0.031
FH2164	CFA6 (58.5)	17	302–348	0.64–0.63	0.86–0.87	0.018*	–0.005*
LEI-2A11	CFA6 (61.4)	6	175–193	0.29–0.31	0.45–0.36	–0.056*	0.192*
CPH16	CFA20 (35.7)	10	148–176	0.36–0.30	0.85–0.68	0.167*	0.200*
C20.253	CFA20 (37)	11	89–111	0.11–0.08	0.46–0.35	0.324*	0.241*
C20.622	CFA20 (41)	13	209–237	0.60–0.56	0.74–0.60	0.064	0.198*
PRKCD	CFA20 (43.1)	19	108–152	0.69–0.50	0.84–0.68	0.270*	0.197*
FH2274	CFA2 (3)	13	266–334	0.39–0.31	0.85–0.74	0.218*	0.128*
FH2087	CFA2 (11.8)	12	164–254	0.46–0.42	0.79–0.60	0.109*	0.242*
CPH7	CFA2 (19.9)	12	157–185	0.28–0.16	0.77–0.56	0.434*	0.280*
FH2593	CFA2 (31.7)	12	324–376	0.58–0.51	0.80–0.73	0.107*	0.093*
FH2017	CFA15 (47.9)	7	252–276	0.32–0.30	0.54–0.49	0.073*	0.099*
CPH4	CFA15 (52)	9	127–149	0.45–0.42	0.61–0.46	0.072*	0.242*
UOR0442	CFA15 (52.8)	8	221–239	0.55–0.45	0.64–0.54	0.181*	0.161*
FH2295	CFA15 (56.2)	17	405–507	0.57–0.48	0.87–0.72	0.165	0.175*
Unlinked loci							
FH2004	CFA11	14	102–196	0.76–0.65	0.84–0.72	0.149*	0.150*
CPH5	CFA17	11	100–122	0.68–0.68	0.67–0.54	0.002*	0.200*
FH2161	CFA21	12	129–273	0.77–0.77	0.82–0.77	–0.004	0.069*
FH2079	CFA24	8	260–292	0.67–0.65	0.61–0.63	0.032*	–0.031
Mean F_{IS} (SE)						0.127 (0.03)	0.138 (0.02)
Mean H_0 (SE)				0.46 (0.18)	0.63 (0.13)		
Mean H_E (SE)				0.52 (0.18)	0.72 (0.13)		

I risultati dello studio mostrano che il *LD*, così come rilevato con i metodi statistici classici del *single locus*, è più alto nei loci associati piuttosto che negli indipendenti, ed è più alto nei lupi che nei cani. Tutti i loci sono polimorfici per i cani e i lupi, mostrando 6-19 alleli, con valori di H_E che variano da 0.11 (al locus C.20.253 nel lupo) a 0.87 (al locus FH2295 nel cane). Sia nei lupi che nei cani il valore medio di $H_E > H_0$ e i valori di F_{IS} sono significativamente positivi. Nei lupi solo 3 loci sono in HWE. Una percentuale sostanziale della variabilità genetica totale ($F_{ST}=0.24$, $P < 0.001$; ANOVA) è distribuita tra lupi e cani. Il Linkage Disequilibrium è stato stimato in complesso su 190 combinazioni di locus in ciascun gruppo di campioni di lupo e di cane, dei quali il 13% era con gruppi associati e il rimanente 87% tra loci non associati. Con il test di Bonferroni è stato inoltre dimostrato che i loci associati mostrano uno scostamento maggiore dal LD che i loci non associati (71% vs. 6.6% nei lupi; 12.5% vs. 1.2% nei cani, dopo la correzione di Bonferroni), e i lupi mostrano segnali di LD più forti dei cani sia nei loci associati che in quelli non associati.

Gli ibridi conosciuti e i lupi per i quali si ipotizzava un mescolamento sono stati indentificati con un valore soglia di $q_w > 0.80$, usando sia l'F- che l'I-model in STRUCTURE 2.1. I valori di appartenenza individuale sono stati calcolati con $K=2-4$, sia con l' "independent frequency model" (I-model) che assume che la frequenza degli alleli in ciascuna popolazione evolva indipendentemente, sia con il "correlated frequency model" (F-model) che assume che per un numero limitato di generazioni dopo la suddivisione della popolazione, o in conseguenza di una migrazione in atto, l'evoluzione delle frequenze alleliche in ciascuna popolazione è collegata alla frequenza allelica della popolazione ancestrale. I risultati, con entrambi i modelli, mostrano che tutti i cani hanno $q_d > 0.80$. Tutti gli ibridi noti sono stati assegnati al proprio cluster con $q_h > 0.80$, con $K=3$ l'F-model, o parzialmente al cluster di cane e lupo con $q_h < 0.80$, con $K=1$ o 4 e l'I-model o l'F model. Sulla base di questi risultati è stata selezionata una soglia $q_i = 0.80$ per assegnare il genotipo del lupo ad un singolo cluster (se $q_w > 0.80$) o a più di uno (se $q_h < 0.80$).

I test di probabilità permettono di assegnare la popolazione di origine degli alleli, portando ad una identificazione dei lupi "mescolati", che concorda con l'assegnazione fatta attraverso i valori di q_w ; il test di probabilità (con $K=2-4$ e indipendentemente dall'I- o F-model) porta ad identificare 11 dei 220 genotipi di lupo che sono mescolati con i cani, una percentuale (5%) significativamente più alta di quella precedentemente trovata usando i marcatori non associati; il valore medio a posteriori del parametro di ricombinazione suggerisce $r=70 (\pm 20)$ che lupi e cani possono essersi mescolati durante le ultime 70 (± 20) generazioni. Considerando che una generazione di lupo è di circa 2-3 anni, si può affermare che lupi e cani si sono mescolati in Italia per 140-210 anni.

4. Conclusioni: possibili strategie per la conservazione

La genetica della conservazione ha tra i suoi scopi principali quello di verificare se determinate specie, o popolazioni, sono a rischio di estinzione e, nel caso, quali sono l'origine, le dinamiche e i meccanismi di tale minaccia. Avere una conoscenza adeguata delle problematiche è in alcuni casi la sola possibilità di operare scelte gestionali efficaci che vadano realmente nella direzione della conservazione. Una volta analizzata la situazione di partenza e compresi i processi e le dinamiche, le strategie da mettere in atto sono spesso di natura ecologica.

Nel caso del lupo appenninico, gli studi di genetica (in particolare Lucchini, Galov e Randi 2004, tra quelli utilizzati per la presente relazione) hanno permesso di dimostrare che la popolazione di *Canis lupus italicus* è geneticamente distinta dagli altri lupi europei e che il suo isolamento è iniziato diverse migliaia di anni fa e non solamente da pochi decenni.

I dati ecologici ci dicono che la popolazione di *Canis lupus italicus* conta circa 600 individui ed occupa tutto lo spazio ecologicamente disponibile nell'Appennino, stimato in 13.500 km² (Boitani 1984). In termini prettamente ecologici è quindi da escludere un ulteriore aumento della popolazione di lupo in Italia, a meno di drastici cambiamenti nelle modalità dell'utilizzo delle risorse e del territorio da parte dell'uomo che rendano disponibile ulteriore habitat.

L'aumento nel numero di individui di lupo appenninico ha quindi come conseguenza una espansione ed una ricolonizzazione delle aree Alpine dell'Italia nord occidentale e della Francia.

La prima strategia di conservazione del lupo in Italia consiste nel mettere in atto tutti gli strumenti per fare in modo che le attività o i fattori umani non riducano ulteriormente l'habitat potenziale del lupo. Ciò dovrebbe comprendere anche una intensa attività di controllo tesa a contrastare i comportamenti persecutori dell'uomo verso il lupo che, nonostante la ferrea normativa di tutela già presente, portano ogni anno alla morte di numerosi individui di lupo appenninico.

Oltre alla disponibilità di habitat, l'altro elemento ecologicamente rilevante è rappresentato dalla connessione tra i diversi habitat e quindi alla possibilità di spostamento: la frammentazione del territorio, intesa come l'impossibilità per il lupo di passare da un'area ecologicamente idonea ad un'altra, può comportare una suddivisione in sottopopolazioni con l'instaurarsi di tutti quei fenomeni di minaccia per la conservazione tipici delle piccole popolazioni. Nonostante la struttura orografica ed insediativa dell'Italia penisinsulare (con l'arco appenninico continuo e scarsamente antropizzato) e l'etologia del lupo (capace di grandi spostamenti) rendano minimo questo tipo di rischio, è comunque importante che vengano poste in atto azioni per limitare l'insediarsi di nuove barriere ecologiche.

Per ciò che concerne l'ibridazione, sebbene tutti gli studi presi in esame dimostrino che lupi e cani appartengono a gruppi geneticamente distinti, l'isolamento riproduttivo non è completo e sono state osservate alcune introgressioni nei lupi con diversi livelli di mescolamento.

L'analisi Bayesiana di mescolamento (Randi e Lucchini, 2002) mostra che c'è un basso flusso genico tra lupo e cane, almeno nelle ultime generazioni.

L'analisi di mescolamento per il Linkage Disequilibrium (Verardi, Lucchini, Randi 2006) è riuscita a dimostrare che il mescolamento tra lupo e cane avviene almeno da 140-210 anni. La differenza tra i due studi è data principalmente dal fatto che l'utilizzo di loci associati è in grado di identificare

eventi di mescolamento antichi in maniera più efficiente di quanto non sia possibile con l'utilizzo di markers non associati.

È interessante notare che i lupi che presentano introgressione sono per lo più confinati ai margini dell'areale di distribuzione della specie in Italia (Verardi, Lucchini e Randi 2006).

Nonostante l'ibridazione, lupi e cani randagi rimangono geneticamente distinti, il che suggerisce che l'introgressione in natura è fortemente contrastata dalla selezione o da fattori ecologici.

Lo studio di Verardi, Lucchini e Randi (2006) conclude che l'introgressione per ibridazione, sebbene protratta nel tempo, sia di limitata entità e non rappresenti una minaccia all'integrità del pool genetico del lupo italiano.

Sebbene non rappresenti un pericolo immediato, non possono essere esclusi allo stato attuale delle conoscenze problemi di conservazione legati all'introgressione.

Randi (2008) rileva le difficoltà di indagare i fenomeni di ibridazione ed afferma che ai fini della conservazione sono disponibili meno informazioni di quelle necessarie per controllare la diffusione degli animali randagi. Per questo suggerisce che vengano attuate azioni di monitoraggio genetico (con diffusione dei dati ottenuti). Lo stesso autore suggerisce anche l'implementazione di protocolli di analisi ufficiali, finalizzati ad identificare popolazioni pure o ibride (sia in natura che in cattività) attraverso l'utilizzo di marcatori di DNA e analisi di mescolamento.

Programmi di valutazione dell'ibridazione possono essere usati per mappare la distribuzione di popolazioni naturali prive di introgressione e sostenere la loro conservazione in condizioni selvatiche.

Che rappresenti o meno un problema, l'ibridazione può essere senz'altro contrastata con leggi adeguate sul randagismo e sul controllo degli animali domestici.

Riferimenti bibliografici

- L. Boitani. *Genetic considerations on wolf conservation in Italy*. Italian Journal of Zoology, (1984) 51: 3, 367 — 373
- E. Fabbri, C. Miquel, V. Lucchini, A. Santini, R. Caniglia, C. Duchamp, J.M. Weber, B. Lequette, F. Marucco, L. Boitani, L. Fumagalli, P. Taberlet and E. Randi. *From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (Canis lupus) population*. Molecular Ecology (2007) 16, 1661–1671.
- V. Lucchini, E. Fabbri, F. Marucco, S. Ricci, L. Boitani and E. Randi. *Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (Canis lupus) packs in the western Italian Alps*. Molecular Ecology (2002) 11, 857–868.
- V. Lucchini, A. Galov and E. Randi. *Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (Canis lupus) in the Italian Apennines*. Molecular Ecology (2004) 13, 523–536
- E. Randi. *Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives*. Molecular Ecology (2008) 17, 285–293
- E. Randi and V. Lucchini. *Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (Canis lupus) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation*. Conservation Genetics (2002) 3: 31–45.
- A. Verardi, V. Lucchini and E. Randi. *Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (Canis lupus) by admixture linkage disequilibrium analysis*. Molecular Ecology (2006) 15, 2845–2855